



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

136 0082846

92 INPL 123 N  
[M] 1992 TOURATIER, C.

# THESE

présentée à l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

pour obtenir le titre de **DOCTEUR de l'INPL**

par Christine TOURATIER



**COMPORTEMENT DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES  
DE LA VIANDE DE PORC AU COURS DU STOCKAGE  
ET DU CHAUFFAGE.**

**RELATIONS AVEC LA QUALITE DE LA VIANDE.**

Soutenue publiquement le 16 Décembre 1992 devant la commission d'examen

MM. J. ADRIAN, Professeur

Président du jury

M.B. ASSOUMANI, Directeur de Recherches

Rapporteur

J. BRUN-BELLUT, Professeur

J.P. HALUK, Maitre de Conférences

Examineurs

M. METCHE, Professeur



*Je remercie Monsieur ADRIAN pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury devant lequel je soutiens ce mémoire.*

*Que Monsieur METCHE trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour m'avoir guidée dans la réalisation de ce travail, pour les orientations judicieuses qu'il m'a conseillées, pour son aide et son soutien dans les périodes difficiles. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accompagnée jusqu'à la soutenance malgré toutes les difficultés rencontrées.*

*Je remercie chaleureusement Monsieur ASSOUMANI pour les possibilités de travail qu'il m'a offertes au sein du laboratoire de Biotechnologie, les conseils avisés qu'il m'a prodigués tout au long de mon travail et pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.*

*Mes remerciements vont aussi à Messieurs BRUN-BELLUT et HALUK pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu témoigner à ce travail.*

*Je remercie vivement la Société SANDERS et, plus particulièrement, son directeur technique et scientifique, Monsieur JACQUOT, qui m'a donné l'opportunité d'intégrer son équipe de recherche, de préparer mon doctorat dans des conditions satisfaisantes et des moyens techniques permettant une bonne présentation orale de ce travail.*

*Je remercie tous les membres du laboratoire de Biotechnologie, passagers ou permanents, pour l'ambiance de travail qu'ils ont su entretenir, et tout particulièrement Michèle VELLERET, pour son aide dans la réalisation de ce mémoire.*

*Qu'Anne-Marie GRCINA soit assurée de ma gratitude pour son assistance dans les recherches bibliographiques.*

*Je n'oublierai pas d'adresser un remerciement spécial à "l'étage de la Direction", et surtout à Martine GALLOPIN, pour m'avoir supportée au-delà des délais légaux et permis des impressions lasers.*

*Je remercie enfin ma famille et mes amis pour l'écoute et le soutien constant qu'ils m'ont témoignés pendant ces quatre années.*



# GLOSSAIRE

ADP	Adénosine 5.diphosphate
Ald	Aldolase
ATP	Adénosine 5.triphosphate
BCA	Acide bicinchoninique
CPK	Créatine phosphate kinase
En	Enolase
FOP	Sonde à fibre optique
GAPDH	Glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
LD	Longissimus dorsi
LDH	Lactate déshydrogénase
LF1	Conductivité mesurée à 45 min post-mortem
LFu	Conductivité mesurée à 20 h post-mortem
M	Molarité
MB	Myoglobine
mS/cm	milliSiemens/centimètre
MK	Myokinase
NAD	Nicotinamine adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamine adénine dinucléotide réduit
PFK	Phosphofructokinase
PGAK	Phosphoglycérate kinase
PGAM	Phosphoglycérate mutase
PGI	Phosphoglucose isomérase
PGM	Phosphoglucomutase
PHb	Phosphorylase b
pH <sub>1</sub>	pH mesuré à 45 min post-mortem
pHu	pH ultime (mesuré à 20h post-mortem)
PK	Pyruvate kinase
p.m	Post-mortem
P.M	Poids moléculaire
PRE	Pouvoir de rétention d'eau
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TFA	Acide trifluoroacétique
TNBS	Acide trinitrobenzène sulfonique
TPI	Triose phosphate isomérase



# SOMMAIRE

	Page
<u><b>INTRODUCTION</b></u>	1
<u><b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b></u>	
<b>1. TRANSFORMATIONS DU MUSCLE EN VIANDE</b>	
<b>1.1. Structure et composition du muscle</b>	4
1.1.1. Structure musculaire	
1.1.1.1. La fibre musculaire	
1.1.1.2. Classification des fibres musculaires	
1.1.2. Composition du muscle	
1.1.2.1. L'eau dans le tissu musculaire	
1.1.2.2. Les protéines musculaires	
1.1.2.2.1. Les protéines du stroma	
1.1.2.2.2. Les protéines sarcoplasmiques	
1.1.2.2.3. Les protéines myofibrillaires	
1.1.2.3. Les lipides musculaires	
1.1.2.4. Les glucides musculaires	
<b>1.2. La rigor mortis</b>	10
1.2.1. Modifications biochimiques	
1.2.2. Modifications physiques	
<b>1.3. La maturation</b>	12
1.3.1. Modifications physiques	
1.3.2. Mécanismes biochimiques de la maturation	
1.3.2.1. Mécanismes enzymatiques	
1.3.2.1.1. Les protéases calcium-dépendantes	
1.3.2.1.2. Les enzymes lysosomales	
1.3.2.2. Mécanismes physico-chimiques	
1.3.3. Evolution de la structure myofibrillaire	



## **2. LA QUALITE DE LA VIANDE DE PORC**

<b>2.1. Définitions de la qualité de la viande</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Caractéristiques de la qualité technologique de la viande de porc</b>	<b>18</b>
2.2.1. La couleur	
2.2.2. Le pouvoir de rétention d'eau	
2.2.3. L'aptitude à la conservation	
<b>2.3. Les défauts de qualité de la viande</b>	<b>20</b>
2.3.1. Evolution du pH et qualités technologiques	
2.3.1.1. Le pouvoir de rétention d'eau	
2.3.1.2. La couleur	
2.3.1.3. L'aptitude à la transformation	
2.3.2. Les viandes DFD	
2.3.3. Les viandes acides	
2.3.4. Les viandes exsudatives	
<b>2.4. Critères d'appréciation de la qualité</b>	<b>25</b>
2.4.1. Estimateurs sur la carcasse	
2.4.2. Estimateurs sur l'animal vivant	

## **3. LES PROTEINES SARCOPLASMIQUES DU MUSCLE DE PORC**

<b>3.1. Généralités sur les protéines solubles</b>	<b>28</b>
3.1.1. Solubilité des protéines	
3.1.2. Influence du pH	
3.1.3. Influence de la force ionique	
<b>3.2. Techniques d'étude des protéines sarcoplasmiques du muscle de porc</b>	<b>29</b>
3.2.1. Préparation du muscle	
3.2.2. Extraction des protéines	
3.2.2. Séparation et identification des protéines	
<b>3.3. Composition des protéines du sarcoplasme</b>	<b>31</b>
<b>3.4. Fonction des protéines sarcoplasmiques</b>	<b>33</b>
3.4.1. Les enzymes glycolytiques	
3.4.2. Les autres protéines sarcoplasmiques	
<b>3.5. Localisation des protéines sarcoplasmiques dans la cellule</b>	<b>34</b>



<b>4. <u>EVOLUTION DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES AU COURS DU STOCKAGE</u></b>	
4.1. Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques	35
4.2. Incidence de la qualité de la viande sur la solubilité des protéines	36
4.3. Solubilisation des protéines myofibrillaires	38
4.4. Relargage de protéines dans l'exsudat	38
4.4.1. Concentration en protéines de l'exsudat	
4.4.2. Identification des protéines de l'exsudat	
4.4.3. Variations de la composition protéique de l'exsudat	
<b>5. <u>EVOLUTION DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES AU COURS DU CHAUFFAGE</u></b>	
5.1. Dénaturation thermique des protéines	40
5.1.1. Principe de la dénaturation	
5.1.2. Energétique de la dénaturation	
5.2. Différents modes de traitements thermiques	41
5.3. Evolution de la solubilité des protéines	42
5.3.1. Solubilité globale	
5.3.2. Sensibilité thermique des protéines	
5.4. Evolution du pH de la viande	45
<b><u>CONCLUSIONS ET OBJECTIFS</u></b>	46
<b><u>MATERIEL ET METHODES</u></b>	
1. Matériel animal	49
2. Prélèvements et mesures	49
2.1. Prélèvements	
2.2. Mesures	



<b>3. Extraction des protéines sarcoplasmiques</b>	<b>50</b>
3.1. Choix du milieu d'extraction	
3.2. Optimisation de la méthode d'extraction des protéines de la phase aqueuse	
3.3. Influence de la durée et de la température sur le rendement d'extraction	
<b>4. Méthodes de dosage</b>	<b>51</b>
4.1. Dosage des protéines sarcoplasmiques	
4.1.1. Méthode de LOWRY	
4.1.2. Méthode au BCA	
4.2. Dosage de l'azote $\alpha$ .aminé	
<b>5. Séparation des protéines</b>	<b>54</b>
5.1. Chromatographie d'exclusion	
5.2. Chromatographie à polarité de phase inversée	
<b>6. Détermination des pertes en eau</b>	<b>58</b>
6.1. Détermination des pertes au stockage	
6.2. Pouvoir de rétention d'eau	
<b>7. Les conditions de chauffage</b>	<b>58</b>
<b>8. Détermination des activités enzymatiques</b>	<b>59</b>
8.1. Activité de la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase	
8.2. Activité de la créatine phosphate kinase	
8.3. Activité de la lactate déshydrogénase	

## **RESULTATS - DISCUSSION**

### **1. TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES**

#### **1.1. Extraction** **62**

- 1.1.1. Choix du milieu d'extraction
- 1.1.2. Optimisation de la méthode d'extraction des protéines de la phase aqueuse
- 1.1.3. Influence de la durée et de la température sur le rendement d'extraction



1.2. Dosage des protéines solubles	66
1.3. Techniques de séparation	67
1.3.1. Chromatographie d'exclusion sur gel	
1.3.2. Chromatographie à polarité de phase inversée	
<b>2. <u>PROTEINES SARCOPLASMIQUES ET CRITERES DE QUALITE DE LA VIANDE</u></b>	
2.1. Protocole	75
2.2. Résultats	75
2.2.1. La concentration en protéines sarcoplasmiques comme critère de qualité de la viande	
2.2.2. Variations des paramètres de qualité de la viande suivant le pH <sub>1</sub> et le pH <sub>u</sub>	
2.2.3. Composition en protéines sarcoplasmiques suivant la qualité de la viande	
<b>3. <u>COMPORTEMENT DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES AU COURS DU STOCKAGE</u></b>	
3.1. Cas des viandes de qualité normale	83
3.1.1. Protocole	
3.1.2. Evolution de la teneur en protéines	
3.1.3. Evolution de la composition en protéines	
3.1.4. Quantification de la protéolyse	
3.2. Cas des viandes exsudatives	87
3.2.1. Evolution de la concentration protéique	
3.2.2. Evolution de la composition en protéines	
3.3. Influence du pH et de la température sur la solubilité des protéines sarcoplasmiques	92
3.3.1. Protocole	
3.3.2. Influence du pH	
3.3.3. Action conjointe du pH et de la température	
<b>4. <u>COMPORTEMENT DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES AU COURS DU CHAUFFAGE</u></b>	
4.1. Viandes de qualité normale	98
4.1.1. Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques d'un extrait musculaire au cours du chauffage	
4.1.1.1. Protocole	



4.1.1.2. Résultats	
4.1.1.3. Hypothèses sur les causes de l'insolubilisation	
4.1.2. Quantification de la protéolyse	
4.1.2.1. Par chromatographie d'exclusion	
4.1.2.2. Par dosage des acides aminés libérés	
4.1.3. Influence de la durée du chauffage sur la solubilité des protéines	
4.1.4. Insolubilisation différentielle des protéines sarcoplasmiques en fonction de la température étudiée par HPLC	
4.1.5. Evolution du pH au cours du chauffage	
<b>4.2. Viandes exsudatives</b>	<b>110</b>
4.2.1. Evolution de la solubilité des protéines	
4.2.2. Insolubilisation différentielle des protéines sarcoplasmiques au cours du chauffage étudiée par HPLC	
4.2.3. Evolution du pH au cours du chauffage	
<b>4.3. Viandes acides et viandes DFD</b>	<b>113</b>
4.3.1. Evolution de la solubilité des protéines en fonction de la température	
4.3.2. Evolution du pH	
<b>4.4. Evolution des activités enzymatiques au cours du chauffage</b>	<b>116</b>
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>120</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>123</b>



# INTRODUCTION

La sélection pratiquée en France ces vingt dernières années sur les porcs charcutiers a favorisé la réduction du coût alimentaire, l'amélioration de la conformation et la production d'animaux moins gras: le poids de muscle dans une carcasse de 80kg est passé de 33 à 42 kg et la marge de l'éleveur a augmenté de 70F par porc. Parallèlement, la qualité de la viande s'est dégradée: -0.2 point de pH (pH 24h post-mortem) et -1.5% de rendement technologique (ITP - CFCA, 1987).

Outre sa position de leader dans l'alimentation animale, la société SANDERS intervient à tous les stades de la filière porcine : de la génétique, avec le schéma France-Hybrides, premier schéma français qui représente 20% du marché national des porcs hybrides, jusqu'à l'abattage et la commercialisation des carcasses: 1 624 581 porcs abattus et 1 100 000 porcs découpés pour l'année 91, plaçant SANDERS au deuxième national pour l'abattage et la découpe des porcs.

Le schéma génétique France-Hybrides est basé sur un croisement Large-White\*Landrace pour la lignée femelle et Piétrain\*Synthétique Hampshire pour la lignée mâle. Depuis plusieurs années, des problèmes de qualité, notamment de viandes exsudatives et de viandes acides, ont été rapportés par certains acteurs de l'aval de la filière porcine. Aucune appréciation financière des pertes engendrées par ces défauts n'a été effectuée; cependant, il est clair que la qualité représente un enjeu capital pour les industriels français à l'heure de la mise en place du marché unique européen.

La qualité de la viande recouvre plusieurs aspects:

- les qualités sensorielles (tendreté, jutosité, saveur) qui déterminent la satisfaction du consommateur de viande fraîche
- les qualités diététiques
- les qualités hygiéniques, notamment la conservabilité
- les qualités technologiques qui conditionnent l'aptitude à la transformation.

Par rapport aux autres espèces productrices de viande pour lesquelles les qualités sensorielles constituent l'élément dominant, l'espèce porcine occupe une position spéciale dans la mesure où les deux tiers de la carcasse de porc sont commercialisés sous forme de produits



transformés; une attention particulière est donc à porter aux qualités technologiques de la viande de porc.

Trois défauts majeurs sont rencontrés:

- les viandes DFD ( Dry, Firm, Dry) sont sèches, dures, de couleur foncée et présentent des problèmes de conservation.
- les viandes PSE ( Pale, Soft, Exsudative), ou viandes exsudatives, sont pâles, molles et exsudent beaucoup d'eau au stockage et à la cuisson.
- les viandes acides sont pâles et présentent également un mauvais rendement de transformation.

Ces défauts sont imputables pour 50% à la génétique et pour 50% aux conditions de pré et post-abattage. Les bases métaboliques de ces défauts sont maintenant assez bien connues. Les moyens de lutte restent cependant limités.

Les critères actuels sont basés sur la sensibilité au stress des animaux, à l'origine de nombreux défauts de qualité de la viande : test à l'halothane, marqueurs sanguins.

D'autres critères, pouvant être appréciés directement sur le tissu musculaire, tels que le stock glycolytique ou le spectre des composés phosphorylés obtenu par résonance magnétique nucléaire, font actuellement l'objet de recherches à l'INRA (SELLIER, 1987; MIRI et al., 1988).

Pour les raisons développées précédemment, SANDERS a choisi d'investir dans la recherche de prédicteurs de la qualité de la viande, c'est-à-dire la mise au point de méthodes de détermination pratiquées sur l'animal vivant, qui permettraient de prédire la qualité de la viande après l'abattage et qui soient utilisables en sélection.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la préparation d'un doctorat sous convention CIFRE.

La prédiction de la qualité de la viande peut s'envisager sous deux angles: à partir de critères sanguins ou à partir de critères musculaires.

Dans un premier temps, nous avons considéré le compartiment sanguin pour sa représentativité et pour sa facilité de prélèvement.

- Certaines hormones du stress, cortisol et adrénaline, quantifiées au cours de stress divers et lors de l'abattage, ont été corrélées à des critères de qualité de la viande. Le coût élevé des dosages hormonaux, la difficulté de standardisation des événements stressants et la variabilité interanimale importante de réactivité au stress nous ont conduit à abandonner cet axe de recherche.



- Nous avons également étudié sur le sang les conséquences de la fragilisation membranaire provoquée par un stress, et plus précisément la résistance des érythrocytes à un choc osmotique et le passage de certaines enzymes tissulaires dans le sang (créatine phosphate kinase, lactate déshydrogénase) au moment de l'abattage. La variabilité excessive entre les séries d'abattage a limité toute interprétation et cet axe a été rapidement abandonné faute de résultats significatifs.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la structure musculaire en essayant de mettre en évidence des différences biochimiques en relation avec la qualité de la viande; les méthodes de détermination ainsi mises au point pourraient être pratiquées à partir de biopsies pour permettre de définir des critères de prédiction, ante-mortem, de la qualité de la viande.

Nous avons choisi de focaliser nos efforts sur les protéines sarcoplasmiques de la viande de porc. En effet, le développement du caractère exsudatif - défaut sur lequel nous porterons la plus grande attention - induit de profondes modifications au niveau des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires. Ces modifications sont accompagnées du relargage hors de la cellule musculaire de jus chargé de composés solubles, et en particulier de protéines sarcoplasmiques. La littérature porte sélectivement sur les protéines myofibrillaires, qui sont directement impliquées dans l'évolution de la structure musculaire au cours de la conservation et de la cuisson. Néanmoins, un petit nombre de protéines sarcoplasmiques a été étudié pour leur sensibilité aux modifications de pH et de température. Par ailleurs, les techniques d'étude des protéines ont évolué en fonction des progrès apportés à l'instrumentation et aux méthodes de séparation: électrophorèse sur gel d'amidon dans les années 60-70, électrophorèse SDS sur gel de polyacrylamide depuis les années 75-80 et l'HPLC depuis le début des années 80.

Nous envisageons d'étudier les protéines sarcoplasmiques par HPLC, leur comportement au cours du stockage et du chauffage, et de voir dans quelle mesure ces dernières pourraient permettre de discriminer les viandes entre elles suivant des critères qualitatifs.

Dans un premier temps, nous résumerons les connaissances actuelles sur les protéines sarcoplasmiques du muscle de porc et leur comportement au cours du stockage et du chauffage.

Nous définirons, dans un deuxième temps, les protocoles développés au cours de nos travaux.

Dans un troisième temps, nous exposerons la technique adoptée pour la séparation par HPLC des protéines sarcoplasmiques, nous préciserons la relation existant entre la concentration en protéines sarcoplasmiques et la qualité de la viande, et nous étudierons l'évolution des protéines sarcoplasmiques au cours d'une conservation d'une semaine à 4°C ainsi qu'au cours de traitements thermiques en bain-marie de 30 à 80°C.



**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**





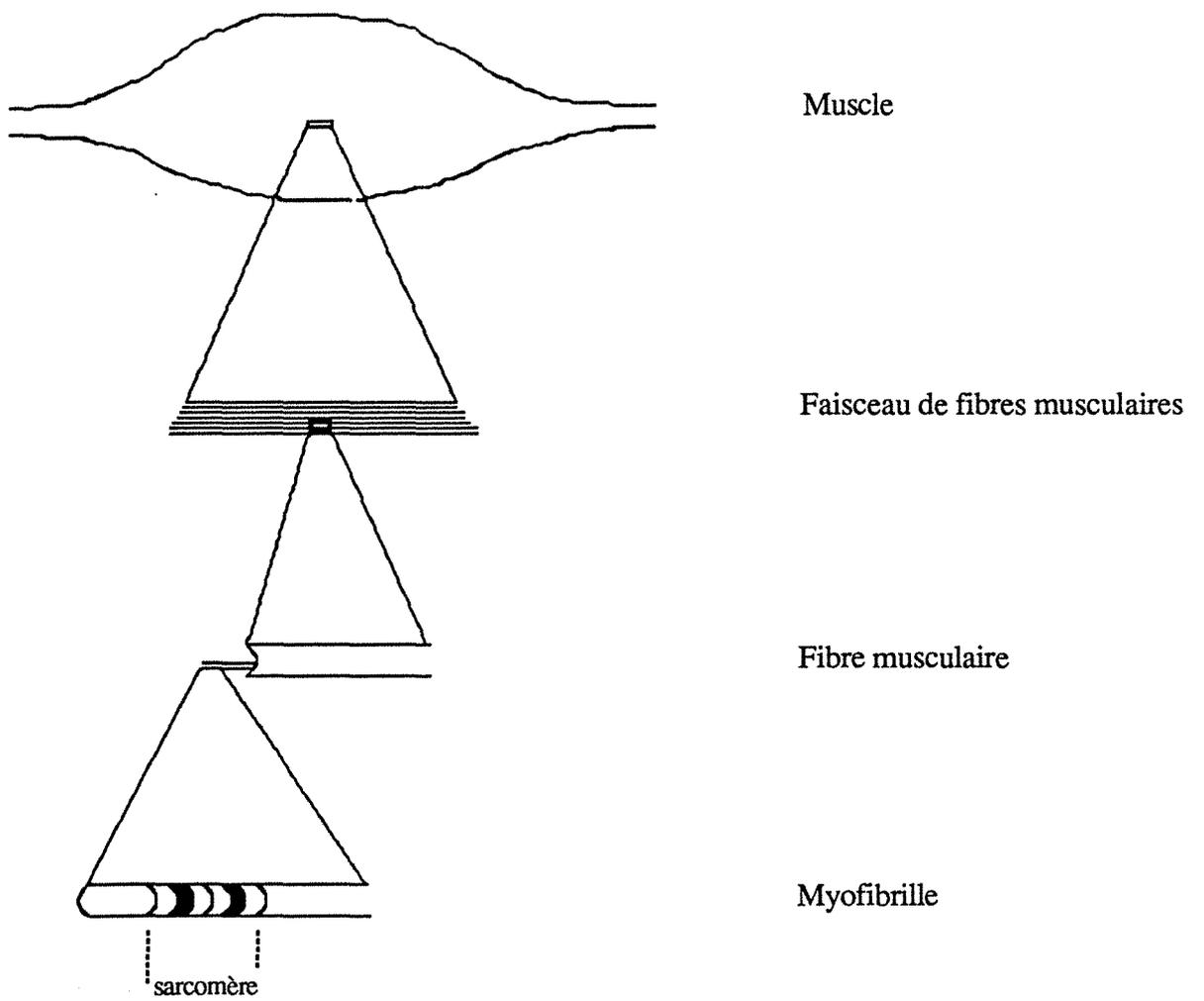


Figure 1 : Organisation générale du muscle  
(BOCCARD et VALIN, 1984)

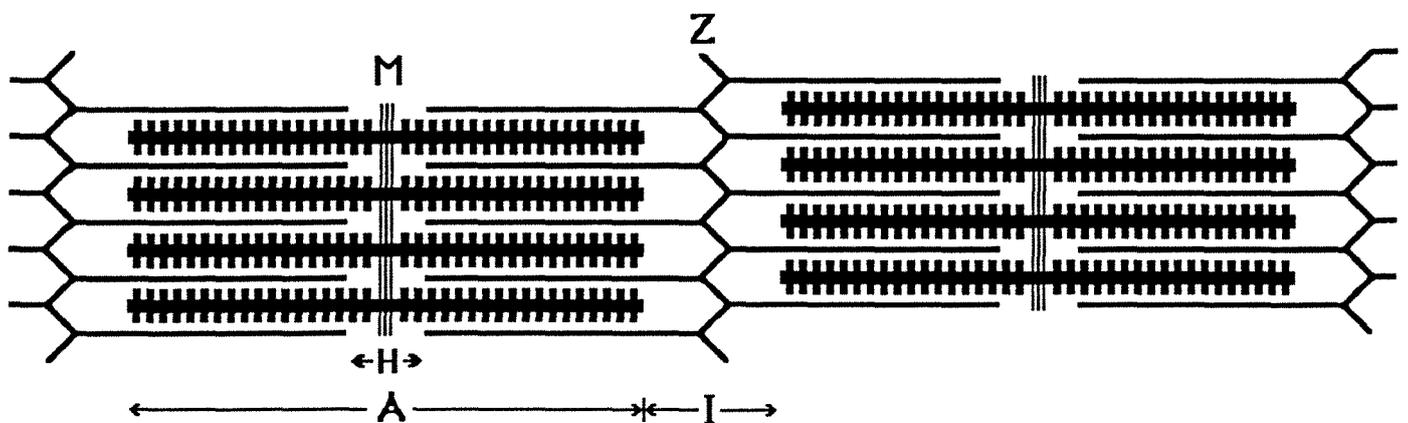


Figure 2 : Coupe longitudinale d'une myofibrille  
(OFFER, 1974)

# 1. TRANSFORMATIONS DU MUSCLE EN VIANDE

La viande est le produit de l'évolution post-mortem du muscle strié. Le tissu musculaire est un tissu très différencié et hautement spécialisé; c'est à son niveau que s'opère la transformation de l'énergie chimique en travail mécanique.

## 1.1. Structure et composition du muscle

### 1.1.1. Structure musculaire

#### 1.1.1.1. La fibre musculaire

Le muscle strié squelettique est formé de fibres musculaires insérées sur une charpente conjonctive. Les fibres musculaires striées sont des éléments fuselés de grande taille (10 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre et jusqu'à 30 cm de longueur), entourés d'une membrane épaissie, le sarcolemme. L'intérieur de la fibre est rempli en presque totalité par des fibres parallèles (les myofibrilles) qui sont groupées en fuseaux et présentent une striation transverse périodique à l'examen microscopique (figure 1). L'espace laissé vacant entre les myofibrilles est occupé par le sarcoplasme et les divers organites de la fibre.

Les myofibrilles occupent environ 80% du volume de la fibre musculaire. Chaque myofibrille est un long cylindre de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre sur plusieurs centimètres de longueur. La striation transversale périodique des myofibrilles provient de l'alternance de deux types de disques qui ne présentent pas la même réfringence à l'examen en microscopie optique: les disques A, anisotropes, et les disques I, isotropes. Chaque disque A présente, à mi-hauteur, une bande claire, la strie H, au milieu de laquelle se trouve la ligne M, plus sombre. Au milieu de chaque disque I se trouve une strie Z. Quel que soit l'état de contraction du muscle, la hauteur de chaque disque A reste constante alors que les disques I ont une hauteur variable.

L'unité contractile, appelée **sarcomère**, est formée d'un disque A et de deux demi-disques I qui lui sont adjacents; les stries Z partagent donc les myofibrilles en sarcomères (figure 2).

Dans la fibre, les myofibrilles sont maintenues par les éléments longitudinaux et transversaux du réticulum sarcoplasmique qui, en outre, jouent un rôle fondamental dans la régulation du taux de calcium libre de la cellule musculaire, contrôlant ainsi l'état de contraction des fibres.



### 1.1.2.2. Classification des fibres musculaires

Cette classification est basée sur les activités métabolique et contractile des fibres musculaires.

Selon que les fibres musculaires possèdent une voie catabolique oxydative du glucose prépondérante ou une voie anaérobie, on distingue des fibres "rouges" (fibres R), riches en mitochondries, en myoglobine et lipides, et des fibres blanches (fibres W), pauvres en mitochondries, en myoglobine et lipides, riches, par contre, en glycogène.

On distingue, par ailleurs, des fibres à vitesse de contraction rapide (fibres  $\alpha$ ) et des fibres à vitesse de contraction lente (fibres  $\beta$ ).

Des études histochimiques permettent la caractérisation de trois types de fibres:

- des fibres à métabolisme anaérobie dominant, pauvres en myoglobine et riches en enzymes de la glycolyse. Leur vitesse de contraction est élevée. Elles sont dites "blanches rapides" (fibres  $\alpha$ W).
- des fibres à métabolisme aérobie dominant. Riches en myoglobine et à contraction lente, elles sont dites "rouges lentes" (fibres  $\beta$ R).
- des fibres intermédiaires, à métabolisme mixte et contraction rapide. Ce sont des fibres "rouges rapides" (fibres  $\alpha$ R).

Dans leur très grande majorité, les muscles de porc contiennent ces trois types de fibres, mais en proportion variable. Selon le type de fibres dominant, les muscles seront considérés comme blancs rapides, intermédiaires ou rouges lents. Le tableau 1 indique les proportions des différents types de fibres observés par LEFAUCHEUR et VIGNERON (1986) dans trois muscles de porcs.

% de fibres	Muscle		
	Longissimus Dorsi	Psoas Major	Tibialis Cranialis
rouges lentes	11	27	34
rouges rapides	18	43	54
blanches rapides	71	30	12

Tableau 1 : Pourcentages des différents types de fibres dans trois muscles de porcs Large White à 100 kg de poids vif.  
(d'après LEFAUCHEUR et VIGNERON, 1986)

Les variations raciales du type métabolique sont bien connues (COOPER et al., 1969; MONIN et SELLIER, 1985; SELLIER et al., 1988). Pour les races élevées en France, les différences de type métabolique, estimées par des méthodes biochimiques, sont très limitées (SELLIER et al., 1988) à l'exception toutefois de la race Hampshire pour laquelle le très fort potentiel



glycolytique est associé à une tendance vers un type "rouge rapide" et une activité glycogène synthétase élevée (MONIN et al., 1986).

Le type métabolique évolue avec l'âge; très peu différencié à la naissance, il s'affirme au cours de la croissance (SUZUKI et CASSENS, 1980; LEFAUCHEUR et VIGNERON, 1986).

### 1.1.2. Composition du muscle (d'après ROSSET et ROUSSEL-GIOUARD, 1984)

La composition des muscles est variable entre animaux, et, chez un animal donné, d'un muscle à l'autre. On peut toutefois retenir comme ordre de grandeur la composition moyenne suivante rapportée au poids frais :

- eau	75%
- protéines	18,5%
- lipides	3%
- substances azotées non protéiques	1,5%
- glucides et catabolites	1%
- composés minéraux	1%

#### 1.1.2.1. L'eau dans le tissu musculaire

Les 75% d'eau contenue dans le muscle sont répartis entre 5 à 10 % d'eau liée et 90 à 95 % d'eau libre.

L'eau liée est fermement fixée par des liaisons hydrogène aux groupements fonctionnels hydrophiles des protéines du muscle sous forme d'eau d'hydratation. Elle est peu susceptible de subir des modifications à la suite de changements structuraux et ioniques des protéines (FERRER, 1982).

L'eau libre est associée aux substances dissoutes. Elle comprend l'eau immobilisée dans les espaces extracellulaires (20% de l'eau libre), l'eau retenue par les myofibrilles (70% de l'eau libre) en raison de la configuration des protéines musculaires et l'eau retenue par le réticulum sarcoplasmique (10% de l'eau libre). Les forces immobilisant l'eau libre sont induites par les tensions de surface (HAMM, 1986); plus précisément, l'eau est emprisonnée à l'intérieur du muscle par des forces capillaires générées par des pores, situés notamment entre les filaments épais et les filaments fins des myofibrilles (HERMANSSON, 1983).

#### 1.1.2.2. Les protéines musculaires

Les protéines du muscle se répartissent de la manière suivante:

- protéines extra-cellulaires (3%) (protéines du stroma): collagène, réticuline, élastine
- protéines intra-cellulaires:
  - protéines sarcoplasmiques (6%)
  - protéines myofibrillaires (9.5%)

Figure 3 : Structure d'une molécule de myosine. LMM: méromyosine légère. HMM-1: sous-unité 1 méromyosine lourde. HMM-2: sous-unité 2 méromyosine lourde (d'après SWATLAND, 1984)

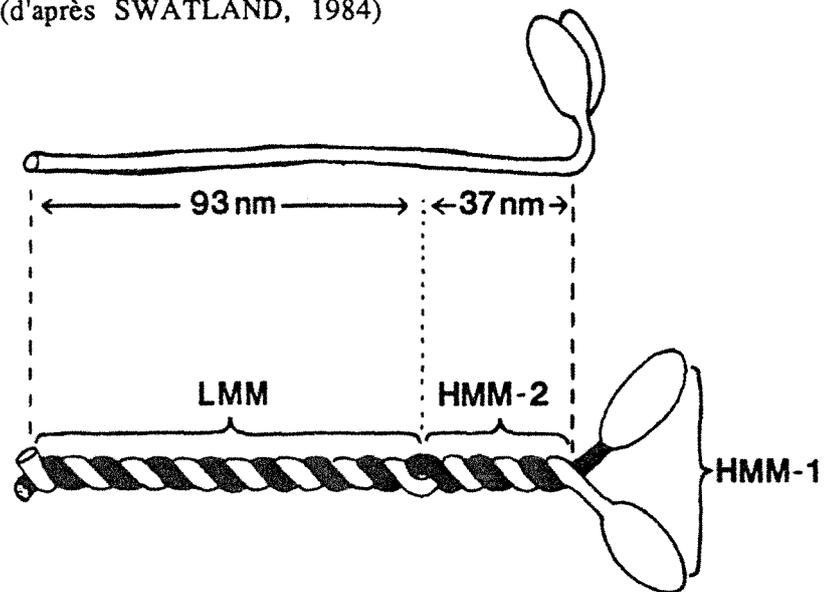


Figure 4 : Les protéines du filament fin (d'après ASGHAR et PEARSON, 1980)

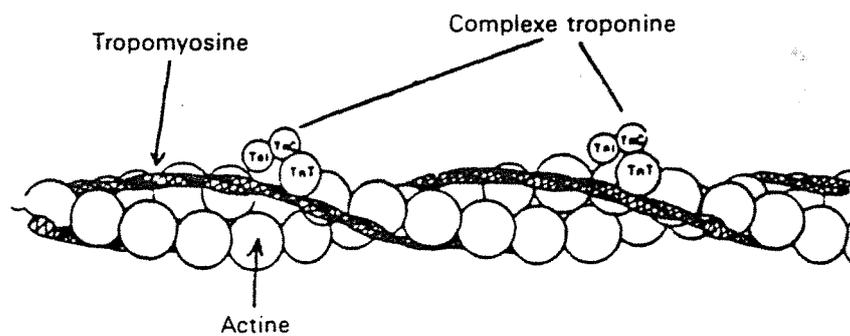
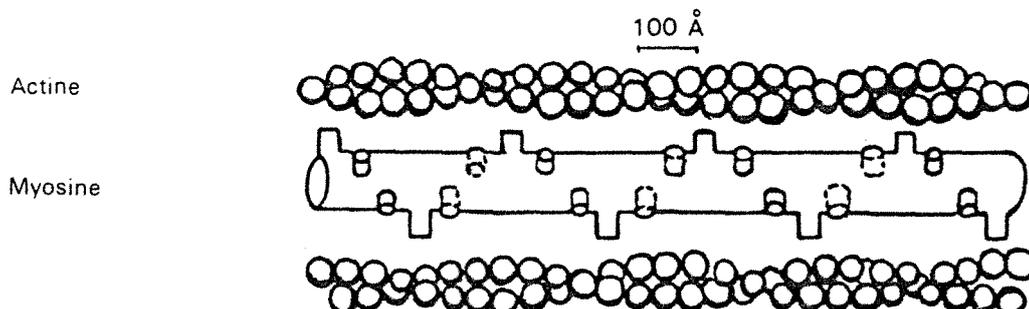


Figure 5 : Disposition des filaments de myosine et des filaments d'actine (d'après SWATLAND, 1984)



- protéines filamenteuses: actine, myosine
- protéines de régulation: tropomyosine, troponine, actinine, protéines de la ligne M, protéine C
- protéines insolubles de la strie Z (type collagène).

#### 1.1.2.2.1. Les protéines du stroma

Les protéines du stroma constituent les protéines les moins solubles du muscle. Cette fraction protéique musculaire contient les protéines du sarcolemme, du réticulum sarcoplasmique, des membranes mitochondriales ainsi que les protéines du tissu conjonctif (épimysium, périmysium, endomysium). Le tissu conjonctif contient des fibroblastes, des fibres de collagène, de réticuline et d'élastine et des substances de nature mucopolysaccharidique. Les protéines principales, collagène et élastine, représentent plus de 50% des protéines du stroma, leur proportion varie selon le muscle et selon l'animal.

#### 1.1.2.2.2. Les protéines sarcoplasmiques

Les protéines sarcoplasmiques sont des protéines solubles à des pH voisins de la neutralité et pour des forces ioniques inférieures à 0,1. Elles constituent 30 à 35% des protéines totales des muscles squelettiques. Il s'agit d'un ensemble hétérogène de protéines regroupant les enzymes de la glycolyse, la myoglobine et de nombreuses enzymes associées au métabolisme des glucides (cf. partie 3).

#### 1.1.2.2.3. Les protéines myofibrillaires

Les protéines myofibrillaires regroupent les protéines motrices et les protéines régulatrices.

##### - Les protéines motrices :

**La myosine** (5% du muscle frais) est une molécule de masse moléculaire élevée (460 000 D) formée de 4 (pour les muscles lents) ou 6 (pour les muscles rapides) sous-unités (figure 3):

- 2 chaînes lourdes (200 000 D) à structure d' $\alpha$ .hélice, enroulées l'une autour de l'autre sur leur plus grande longueur (queue hydrophobe) et formant une tête avec 2 prolongements globuleux à une extrémité (partie hydrophile).

- 2 ou 4 chaînes courtes (de 16 à 250 000 D chacune) situées au niveau de la tête.

La myosine possède une activité ATPasique calcium-dépendante, localisée dans la tête de la molécule, inhibée par le  $Mg^{++}$ . La myosine présente un ou deux sites de fixation de l'actine.

Le complexe actine-myosine (figure 5) possède une activité ATPasique  $Mg^{++}$ -dépendante.

**L'actine** (2%) est une protéine globulaire (actine G) de diamètre 5,5 nm, composée d'une chaîne de 376 acides aminés (41 785 D). C'est la protéine la plus abondante dans les filaments fins. En présence de sels neutres, les molécules d'actine G s'associent en un polymère fibreux



(actine F) formé de 2 brins torsadés l'un autour de l'autre. Une molécule d'actine G peut fixer un ion calcium et une molécule d'ATP. Lors de la polymérisation de l'actine G en actine F, chaque monomère rajouté nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, l'ADP formé restant fixé sur le monomère alors que le phosphate est libéré. La conformation de l'actine en filaments se retrouve au niveau des myofilaments fins où l'actine F forme la trame du filament. On compte environ 350 molécules d'actine G dans chaque filament fin.

- Les protéines régulatrices :

L'interaction entre la myosine et l'actine ne se produit que lors de la contraction musculaire. Il existe en effet des "inhibiteurs naturels" de l'interaction entre les protéines motrices dans un muscle au repos, à la condition que de l'ATP et des ions  $Mg^{++}$  soient disponibles. Les protéines régulatrices comportent:

- la **tropomyosine** formée de 2 chaînes identiques de masse moléculaire 32 000 D chacune. La molécule forme une fibre de 40 nm sur 2 nm; les diverses molécules sont placées bout à bout, dans les 2 gouttières dessinées par les polymères d'actine F (figure 4). L'agencement est tel que chaque molécule de tropomyosine n'établit des contacts qu'avec un seul des brins d'actine F; compte tenu de sa longueur, elle s'étale sur 7 monomères d'actine. A chaque myofilament fin sont associées environ 50 molécules d'actine.

- la **troponine** (Tn)(0,5%), protéine globulaire (80 000 D) formée de 3 sous-unités polypeptidiques dont les propriétés sont différentes:

- la Tn-C (18 000 D) peut lier 4 ions  $Ca^{++}$  très fortement ce qui entraîne un changement de conformation.

- la Tn-I (23 000 D) est la sous-unité inhibitrice; elle comporte un site de reconnaissance spécifique de l'actine et c'est sa présence qui empêche l'interaction de la tête de la myosine avec l'actine.

- la Tn-T (30 500 D) est la sous-unité qui fixe l'ensemble troponine à la tropomyosine. Chaque molécule de troponine est fixée au filament d'actine par l'intermédiaire d'un site de liaison spécifique de l'actine, et à la tropomyosine par l'intermédiaire d'un autre site.

- l' **$\alpha$ .actinine** (102 000 D) (0,2%) et la  **$\beta$ .actinine** (70 000 D) (0,1%), de composition en acides aminés voisine de celle de l'actine. Elles semblent intervenir au niveau de la liaison entre filaments fins et stries Z.

- la **protéine M** (0,4%), de poids moléculaire 140 000 D, qui semble constituer la bande M du sarcomère.



- la **protéine C** (0,2%), de poids moléculaire 160 000 D, plus riche en proline que les autres protéines myofibrillaires; elle favoriserait les liaisons entre l'actine et la myosine.

- les **protéines insolubles des stries Z**. Les stries Z sont de nature conjonctive, de type collagène; leur composition est imprécise.

### 1.1.2.3. Les lipides musculaires

Les lipides musculaires sont de deux types:

- les lipides de constitution, essentiellement les phospholipides, caractérisés par leur richesse en acides gras poly-insaturés essentiels.

- les lipides de réserve sont essentiellement composés de triglycérides (97-99%), d'un faible pourcentage d'acides gras libres et d'une fraction insaponifiable comprenant des esters de cholestérol et des résidus de stéroïdes.

La composition des graisses de porc est caractérisée par leur teneur en acides gras et leur degré d'insaturation. Les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique représentent à eux seuls 90% des acides gras totaux dans le gras dorsal (SMITHARD et al., 1980); le pourcentage d'acides gras insaturés (60%) est spécifique de l'espèce porcine. La composition en acides gras varie avec la localisation anatomique, la race, le sexe, l'alimentation et l'environnement.

### 1.1.2.4. Les glucides musculaires

Le potentiel glycolytique est représenté essentiellement par la teneur en glycogène. Ce potentiel varie en fonction du type métabolique du muscle et de la race.

Parmi les races utilisées en France, le Hampshire possède un potentiel glycolytique plus élevé que le Landrace Belge et le Large White (MONIN et SELIER, 1985; MONIN et SELIER, 1987).

Les porcs Hampshire présentent une autre particularité de composition: le rapport eau/protéines dans leurs muscles est supérieur de 6 à 10% à celui observé chez les autres races (BARTON-GADE, 1986; MONIN et al., 1986).

Après l'abattage, le muscle passe successivement par trois états différents qui sont l'état pantelant, l'état rigide et l'état mûré.

Dans les secondes qui suivent l'abattage, la musculature demeure excitable pendant une courte durée correspondant au temps de survie du système nerveux. Cette phase d'excitabilité est désignée sous le terme d'état pantelant, encore mal caractérisé.

Cette étape est suivie par la phase d'installation de la rigor mortis ou rigidité cadavérique qui conduit à l'acidification et à la perte d'élasticité du tissu musculaire dont la dureté est alors



maximale. Vient ensuite la phase de maturation correspondant à l'amélioration de la tendreté de la viande. Les processus de la maturation commencent en réalité dès la mort de l'animal (JOSEPH et CONNOLLY, 1977), ils deviennent plus marqués après la phase de rigidité cadavérique.

## 1.2. La rigor mortis

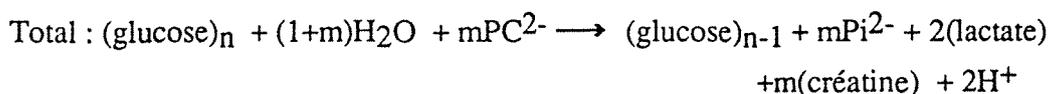
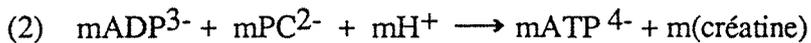
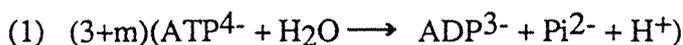
### 1.2.1. Modifications biochimiques

L'abattage entraîne un bouleversement du métabolisme musculaire. En effet, les mécanismes de conservation de l'homéostasie continuent de fonctionner, donc la consommation basale d'ATP persiste; mais l'arrêt de la circulation sanguine supprime l'apport d'oxygène et de nutriments. Dès la fin de la saignée, le muscle dépend exclusivement de ses réserves énergétiques pour le maintien de son homéostasie. L'arrêt de la circulation sanguine prive le muscle de l'oxygène indispensable à la respiration cellulaire; le potentiel d'oxydo-réduction passe d'environ +250 à -50 mV; la dégradation des nutriments, jusqu'alors essentiellement aérobie, n'est plus possible que par un processus anaérobie: la glycolyse.

Le glycogène devient de loin la principale source d'énergie du muscle, puisqu'il en existe plusieurs dizaines de  $\mu$ moles par gramme de tissu à la fin de la saignée chez les animaux abattus en bon état physiologique, contre quelques  $\mu$ moles seulement de phosphocréatine.

L'ATP musculaire est hydrolysé par la myokinase, et plus lentement par une ATPase sarcoplasmique, avec production d'ADP, de phosphate et libération d'un proton. Cependant, dans les premiers instants après l'abattage, le taux d'ATP reste sensiblement constant car l'ADP formé est rephosphorylé soit par la phosphocréatine soit par la voie glycolytique.

Immédiatement après la mort, l'ensemble des réactions biochimiques peut s'écrire ainsi, selon BENDALL (1973):



m serait de l'ordre de 1,5, ce qui signifie que le tiers environ de l'ATP resynthétisé pendant cette période l'est à partir de la phosphocréatine.

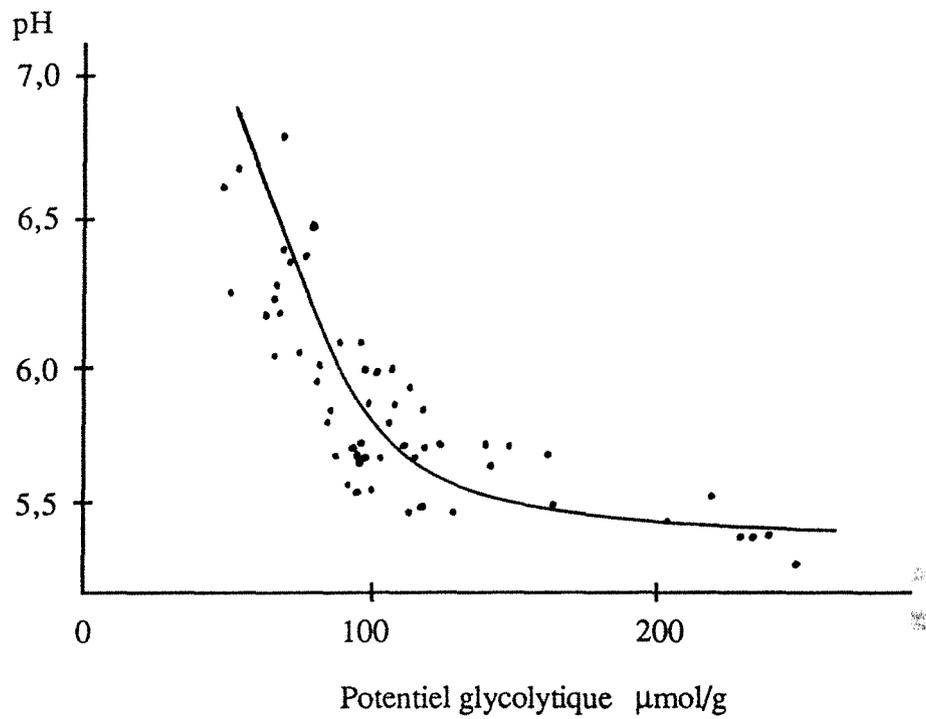
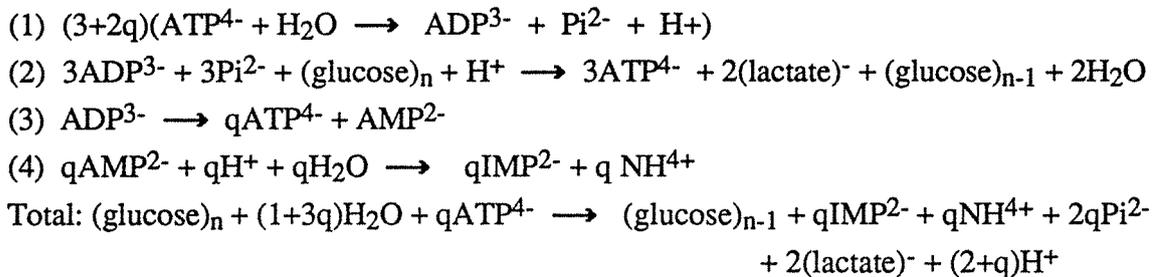


Figure 6 : Relation entre le potentiel glycolytique et le pH ultime pour le muscle semitendineux de porc (MONIN, 1988)  
 Le potentiel glycolytique exprime le potentiel de production d'acide lactique, il est calculé par la formule suivante:  

$$PG = 2 [ (\text{glycogène}) + (\text{glucose}) + (\text{glucose 6.phosphate}) ] + (\text{lactate})$$

Ces réactions permettent une resynthèse efficace de l'ATP, et le taux de celui-ci se maintient tant qu'il reste de la phosphocréatine. Quand la phosphocréatine est épuisée, le taux d'ATP musculaire diminue rapidement car la glycolyse est un mécanisme de synthèse d'ATP assez peu performant: chaque molécule de glucose dégradée fournit seulement 2 molécules d'ATP, contre 38 en conditions aérobies.

Les réactions biochimiques résultantes peuvent alors être schématisées comme suit :



La réaction (3) fournirait environ 10% de l'ATP.

L'acide lactique provenant de la glycolyse s'accumule dans le tissu musculaire. Pour chaque molécule de lactate produite, le système libère un proton. L'acidification du muscle se poursuit jusqu'à une valeur ultime (pHu). La glycolyse cesse:

- soit par disparition de l'AMP, nécessaire comme cofacteur d'enzymes de la glycogénolyse (SCOPES,1971). Le pH se stabilise alors à des valeurs très variables selon le muscle, en présence d'une quantité parfois importante de glycogène résiduel. Chez le porc, ces valeurs sont de 5,4 à 5,7 dans la plupart des muscles.
- soit par carence en glycogène dégradable. Dans ce cas, le pH se stabilise à des valeurs plus élevées que précédemment. La relation entre le potentiel glycolytique et le pH ultime dans le muscle semitendineux est présentée figure 6.
- soit par inhibition des enzymes de la glycolyse et de la glycogénolyse, en particulier la phosphorylase, par l'abaissement du pH musculaire, ce qui justifierait l'arrêt de la glycolyse avant que le glycogène ne soit totalement épuisé.

L'évolution post-mortem du pH peut être caractérisée par sa **vitesse** et son **amplitude**:

- la vitesse est directement proportionnelle à l'activité ATPasique. Tout facteur modifiant l'activité ATPasique entraîne un changement similaire de la vitesse de diminution du pH (BENDALL,1973).
- l'amplitude est mesurée par le pH ultime puisque le pH musculaire avant l'abattage est à peu près constant et proche de la neutralité. Elle est proportionnelle pour un muscle donné à la quantité de glycogène dégradé.



Chez le porc, la vitesse de diminution du pH peut varier de 1 à 10, ce qui distingue cette espèce des autres animaux de boucherie.

### 1.2.2. Modifications physiques.

La chute du taux d'ATP accompagnée d'une perte de capacité de rétention du calcium des membranes intracellulaires provoque la fixation irréversible de l'actine et de la myosine qui forment ainsi l'actomyosine. Cette liaison reste stable, la concentration en ATP étant trop faible pour la rompre. Le muscle perd progressivement son élasticité jusqu'à devenir totalement rigide.

L'entrée en rigor s'accompagne en général d'une contraction dont l'intensité dépend de la température: elle est minimale si l'entrée en rigor se produit vers 10°C (HONIKEL et KIM, 1986).

Du vivant de l'animal, le principal mécanisme d'évacuation des calories produites dans le tissu musculaire par voie métabolique est représenté par la circulation sanguine. Avec la mort, ce mécanisme s'arrête. Il en résulte une augmentation localisée de la température. L'évolution de cette dernière dépend de l'équilibre entre la production de chaleur par le métabolisme et sa dissipation liée aux conditions d'environnement, mais aussi des caractéristiques de la carcasse et de la localisation du muscle. La production de chaleur est d'autant plus marquée que la chute du pH est rapide, c'est-à-dire que l'activité ATPasique est plus élevée.

## 1.3. La maturation

### 1.3.1. Modifications physiques

L'observation en microscopie électronique de la viande en cours de maturation révèle des modifications au niveau de la strie Z et au niveau de la jonction disque I / strie Z. Les stries Z deviennent de plus en plus diffuses et peu à peu des zones de rupture apparaissent à la jonction filaments fins / stries Z. Ces modifications se traduisent par une augmentation de l'indice de fragmentation myofibrillaire (IFM) (KOOHMARAIIE et al., 1986). L'augmentation de l'IFM au cours de la maturation est proportionnelle à l'augmentation de la tendreté.

### 1.3.2. Mécanismes biochimiques de la maturation

Le processus de maturation des viandes met en jeu deux types de mécanismes fortement dépendants de la température et agissant de façon synergique. Ceux-ci sont désignés sous le vocable de mécanismes enzymatiques pour les premiers et physico-chimiques pour les seconds.



Les modifications intervenant au cours de la maturation entraînent une amélioration de la tendreté et affectent principalement la structure myofibrillaire. Seule l'évolution des protéines myofibrillaires sera traitée dans ce paragraphe, les protéines sarcoplasmiques faisant l'objet de modifications moindres seront traitées ultérieurement.

### 1.3.2.1. Mécanismes enzymatiques

Les systèmes protéolytiques intracellulaires jusque-là identifiés au niveau du tissu musculaire sont au nombre de trois (tableau 2). Ce sont :

- les protéinases neutres calcium dépendantes, encore appelées calpaïnes, actives à pH neutre.
- les protéinases lysosomales souvent désignées sous le nom de cathepsines (cathepsines B, D, L et H) actives dans une gamme de pH comprise entre 4,0 et 6,0.
- le prosome ou protéasome, complexe multicatalytique récemment découvert et encore très mal connu (RIVETT, 1989; GOLL et al., 1989).

Protéines musculaires	Localisation cellulaire	pH optimal	Facteurs de régulation
Calpaïnes	Cytosol	7,0	pH calcium Inhibiteurs
Cathepsines	Lysosomes	4,0/6,0	Libération Inhibiteurs
Protéasome	???	6,0/8,0	pH ? Inhibiteurs

Tableau 2 : Systèmes d'enzymes protéolytiques intramusculaires susceptibles d'être impliqués dans le processus de maturation des viandes et facteurs limitants de leur expression (OUALI, 1990)

#### 1.3.2.1.1. Les protéases calcium-dépendantes

Le système protéolytique calcium-dépendant est composé de 2 protéases structurellement différentes, provenant très probablement de 2 gènes séparés (EMORI et al., 1986). Ce sont des métalloprotéases présentes à faible concentration dans le muscle et dont le pH optimal est proche du pH physiologique; on parle de Calcium Activated Factor (CAF) ou de Calcium Activated Neutral Protease (CANP). Ces enzymes, aussi appelées calpaïnes par MURACHI et al. (1981) sont la calpaïne I, active en présence de concentrations micromolaires de calcium, et la calpaïne II, active en présence de concentrations millimolaires de calcium. En présence du cation  $Ca^{2+}$ , les 2 formes s'autolysent, ce processus conduisant à augmenter l'affinité pour le calcium; il en résulte un accroissement de leur activité à des concentrations physiologiques en calcium (SUZUKI, 1987). Ce système possède de plus un inhibiteur hautement spécifique, la calpastatine (OKITANI et al., 1976; WAXMAN, 1978; OTSUKA et



GOLL, 1980; MURACHI et al., 1981). La liaison calpastatine-calpaïne est aussi calcium-dépendante mais probablement pour des concentrations en calcium plus élevées que celles nécessaires à l'activation des calpaïnes. L'activité des calpaïnes peut donc être contrôlée à plusieurs niveaux mais le fonctionnement de ces processus de régulation complémentaires et interactifs n'est pas encore bien compris (KAPPRELL et GOLL, 1989).

**In vitro**, le CAF dégrade rapidement les disques Z (GOLL et al., 1983 a et b; OUALI et VALIN, 1976; CHENG et PARRISH, 1977; PENNY, 1980; DAYTON et al., 1981) et, plus lentement, la ligne M (DAYTON et al., 1976). Au niveau moléculaire, l'incubation d'un échantillon de viande en présence de CAF montre que ce dernier dégrade : la troponine T, et plus lentement la troponine I (la disparition de la troponine T s'accompagne de l'apparition d'un composé de poids moléculaire 30 000D), la tropomyosine, la desmine, la protéine C et la protéine de la ligne M, mais est sans action sur la troponine C, l' $\alpha$ .actinine (DAYTON et al., 1975; OLSON et PARRISH, 1977; GOLL et al., 1983b) et l'actine (CHENG et PARRISH, 1977; PARRISH, 1978; PENNY, 1980; ELGASIM et al., 1985).

L' $\alpha$ .actinine n'est pas dégradée par le CAF, mais se retrouve en solution après un stockage prolongé, probablement à la suite de l'attaque de certaines protéines de structure au niveau de la strie Z, telles que la desmine.

Bien que l'on ait observé que le CAF reproduisait fidèlement les modifications observées dans le muscle au cours de la maturation, le degré d'activité de ce système enzymatique *in situ* reste à préciser.

Le pH optimal d'activité du CAF est compris entre 7 et 7,5. Entre pH 5,5 et 5,9 -gamme correspondant aux pH ultimes de la viande- on observe une activité de 15 à 25% de l'activité maximale, ce qui devrait correspondre à un degré d'activité suffisant pour permettre les modifications observées au cours de la maturation (PENNY, 1980; SUZUKI et al., 1982).

En ce qui concerne la concentration en ions  $Ca^{2+}$ , l'activité maximale est obtenue pour une concentration élevée en  $Ca^{2+}$ , de 1 à 5 mM (CHENG et PARRISH, 1977; PENNY, 1980). Pour une concentration de 0,5 mM, l'activité est abaissée à environ 25% et pour une concentration de 0,3 mM à 5%.

**In vivo**, après l'abattage, la régulation du calcium par les membranes sarcoplasmiques et mitochondriales est déficiente, la concentration en ions  $Ca^{2+}$  libres peut atteindre alors environ 0,5 mM. A cette concentration, et pour un pH d'environ 5,5, le CAF conserverait une activité égale à 5% de son activité maximale.

Le CAF se trouve en solution dans le sarcoplasme à la concentration d'environ 1mg/1000g de muscle frais (GOLL et al., 1974). Il a été localisé de façon plus précise au niveau de la strie Z, ce qui rend son intervention vraisemblable dans la dégradation de cette structure. Mais il a été

CATHEPSINE	TYPE	Gpt fonctionnel site actif	P.M g/mole	PI	pH opt	autres propriétés
Cathepsine B (Barrett, 1977a)	endopeptidase	SH	24k	5,0/5,2	4,0/6,5	nécessite EDTA et groupes réduits SH
Cathepsine D (Barrett, 1977b)	endopeptidase	COOH	42k	5,5/6,5	2,5/5,0	glycoprotéine
Cathepsine H (Schwartz, Barrett, 1980)	endopeptidase aminopeptidase	SH	28k	7,1	5,5/6,5	glycoprotéine thermostable
Cathepsine L (Kirschke et al., 1981)	endopeptidase	SH	24k	5,8/6,1	3,0/6,5	très labile à l'autolyse

Tableau 3 : Caractéristiques des cathepsines

également trouvé à proximité du sarcolemme, ce qui pourrait vouloir dire que le CAF agit aussi sur les protéines de la membrane cellulaire (DAYTON et al., 1981).

#### 1.3.2.1.2. Les enzymes lysosomales

Il existe, au sein de la fibre musculaire squelettique, 7 sortes d'enzymes lysosomales: les cathepsines A,B,C,D,H,L et la carboxypeptidase B. Les cathepsines B et D sont les plus impliquées dans la dégradation post-mortem des protéines, bien que les cathepsines H et L semblent également capables d'hydrolyser les protéines myofibrillaires (DAYTON et al., 1981).

Les propriétés de ces protéases sont rassemblées tableau 3.

**In vitro**, à pH 5,2, la cathepsine B dégrade la myosine en un fragment principal de 150kD qui semble résister aux dégradations ultérieures, et en plusieurs fragments de 10 à 50kD (SCHWARTZ et BIRD, 1977). A pH 4,0, la cathepsine D dégrade la myosine plus rapidement que la cathepsine B en formant deux fragments de 110 et 107,5kD et plusieurs petits fragments (ZEECE et al., 1986a; OUALI et al., 1987).

Les cathepsines B et D dégradent l'actine à pH 5,0; la cathepsine D, la plus active, est responsable de la formation des fragments de 35 et 12kD (SCHWARTZ et BIRD, 1977).

Les cathepsines B et D n'ont pas d'effet sur la myosine à des pH supérieurs à 6,0.

Les troponines T et I sont aussi dégradées par la cathepsine D (MATSUMOTO et al., 1983; ELGASIM et al., 1985; ZEECE et al., 1986a). La dégradation de la tropomyosine n'est observée qu'à faible pH. La cathepsine D hydrolyse aussi la titine (WANG et al., 1979) et la connectine (MARUAYAMA et al., 1980).

Les cathepsines H et L, découvertes en 1976, ont un pouvoir de dégradation de la myosine très important; la cathepsine L dégrade aussi l'actine en produisant des fragments de 40, 37 et 30kD (MATSUKURA et al., 1981). Toutefois les effets de ces enzymes restent à préciser.

Le mode d'action **in vivo** des cathepsines n'est pas encore bien connu.

Les lysosomes font partie du réticulum sarcoplasmique (BIRD et al., 1978,1980); ils prédominent dans la portion du réticulum associé à la bande I (STAUBER, 1981).

Il a été montré (DUTSON et LAWRIE, 1974) que les membranes lysosomales sont dégradées à la suite de l'établissement de la rigor, ce qui permet la libération d'un certain nombre d'enzymes parmi lesquelles on a identifié la  $\beta$ galactosidase, la glucuronidase, la ribonucléase acide, la cathepsine C : on obtient, dans un homogénat de viande, une activité maximale du surnageant au bout de 4-5 jours (ONO, 1971; PENNY, 1980). Bien que la libération des cathepsines B et D n'ait pas été confirmée, il est vraisemblable qu'elles se comportent comme les autres enzymes. Après un cycle de congélation-décongélation, qui altère les membranes



cellulaires et favorise les contacts enzymes-substrats-activateurs, la maturation est plus rapide (WINGER et FENNEMA, 1976).

DAYTON et al.(1981) avancent que les cathepsines ne seraient pas libérées dans le sarcoplasme mais qu'elles agiraient à l'intérieur des lysosomes alors que les protéines, partiellement dégradées, seraient absorbées par ces mêmes lysosomes.

L'activité optimale de ces enzymes se situe en zone acide. La cathepsine B présente un pH optimal d'action de 5,2 dans le cas où la réaction enzymatique a pour substrat la myosine; Cette activité est d'environ 50% à pH 5,6 et de 20% à pH 6,0. Le pH optimal pour la cathepsine D est plus bas (pH 4), mais à pH 5,5, elle conserve une activité de 30% (PENNY, 1980). Cela signifie que, pour un pH égal au pH ultime, l'activité de ces enzymes est conservée. Cependant, au cours d'une maturation normale à basse température, on n'observe pas de dégradation de la myosine. Par contre, le fait d'élever la température à 25 ou 35°C fait apparaître des composés de dégradation de la myosine (PENNY, 1980).

#### 1.3.2.2. Mécanismes physico-chimiques

Les modifications physico-chimiques dont le muscle est le siège post-mortem et qui sont susceptibles d'affecter le déroulement de la maturation sont le pH et la pression osmotique. Selon la vitesse et l'amplitude de chute du pH, la maturation peut être affectée positivement ou négativement (MARSH et al., 1988).

Concernant la pression osmotique, son augmentation après la mort est connue depuis le début du siècle mais n'a pu être quantifiée avec précision que très récemment en raison de l'absence de méthodes de mesures simples. Par analyse enthalpique différentielle, il a été montré que l'osmolarité croît au cours de la phase d'installation de la rigidité cadavérique pour atteindre, à la fin de cette phase, des valeurs (500-600mOSmoles) presque deux fois plus élevées que les valeurs physiologiques (270-300mOSmoles) (OUALI, 1990). Ceci correspond à des forces ioniques voisines de 0,25/0,30, équivalentes à des concentrations en NaCl de 0,25/0,30M, forces ioniques suffisantes pour causer des dommages importants au niveau de la structure contractile et faciliter ainsi l'action des protéases endogènes. Cette évolution de l'osmolarité varie avec le type de muscle, la valeur finale atteinte augmentant avec la vitesse de contraction de ces derniers, elle dépend également de la température.

Cible	Effets du CAF // Evolution post-mortem de la tendreté
Ultrastructure	Dégradation du disque Z (1, 2, 3, 4) Dégradation de la ligne (2, 3)
<u>Filaments protéiques</u> Actine-Myosine	Actine et myosine non dégradées (2, 5, 6, 7) Dégradation de la troponine T (2, 5, 7)
Desmine	Dégradation de la desmine (2, 8, 9, 10)
Titine	Dégradation calcium-dépendante de la titine augmente la tendreté (12,16) → Ca <sup>2+</sup> nécessaire à l'activation du CAF (11)
Activité ATPasique	L'action du CAF et le stockage p.m augmentent l'activité ATPasique (13,14,15)
	Une concentration élevée en CAF conduit à une amélioration de la tendreté (4,5,17)

Tableau 4 : Parallèle entre les effets du CAF et l'évolution post-mortem de la tendreté

(1) : DAYTON et al., 1975

(2) : DAYTON et al., 1976

(3) : HENDERSON et al., 1970

(4) : OLSON et al., 1976

(5) : OLSON et al., 1977

(6) : PENNY, 1980

(7) : SAMEJIMA et WOLFE, 1976

(8) : O'SHEA et al., 1979

(9) : ROBSON et al., 1981

(10) : YOUNG et al., 1981

(11) : TAKAHASHI et SAITO, 1979

(12) : LOCKER et al., 1977

(13) : OUALI et VALIN, 1980

(14) : IKEUCHI et al., 1980

(15) : SUZUKI et GOLL, 1974

(16) : ZEECE et al., 1986b

(17) : GOLL et al., 1974

### 1.3.3. Evolution de la structure myofibrillaire

La synthèse bibliographique précédente concernant les mécanismes de la maturation fait ressortir:

- une destruction progressive de l'image des stries Z en même temps que l'exclusion de l' $\alpha$ .actinine (KOOHMARAIE et al., 1983; BECHTEL et PARRISH, 1983).
- un affaiblissement des interactions entre protéines accompagné d'une évolution des propriétés de solubilité du système.
- une attaque protéolytique d'un composé du filament fin, la troponine T (OLSON et al., 1977; PARRISH et al., 1981) avec production d'un fragment de PM 30 000 D (McBRIDE et PARRISH, 1977; OLSON et al., 1977; PARRISH et al., 1981).

Il résulterait de l'ensemble de ces modifications une fragilisation progressive de la structure myofibrillaire liée à l'augmentation de la tendreté.

L'exclusion de l' $\alpha$ .actinine de la structure myofibrillaire résulterait d'une attaque du CAF, non au niveau de la strie Z, mais plus probablement au niveau du filament fin (troponine T), ce qui entraînerait un affaiblissement de la liaison entre ces filaments et la strie Z ainsi que le relargage d' $\alpha$ .actinine.

La plupart des modifications semblent imputables au CAF, à hauteur de 90% d'après GOLL et al. (1983b) (tableau 4). Il y a peu de preuves que les cathepsines affaiblissent les myofibrilles, par ailleurs déjà affaiblies par les protéases neutres. L'hypothèse d'une complémentarité d'action au niveau des filaments fins des enzymes lysosomales et du CAF peut cependant être avancée. Cette hypothèse d'intervention des cathepsines dans le mécanisme de la maturation est confortée par l'existence d'une corrélation significative mais pas très étroite ( $r = 0,47$ ) entre la vitesse de maturation et le taux des enzymes lysosomales libres.

L'analyse fine de l'influence de la température et du pH sur la vitesse de ces transformations pour des maturations plus ou moins longues permettrait sans doute d'améliorer la compréhension des mécanismes de cette évolution, et en particulier d'apprécier la participation respective des deux systèmes enzymatiques.

Consommateur	<ul style="list-style-type: none"> <li>- présentation : couleur rose homogène, tenue</li> <li>- qualités organoleptiques : jutosité, tendreté, saveur</li> <li>- qualités hygiéniques et nutritionnelles : fraîcheur, faible teneur en gras</li> <li>- faibles pertes à la cuisson</li> </ul>
Transformateur	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aptitudes technologiques : rendement cuisson, aptitude au salage</li> <li>- carcasses peu grasses, gras de bonne qualité</li> <li>- homogénéité des lots de production</li> </ul>
Distributeur	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bonne conservabilité</li> <li>- bonne présentation : couleur, tenue</li> </ul>

Tableau 5 : Exigences des utilisateurs de viande de porc

## **2. LA QUALITE DE LA VIANDE DE PORC**

### **2.1. Définition de la qualité de la viande**

La qualité d'un produit alimentaire est une notion en partie subjective puisque le principal instrument d'évaluation est l'utilisateur.

La Qualité, définie par les Normes Européennes (ISO 9 002) représente "l'ensemble des caractéristiques d'un produit (ou d'un service) qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites".

La difficulté de définition de la qualité de la viande réside dans la diversité de ses utilisateurs. Les caractéristiques varient selon le type d'utilisateurs: consommateurs, transformateurs et distributeurs (tableau 5).

La viande de porc est consommée, en France, pour environ un tiers sous forme de viande fraîche et pour deux tiers sous forme de produits transformés, dont la diversité dépend autant des modes de fabrication que de la présentation et des qualités organoleptiques.

On comprend, sous le terme de qualité de la viande, les propriétés hygiéniques, diététiques, organoleptiques et technologiques de la viande. Les qualités organoleptiques regroupent l'aspect, la couleur, la texture (tendreté, jutosité) et la saveur, tandis que les qualités technologiques conditionnent l'aptitude à la transformation de la viande. Ce rapport ne traitera que des qualités technologiques du tissu maigre.

### **2.2. Caractéristiques de la qualité technologique du tissu maigre**

Trois caractéristiques majeures conditionnent l'aptitude à la transformation de la viande, et par conséquent, le rendement économique des différents process industriels: la couleur, le pouvoir de rétention d'eau et la conservabilité.

#### **2.2.1. La couleur**

La couleur perçue par l'observateur résulte de 3 critères principaux:

- la quantité de pigment



- la forme chimique du pigment. La myoglobine peut, en effet, exister sous 3 formes selon son état d'oxygénation ou le degré d'oxydation de l'atome de fer qu'elle contient :
  - myoglobine réduite, fer à l'état ferreux  $Mb(Fe^{2+})$  : rouge pourpre
  - myoglobine oxygénée (oxymyoglobine), fer à l'état ferreux  $MbO_2(Fe^{2+})$ : rouge vif
  - metmyoglobine, fer à l'état ferrique  $Mb(Fe^{3+})$  : brune
- la quantité de lumière réfléchiée par la surface de coupe du muscle, directement dépendante de la structure musculaire.

La forme chimique définit la teinte. Le taux de pigment et la quantité de lumière réfléchiée conditionnent l'intensité de la couleur. Le taux de pigment dépend de facteurs zootechniques tels que la race et l'âge; il peut varier en fonction des conditions d'élevage.

### 2.2.2. Le Pouvoir de Rétention d'Eau

Le pouvoir de rétention d'eau (PRE) exprime la capacité du muscle à lier l'eau sous différentes conditions.

La quantité d'eau libre immobilisée temporairement à l'intérieur du réseau protéique est influencée par:

- la structure spatiale des protéines des fibres musculaires. Si ce réseau est resserré, la quantité d'eau libre immobilisée diminue, donc la quantité d'eau extractible augmente. Le relâchement de la structure provoque les effets inverses. Ces changements de structure dépendent de la configuration des protéines, de leur charge et de la plus ou moins grande stabilité des ponts existant entre les chaînes protéiques adjacentes (GOUSSAULT et GOUTEFONGEA, 1978; ZERT et POLACK, 1982).

Le pouvoir de rétention d'eau est directement lié à la présence des groupements fonctionnels polaires des protéines musculaires. Schématiquement, il augmente à la suite d'un mouvement de séparation des filaments d'actine et de myosine: l'actomyosine se dissocie et libère des groupements polaires qui s'hydratent intensément (COOH,  $NH_2$ , OH, SH, NH) (FERRER, 1982).

- les groupements chargés des protéines qui fixent fermement un certain nombre de molécules d'eau (ZERT et POLACK, 1982).

Le PRE est donc influencé par tout facteur modifiant la structure du réseau myofibrillaire et/ou la charge des protéines.

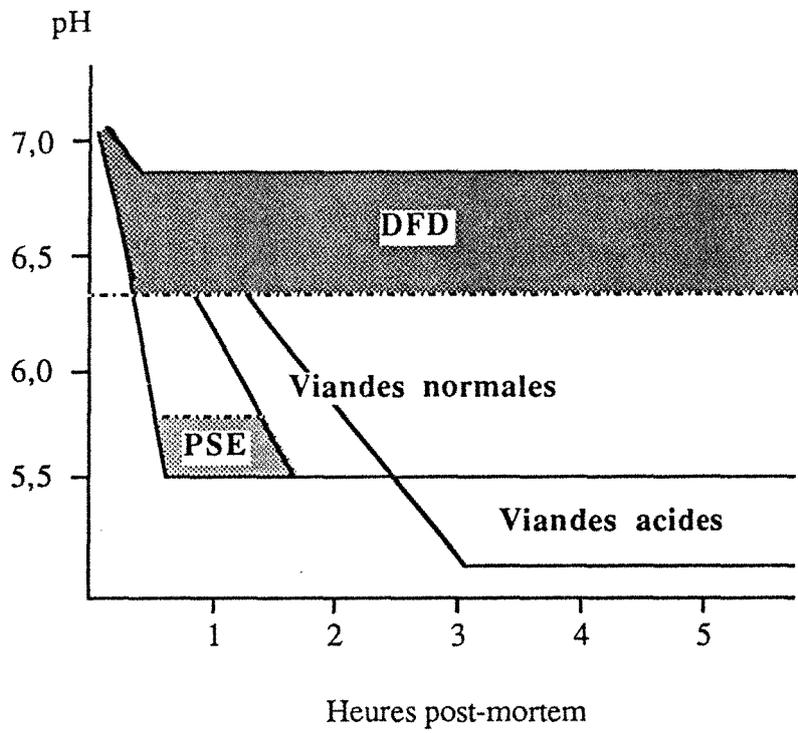


Figure 7 : Qualités technologiques de la viande en fonction de l'évolution post-mortem du pH musculaire (extrait de la thèse de A.R. MEJENES-QUIJANO, 1986)

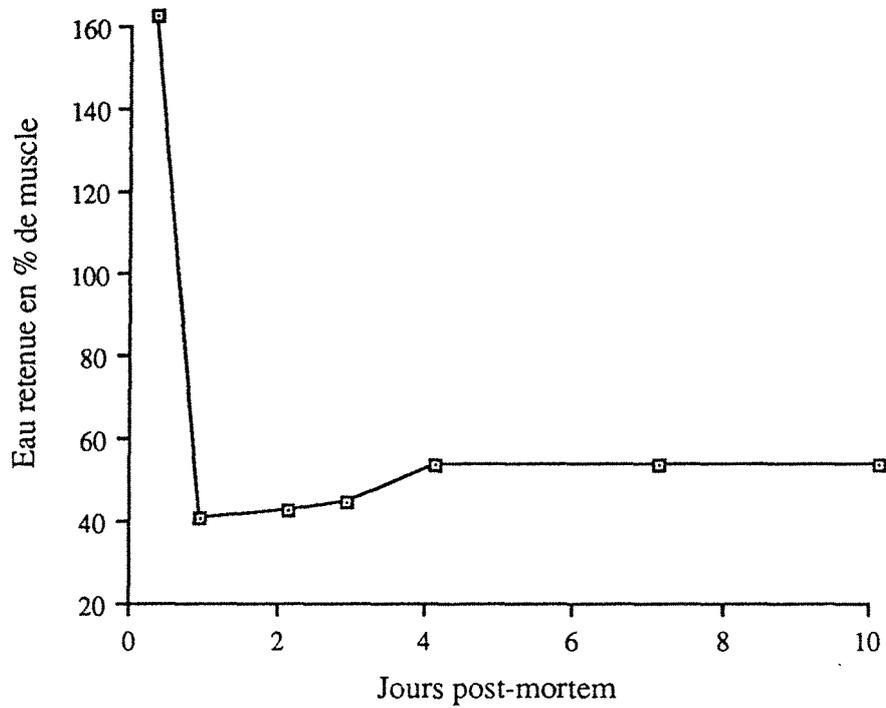


Figure 8 : Evolution du PRE post-mortem chez les bovins (HAMM, 1960)

Le pouvoir de rétention d'eau du muscle ne s'explique pas uniquement par celui des protéines myofibrillaires. L'interaction protéines myofibrillaires-protéines sarcoplasmiques exerce une forte influence sur le pouvoir de rétention d'eau (LABORDE, 1984). Cette influence, positive, est atténuée quand les protéines sarcoplasmiques sont dénaturées après la mort, du fait de la conjonction pH bas/température élevée.

### 2.2.3. L'aptitude à la conservation

Elle dépend de la résistance de la viande à la pénétration et à la prolifération des micro-organismes. L'abaissement post-mortem du pH équivaut à un pouvoir bactériostatique. Lorsque, au contraire, le pH se stabilise à une valeur élevée, les proliférations bactériennes sont favorisées.

## 2.3. Les défauts de qualité de la viande

La cinétique et l'amplitude de diminution du pH définissent en grande partie la qualité de la viande (figure 7).

### 2.3.1. Evolution du pH et qualités technologiques

#### 2.3.1.1. Le Pouvoir de Rétention d'Eau

Au moment de l'abattage, le PRE du muscle est très élevé, il diminue régulièrement pendant l'installation de la rigor mortis (HAMM, 1960) (figure 8).

Cette diminution a pour origine 3 phénomènes (GOUSSAULT, 1978):

1. la glycolyse anaérobie qui entraîne le déplacement du pH vers le point isoélectrique des protéines musculaires.

Le PRE est minimum au point isoélectrique des protéines myofibrillaires, il s'accroît pour des pH plus faibles ou plus élevés. A ce niveau, l'état d'hydratation des protéines est minimum car le réseau protéique est resserré. Pour des pH supérieurs au point isoélectrique, le PRE est lié linéairement au pH de la viande, il est d'autant plus élevé que le pH ultime est grand.

D'autre part, à pHu identique, le PRE est d'autant plus élevé que la glycolyse est lente (LAWRIE, 1960). Son influence est très nette dans le cas des viandes exsudatives.

2. la dénaturation des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires.

Suivant les conditions post-mortem de pH et de température, la myosine est partiellement dégradée, ce qui provoque la rétraction du réseau de filaments impliquant la diminution du volume myofibrillaire et, par conséquent, l'expulsion d'eau (MATSUDA et PODOLSKY,



1986; WALKER et TRINICK, 1986; WALZTHONY et al., 1986). Ces modifications s'accompagnent de la dénaturation des protéines sarcoplasmiques qui sera discutée au paragraphe 3.6. Pour certains auteurs, le caractère exsudatif s'explique par l'annulation de l'effet positif de l'interaction protéines sarcoplasmiques-protéines myofibrillaires sur le pouvoir de rétention d'eau (LABORDE, 1984; LABORDE et MONIN, 1985).

3. les variations du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  myofibrillaire en raison de l'hydrolyse et de la non régénération de l'ATP.

Après la mort, la "pompe à calcium" du réticulum sarcoplasmique continue à fonctionner en consommant de l'ATP. Ce dernier s'hydrolyse lentement et n'est plus régénéré. L'actine et la myosine se combinent alors en actomyosine. Le niveau d'hydratation de l'actomyosine est inférieur à celui des protéines élémentaires. Il y a diminution de l'espace disponible pour l'eau libre car les ions  $\text{Ca}^{2+}$  forment avec les charges négatives des protéines myofibrillaires des ponts salins intermoléculaires à l'origine d'un rapprochement des molécules protéiques; il en résulte une diminution de l'hydratation. Ce phénomène est accéléré par la dénaturation du réticulum sarcoplasmique, sous l'effet de l'acidification globale, qui se traduit par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme (GOUTEFONGEA, 1969; FROUIN et SCHECK, 1971).

Après l'abattage, la diminution du pH musculaire induit une réduction d'environ 20% du volume myofibrillaire (OFFER, 1984). La fixation des filaments d'actine et de myosine lors de l'entrée en rigor entraîne une réduction d'environ 20% du PRE; la dénaturation de la myosine provoque également le resserrement du réseau (MAUGHAN et GODT, 1981). L'écoulement d'exsudat hors du morceau de viande se trouve favorisé par la diminution du volume myofibrillaire.

#### 2.3.1.2. La couleur

L'évolution du pH après la mort influence considérablement la couleur de la viande en affectant la stabilité de la myoglobine ainsi que la structure de surface, et par là, la proportion de lumière incidente réfléchi. Si le pH reste élevé, le réseau protéique se laisse pénétrer profondément par les rayons lumineux et en absorbe une partie importante, ce qui se traduit par une couleur foncée. En outre, aux pH élevés (>6,0), les mitochondries continuent de fonctionner, consommant l'oxygène de l'air à mesure de sa pénétration dans la viande, prévenant ainsi l'oxygénation de la myoglobine: cette dernière reste sous forme réduite et la couleur tend vers le pourpre.

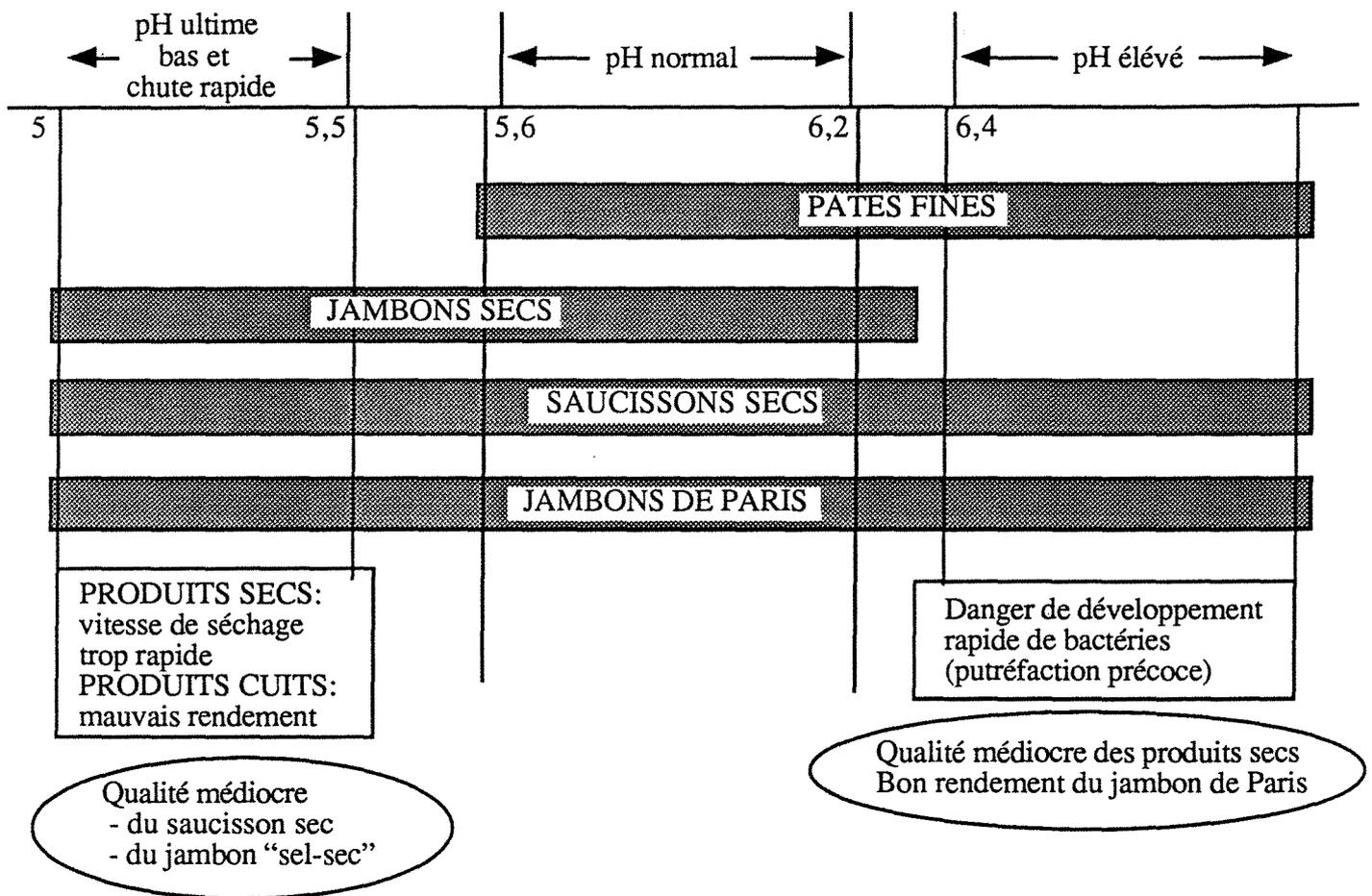


Tableau 6 : pH ultime et utilisation des viandes

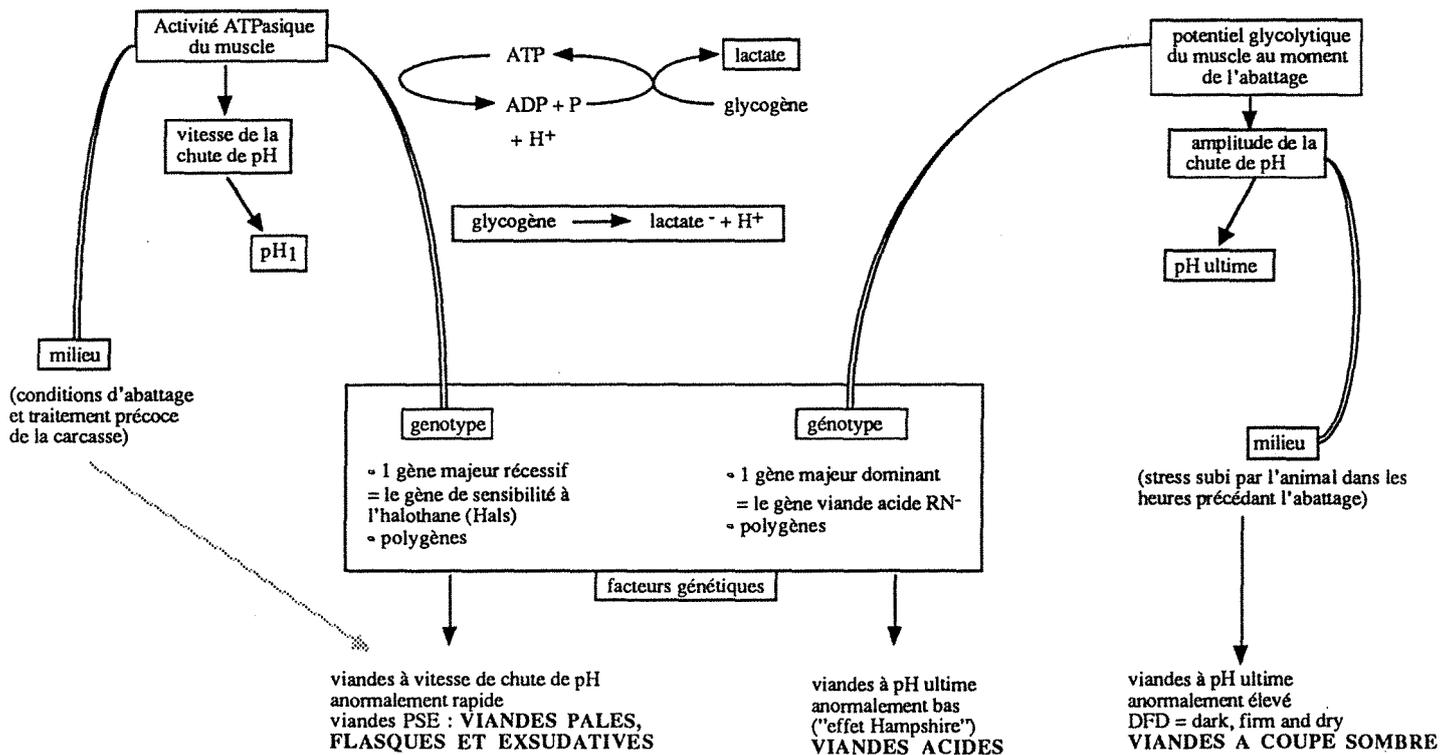


Figure 9 : Principaux défauts de qualité technologique de la viande (SELLIER, 1987)

### 2.3.1.3. Aptitude à la conservation

Les modifications de structure du réseau protéique, consécutives à l'abaissement du pH, favorisent la pénétration du sel dans la viande en même temps que la dessiccation, donc la conservation par salage et séchage (GOUTEFONGEA et GOUSSAULT, 1982).

En outre, les viandes à pH élevé sont très pauvres en sucres, et les micro-organismes se développent aux dépens des substances protéiques, d'où l'apparition précoce de mauvaises odeurs.

En pratique, on considère que les viandes à  $\text{pH} > 6,2/6,3$  sont inaptes à la salaison sèche. Pour les saucissons secs, le mélange avec des viandes à pH plus faible permet de surmonter cette difficulté. En salaison cuite, les proliférations microbiennes sont nettement atténuées par la cuisson et l'emploi de nitrite de sodium; dans ces conditions, des pH de l'ordre de 6,5 restent acceptables (tableau 6). A l'état congelé, l'aptitude à la conservation des viandes dépend principalement de la teneur et de la nature des acides gras présents dans le muscle.

La cinétique post-mortem de chute du pH permet de distinguer quatre types de viandes (figure 9) : les viandes normales, les viandes DFD, les viandes acides et les viandes exsudatives.

### 2.3.2. Les viandes DFD

Ces viandes (Dark, Firm, Dry) sont produites par des animaux dont les réserves énergétiques ont été épuisées avant et pendant l'abattage. Pour faire face aux différents stress, le porc entamé ses réserves en glycogène. Le stock en glycogène à l'abattage est faible et limite l'amplitude de chute du pH. Après 24h, le pH reste élevé (supérieur à 6.2), la viande est sèche, dure et sombre. La moindre flaveur et la mauvaise aptitude à la conservation de ces viandes les rendent peu appréciées des abatteurs et des consommateurs (DRANSFIELD, 1981; SORNAY, 1981).

### 2.3.3. Les viandes acides

Les viandes acides ont un pH ultime anormalement bas entraînant une couleur pâle et l'affaiblissement du pouvoir de rétention d'eau lors de la cuisson. Elles sont produites par des animaux résistant au stress qui possèdent au moment de l'abattage un potentiel glycolytique élevé, favorisant une chute post-mortem de pH de grande amplitude. Ce phénomène désigné sous le terme d'effet Hampshire (MONIN et al., 1986) est sous la dépendance du gène majeur dominant  $\text{RN}^-$  (NAVEAU, 1986), il se manifeste par une forte diminution du rendement de cuisson (MONIN et SELLIER, 1987; FERNANDEZ, 1990).



#### 2.3.4. Les viandes exsudatives

Les viandes exsudatives, ou Pale Soft Exsudative, sont des viandes pâles, flasques et exsudatives. Leur pH<sub>u</sub> est anormalement bas. Le caractère PSE se manifeste dans les viandes dont la chute de pH a été anormalement rapide; le pH peut atteindre des valeurs inférieures à 5.5 en moins d'une demi-heure après l'abattage.

Les viandes PSE sont produites par des animaux présentant une prédisposition au syndrome de stress. On parle de sensibilité à l'halothane. C'est effectivement le "test à l'halothane" (analyse du comportement des porcelets suite à l'inhalation d'un mélange de gaz contenant cet anesthésique) qui sert de révélateur du défaut métabolique à l'origine de la production de viandes exsudatives (EIKELENBOOM et MINKEMA, 1974). La sensibilité à l'halothane obéit à un déterminisme monogénique: elle est due à un gène autosomal récessif à pénétrance élevée, désigné par Haln (n), l'allèle normal étant désigné HalN (N). Cette sensibilité a pour effet d'augmenter de façon importante la vitesse d'acidification du muscle mais n'affecte pas l'amplitude de la chute du pH. Elle se manifeste par une défaillance des systèmes de régulation du calcium cellulaire (CHEAH et CHEAH, 1984). Les systèmes susceptibles de séquestrer le calcium étant déficients, il y a relargage massif de celui-ci dans le sarcoplasme. L'augmentation de la concentration en calcium sarcoplasmique active l'ATPase du réticulum sarcoplasmique, et à des concentrations plus importantes en calcium, l'ATPase myofibrillaire, produisant ainsi l'ATP nécessaire au fonctionnement de la glycolyse; l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> active également la phosphorylase kinase, ce qui provoque une chute rapide du pH accompagnée d'une élévation de température. La conjonction pH bas/température élevée provoque des altérations de la structure musculaire, plus particulièrement au niveau des protéines. Des dénaturations de l'ordre de 20% des protéines musculaires ont été observées dans le cas de viandes exsudatives (PENNY, 1969; HONIKEL et KIM, 1986), justifiant notamment la couleur pâle de la viande (plus grande capacité de dispersion de la lumière). La tendance exacerbée à l'exsudation serait plutôt imputable à des modifications de structure des membranes cellulaires.

Chez les animaux sensibles au stress, le calcium libéré en grande quantité activerait la phospholipase A2 - enzyme située dans la membrane et dans l'espace inter-membranaire des mitochondries (CHEAH et al, 1986). La phospholipase A2 est une enzyme calmoduline dépendante activée par le calcium; l'accroissement de son activité est bien corrélé ( $r = 0,87$ ) avec la concentration en calcium sarcoplasmique. Stimulée par le calcium, la phospholipase A2 provoque l'hydrolyse des phospholipides de la membrane mitochondriale; il en résulte la formation d'acides gras insaturés et de lysodérivés de phospholipides qui provoquent la déstabilisation des membranes mitochondriales entraînant une lyse des mitochondries accompagnée d'un relargage de calcium. Le calcium relargué et les acides gras insaturés



induisent alors la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique (ONISHI et al., 1983; CHEAH et CHEAH, 1984).

L'augmentation d'activité de la phospholipase A2 et les processus de glycolyse anaérobie très accélérés chez les porcs sensibles au stress pourraient expliquer les défauts de perméabilité des membranes cellulaires et l'apparition d'enzymes tissulaires dans la circulation sanguine des animaux.

Pour certains auteurs, l'évènement décisif conduisant à l'exsudation excessive des viandes PSE est la dénaturation de la myosine. En effet, le taux de dénaturation de la myosine augmente avec la sévérité de l'état PSE défini par le taux de la glycolyse (WISMER-PEDERSEN, 1959; McLOUGHLIN, 1963; PENNY, 1969). Par calorimétrie différentielle, STABURSVIK et al. (1984) observent une dénaturation de 50% de la myosine dans les conditions PSE, HONIKEL et KIM (1986) notent une dénaturation de 20% par la même méthode.

Cependant une glycolyse rapide n'est pas la seule cause de production des viandes PSE. Des animaux non stressés mais refroidis trop lentement après l'abattage fournissent aussi des viandes PSE.

C'est la conjonction température élevée/pH bas, qui, en provoquant la dénaturation des protéines, est à l'origine du développement de la condition PSE.

L'état PSE peut être induit dans une carcasse normale en la maintenant après l'abattage à une température de 37-41°C pendant 1h1/2 à 4h (WISMER-PEDERSEN, 1959; WISMER-PEDERSEN et BRISKEY, 1961; BENDALL et WISMER-PEDERSEN, 1962; PENNY, 1967; BENDALL, 1973; LOCKER et DAINES, 1975).

Le gène de sensibilité à l'halothane est surtout présent dans les races à fort développement musculaire. OLLIVIER et al. (1978) mentionnent une fréquence de 15% chez le Landrace français et de 30 à 95% dans différentes populations de Piétrain, Landrace belge et Landrace allemand. Cependant, la sensibilité à l'halothane a des conséquences variables sur la qualité technologique de la viande suivant les races. Chez le Piétrain, l'acidification post-mortem du muscle, rapide et ample, conduit à une dégradation marquée de la qualité technologique de la viande alors que chez le Landrace belge, les effets défavorables de la sensibilité à l'halothane sont minimisés par le degré limité d'acidification du muscle et la qualité technologique du muscle s'en trouve moins affectée (SELLIER et al., 1984).

### **Jambons bicolores**

Il est fréquent d'observer dans une même carcasse, surtout au niveau des jambons, des muscles très exsudatifs et des muscles d'apparence normale, voire secs et foncés: ce sont les



viandes dites bicolores. Ce phénomène est dû au fait que, dans les muscles rouges, le pHu est souvent élevé, supérieur à 6,0. Dans ce cas, même si la chute est très rapide, le couple pH bas/température élevée n'est pas réalisé et les protéines ne sont pas dénaturées; le pH relativement élevé s'accompagne d'une couleur soutenue et d'une coupe sèche. Au contraire, dans les muscles blancs adjacents, le pH est diminué et atteint des valeurs nettement plus basses (vers 5,4) tandis que les protéines sont dénaturées: ces muscles présentent alors l'aspect caractéristique des viandes PSE.

## 2.4. Critères d'appréciation de la qualité

### 2.4.1. Estimateurs sur la carcasse

Les critères les plus utilisés sont basés sur le pH: **pH<sub>1</sub>** (mesuré 45 min après l'abattage) et **pHu** (mesuré 20-24h après l'abattage). Seul le pH<sub>1</sub> permet d'identifier les viandes PSE (pH<sub>1</sub> < 6,0). Le pHu présente une corrélation de 0,5 à 0,7 avec le rendement technologique de fabrication du jambon selon la méthode JACQUET (JACQUET et al., 1984). C'est une détermination compatible avec la cadence des abattoirs.

Plusieurs critères sont relatifs à la **couleur**: la réflectance, la diffusion de la lumière (Fibre Optic Probe, McDOUGALL et JONES, 1975), la note de couleur d'après la palette japonaise, la couleur appréciée au colorimètre (système Lab). La couleur s'apprécie sur une coupe fraîche de muscle à 24h post-mortem.

Les méthodes de mesure du **pouvoir de rétention d'eau** sur la viande fraîche peuvent être divisées en deux groupes:

- mesure sans application d'une force extérieure, mise à part la gravité (POWELL, 1978; MOHLER et KIERMEIER, 1953 cités par HAMM, 1960). La méthode de référence (HONIKEL, 1987) consiste à mesurer l'eau relarguée par un échantillon de viande suspendu et stocké à 4°C pendant un temps déterminé (72h). Il s'agit d'une méthode sensible mais longue, et d'autres méthodes ont été développées pour mesurer le PRE plus rapidement, comme la méthode d'imbibition, qui consiste à apprécier le temps nécessaire à l'imbibition totale d'un papier pH posé sur l'échantillon de viande.
- mesure avec application d'une force mécanique. La force appliquée peut être produite par centrifugation (WIERBICKI et DEATHERAGE, 1958; BOUTON et al., 1972; LABORDE, 1984), compression (GRAU et HAMM, 1953; GOUTEFONGEA, 1960), succion capillaire (HOFMANN, 1975; LEWICKI et al., 1978). Toutes ces méthodes donnent des résultats en quelques minutes, voire une heure. Cependant, elles présentent des inconvénients : la pression



exercée provoque, outre le relargage de l'eau extracellulaire, le relargage d'une partie de l'eau intracellulaire, et de fait, majore les résultats par rapport à ceux obtenus sans application d'une force extérieure. De façon idéale, la mesure du PRE devrait s'effectuer sans altérer la microstructure de l'échantillon puisque c'est la microstructure qui détermine le PRE (TROUT, 1988).

**L'Indice Qualité Viande** selon JACQUET et al. (1984), utilisé dans les stations de sélection porcine officielles, est une combinaison linéaire de plusieurs mesures d'après la formule:

$$IQV = 53,7 + 5,9019pH(Add) - 0,0092Reflectance(LV) + 0,1734PRE(LV)$$

Le pH est mesuré sur le muscle adducteur, la réflectance et le pouvoir de rétention d'eau sur le muscle long vaste par la méthode du temps d'imbibition d'un papier pH.

C'est le meilleur estimateur actuel du rendement technologique de fabrication du jambon  $r = +0,72$  (JACQUET et al, 1984).

D'autres critères d'appréciation de la qualité font appel aux propriétés électriques du muscle: **conductivité et facteur de perte diélectrique**. Ces critères sont basés sur le fait que la membrane myofibrillaire intacte se comporte comme un condensateur qui perd ses propriétés capacitives lorsqu'elle est endommagée. Les membranes altérées, cas des viandes exsudatives, mettent en communication les fluides extra et intracellulaires et induisent une diminution de la résistivité initiale du muscle. Ces critères permettent une bonne appréciation de la vitesse de chute du pH et par conséquent de la probabilité d'obtention de viandes exsudatives (SCHMITTEN et al., 1987). La conductivité, appréciée par le Quality Meter à 30 min post-mortem, permet notamment une prédiction efficace du PRE 24h p.m ( $r^2 = 0,49$ ; OLIVER et al., 1991). La conductivité est utilisée couramment par les industriels allemands.

**La Résonance Magnétique Nucléaire** permet une caractérisation physico-chimique de la viande, et par conséquent, une appréciation de sa qualité.

La RMN  $^1H$ , basée sur la mesure des temps de relaxation des protons de l'eau, renseigne sur les liaisons de l'eau avec d'autres constituants, apportant ainsi des informations sur le PRE de la viande (RENOU et al., 1985).

La RMN  $^{31}P$  renseigne sur les teneurs en composés phosphorylés, et donc indirectement sur l'évolution du potentiel énergétique. MIRI et al. (1988) obtiennent des corrélations de 0,7-0,8 entre les paramètres mesurés par RMN et la vitesse de chute post-mortem du pH. L'amplitude des changements biochimiques post-mortem peut être prédite par examen du spectre  $^{31}P$  RMN 30 minutes après la mort. A ce stade, un muscle, dont le métabolisme est lent, présente simultanément un pH moyennement élevé, une teneur élevée en ATP (4-6,8 $\mu$ mol/g) et un contenu faible en phosphate inorganique (6-14 $\mu$ mol/g). Un muscle, dont le métabolisme est rapide (muscle PSE), présente un pH bas, une faible teneur en ATP (1-1,4 $\mu$ mol/g) et généralement une teneur élevée en phosphomonoesters (9-23 $\mu$ mol/g) (MIRI et al., 1992).

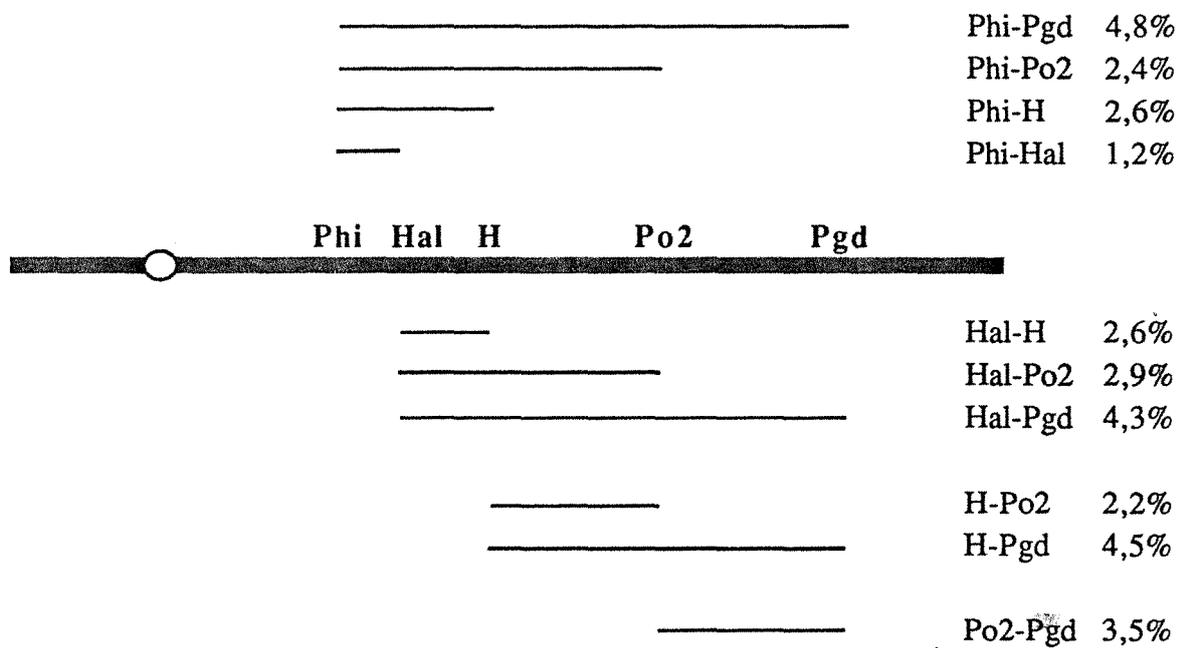


Figure 10 : Estimation des fréquences de recombinaison pour le groupe de liaison de l'halothane calculées en regroupant la plupart des données publiées (ARCHIBALD et IMLAH, 1985)

**Phi** locus de la phosphohexose isomérase

**Hal** locus de la sensibilité à l'halothane

**H** locus de l'antigène érythrocytaire

**Po2** locus de la post-albumine<sup>2</sup>

**Pgd** locus de la phosphogluconate déshydrogénase

La **spectroscopie dans le proche infrarouge** , utilisée pour le dosage de l'eau, des protéines et de la matière grasse dans la viande (KRUGGEL et al., 1981; LANZA, 1983) pourrait permettre, dans le futur, la détermination de critères de qualité des viandes comme la teneur en collagène, la couleur, la jutosité ou la tendreté (CHEVALIER et al., 1990).

#### 2.4.2. Estimateurs sur l'animal vivant

Les travaux conduits jusqu'à ce jour pour la recherche d'un prédicteur de la qualité de la viande, tels que le dosage d'enzymes tissulaires dans la circulation sanguine (HWANG et al., 1978; SYBESMA et EIKELNBOOM, 1978; DUTHIE et al., 1988) n'ont pas donné de résultats intéressants. En fait, le seul test in vivo qui a vraiment fait l'objet d'une application à grande échelle reste le test à l'halothane (et le typage sanguin qui est, en quelque sorte, son complément).

Le **test à l'halothane** permet de détecter, à l'âge de 10 semaines, les animaux homozygotes pour le gène de sensibilité au stress (nn). Cependant, suivant les critères de qualité de viande considérés (pH1, IQV, PRE, réflectance), il apparaît que les hétérozygotes Nn occupent une position intermédiaire entre les deux homozygotes NN et nn (JENSEN et ANDERSEN, 1980; SCHNEIDER et al., 1980; CHRISTIAN et ROTSCILD, 1981; LUNDSTROM et al., 1985). Il semble donc que, bien que le gène n soit totalement récessif en ce qui concerne la réaction à l'halothane, on ne peut le considérer comme complètement récessif pour son effet sur les caractères indicateurs du syndrome PSE (SELLIER et al., 1988).

L'identification des trois génotypes de la sensibilité à l'halothane, NN, Nn et nn, peut être améliorée par le **typage sanguin**. Cette méthode permet de présumer de l'allèle du gène Hal par l'étude de marqueurs génétiques appartenant au même groupe de liaison que le gène Hal. Le locus Hal appartient à un groupe de liaison comprenant notamment le locus PHI gouvernant les deux variants de la phosphohexose isomérase, le locus PGD gouvernant les deux variants de la 6.phosphogluconate déshydrogénase, le locus PO<sub>2</sub> gouvernant les variants de la postalbumine<sup>2</sup> et le locus de l'antigène érythrocytaire H (figure 10). La connaissance électrophorétique de ces variants permet de prédire le génotype Hal. Pour GAHNE et JUNEJA (1985), combiner le test à l'halothane au typage sanguin PHI, PO<sub>2</sub> et PGD permet la prédiction du génotype Hal à 90-95%.

Le gène de sensibilité à l'halothane n'expliquant pas entièrement la variabilité génétique de la qualité de la viande, les recherches se poursuivent actuellement pour mettre au point un critère de sélection in vivo (SELLIER et al., 1988).

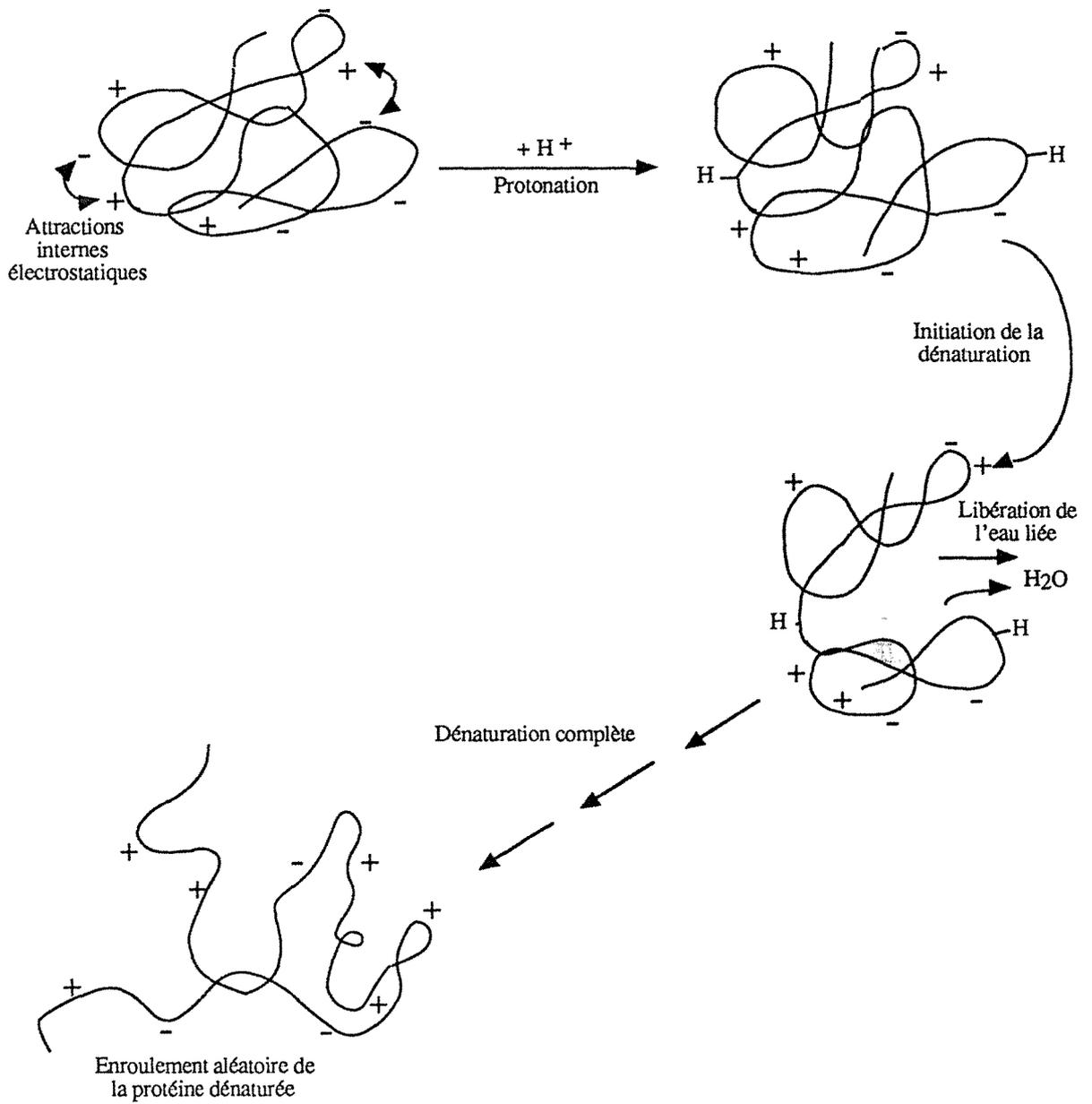


Figure 11 : Modification des forces électrostatiques au sein d'une molécule protéique au cours d'une diminution de pH, (Scopes, 1982).

La mesure du **potentiel glycolytique** à partir d'une biopsie devrait permettre de prédire l'amplitude de la chute de pH (MEJENES-QUIJANO, 1986) ainsi que de présumer l'existence du gène RN<sup>-</sup> (FERNANDEZ et al., 1990). L'INRA est actuellement impliqué dans un programme de grande ampleur sur ce thème, dont les résultats ne sont pas encore connus.

La RMN <sup>31</sup>P permet la prédiction de la qualité de la viande à partir d'un échantillon prélevé 30 min post-mortem (MIRI et al., 1992). Les potentialités de prédiction à partir d'échantillons prélevés in vivo restent à confirmer.

### 3. LES PROTEINES SARCOPLASMIQUES DU MUSCLE DE PORC

#### 3.1. Généralités sur les protéines solubles

##### 3.1.1. Solubilité des protéines

Dans la plupart des protéines globulaires solubles dans l'eau, les acides aminés hydrophobes tendent à se placer vers l'intérieur de la molécule, tandis que les acides aminés polaires sont répartis principalement à la surface de façon assez uniforme.

D'un point de vue thermodynamique, la solubilisation correspond à une dissociation simultanée des molécules du solvant et des molécules de protéines puis à une dispersion de ces dernières dans le solvant avec une surface interfaciale de contact maximale entre la protéine et le solvant. Pour se solubiliser, une protéine sera donc amenée à interagir autant que possible avec le solvant (liaisons hydrogènes, interactions dipôle-dipôle et ioniques). La solubilité dépend principalement du pH, de la force ionique, du type de solvant et de la température.

##### 3.1.2. Influence du pH

Pour des valeurs de pH supérieures ou inférieures au point isoélectrique, la protéine porte une charge négative ou positive et les molécules d'eau interagissent avec ces charges contribuant ainsi à sa solubilisation. De plus, les chaînes protéiques portant des charges électriques de même signe ont tendance à se repousser et par suite à se dissocier et à se déplier (figure 11). La courbe représentant les variations de la solubilité d'une protéine en fonction du pH présente une allure en V ou en U, le minimum de la courbe correspondant au point isoélectrique.



### 3.1.3. Influence de la force ionique

(d'après CHEFTEL, CUQ et LORIENT, 1985)

La force ionique d'une solution est donnée par la formule :

$$\mu = 1/2 \sum C_i Z_i^2 \quad \text{avec } C_i \text{ concentration du constituant } i$$

$Z_i$  valence (charge) du constituant  $i$

Les ions des sels neutres, pour des molarités comprises entre 0,5 et 1,0 M peuvent accroître la solubilité des protéines (on parle de "salting-in"). Les ions réagissent avec les charges des protéines et abaissent l'attraction électrostatique entre les charges opposées de groupements voisins. En outre, la solvation due à ces ions permet d'augmenter la solvation des protéines et par la suite leur solubilité.

Si la concentration des sels neutres est supérieure à 1 M, la solubilité des protéines décroît et il peut en résulter une précipitation. Cet effet de relargage ("salting-out") résulte de la compétition entre protéine et ions salins pour les molécules d'eau nécessaires à leur solvation respective. A forte concentration saline, il n'y a plus assez de molécules d'eau disponibles pour la solvation de la protéine car la majorité de l'eau est fortement liée aux sels. Ainsi, les interactions protéine-protéine deviennent plus importantes que les interactions protéine-eau et cela peut conduire à une agrégation suivie de précipitation des molécules protéiques.

## 3.2. Techniques d'étude des protéines sarcoplasmiques du muscle de porc

### 3.2.1. Préparation du muscle

La méthodologie de prélèvement, le mode de conservation et l'état de l'échantillon au moment de l'analyse sont autant de facteurs de variation des résultats à prendre en compte.

Le broyage provoque la rupture des cellules musculaires facilitant les attaques protéolytiques des myofibrilles. Le broyage provoque également la rupture des lysosomes, induisant le relargage des cathepsines, ainsi que la rupture du réticulum sarcoplasmique, à l'origine de la libération de calcium dans la cellule (HAMM, 1977) et donc la stimulation du Calcium Activated Factor (DAYTON et al., 1975). Cependant l'action de ces enzymes sur les protéines sarcoplasmiques n'est pas confirmée et il apparaît que le broyage ne modifie pas le comportement des protéines sarcoplasmiques au cours du stockage à 4°C de 1h à 10 j post-mortem (XIONG et ANGLEMIER, 1989).

Compte tenu de l'hétérogénéité du tissu musculaire, l'utilisation de muscle broyé permet par ailleurs d'assurer une meilleure représentativité de l'échantillonnage.



Il faut ajouter que le broyage affecte la cinétique de chute du pH au cours des premières 24 heures qui suivent l'abattage: cependant l'amplitude du phénomène reste globalement la même au bout de 24h (XIONG et ANGLEMIER, 1989).

### 3.2.2. Extraction des protéines

Les protéines sarcoplasmiques sont les protéines hydrosolubles du muscle. Leur extraction se pratique donc en solution aqueuse; la force ionique, le pH et la composition des tampons d'extraction varient suivant les auteurs.

La force ionique du sarcoplasme est de l'ordre de 0,1/0,15 et le pH de 7,4.

Les extractions par tampon phosphate pH 7,4 à des molarités de 0,02/0,03 M sont fréquemment rencontrées (LOPEZ-BOTE et al., 1989; SAYRE et BRISKEY, 1963). BELLO et al. (1974) adaptent la méthode de HELANDER (1957) et pratiquent l'extraction des protéines sarcoplasmiques avec un tampon de force ionique 0,08 et un pH de 7,4. HONIKEL et KIM (1986) utilisent un tampon contenant 0,1M KCl et 0,05M de glycérophosphate pH 6,5. CHENG et PARRISH (1979), pour une étude sur les protéines du boeuf, utilisent un mélange glucose 0,25M / KCl 0,1M / EDTA 1mM, pH 7,6; SAVAGE et al.(1990) extraient les protéines sarcoplasmiques dans un tampon NaHCO<sub>3</sub> 3mM contenant du KCl 0,1M.

L'eau reste l'extractant le plus utilisé (SCOPES,1964; BORCHERT et al.,1969; CRESPO et OCKERMAN,1977; CALDIRONI et BAZAN, 1980; HARRINGTON et HENAHAN, 1982; DAVIS et ANDERSON, 1983, 1984; McCORMICK, 1987, 1988; OKAYAMA et al., 1991). L'extraction est presque instantanée par homogénéisation à l'Ultra-Turrax ou au Waring Blendor à froid. Suit une phase de centrifugation ou de filtration pour récupérer la phase aqueuse contenant les protéines sarcoplasmiques.

Certains auteurs ne pratiquent pas d'extraction à partir de muscle frais mais étudient directement les protéines sarcoplasmiques dans le jus de muscle extrait par pression (O'MEARA et MUNGO, 1985; JALANG'O et al., 1987). JALANG'O et al. (1987) obtiennent le "jus musculaire" par pression hydraulique de 2 kg/cm<sup>2</sup> pendant 10 min et notent une corrélation positive entre le volume de jus extrait et la concentration en protéines du jus.

### 3.2.3. Séparation et identification des protéines

Les techniques d'étude des protéines ont évolué en fonction des progrès apportés à l'instrumentation et aux méthodes de séparation:

- électrophorèse sur gel d'amidon dans les années 60-70 (SAYRE et BRISKEY, 1963, SCOPES, 1963 et 1964; NEELIN et ROSE, 1964; NEELIN et ECOBICHON, 1966; WHITAKER et al., 1970)

CHROMATOGRAMMES D'UN EXTRAIT AQUEUX CRU  
DE PROTEINES SARCOPLASMIQUES DE PORC

Volume de l'échantillon : 25µl  
Absorbance à 280nm  
Eluant : Phosphate de sodium  
0,01M pH 6,8 + NaCl 0,15M  
Débit : 1 ml/mn  
(DAVIS et ANDERSON, 1984)

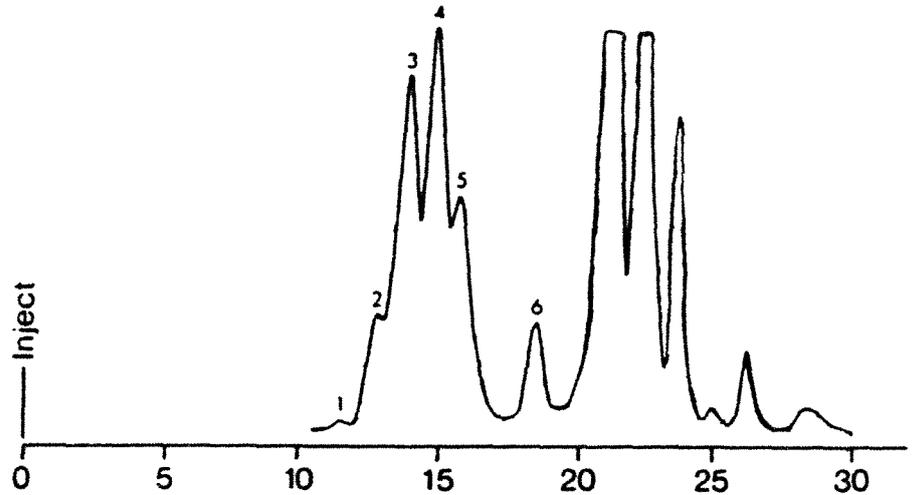


Figure 12 : Chromatographie d'exclusion sur gel TSK (colonne G3000SW)

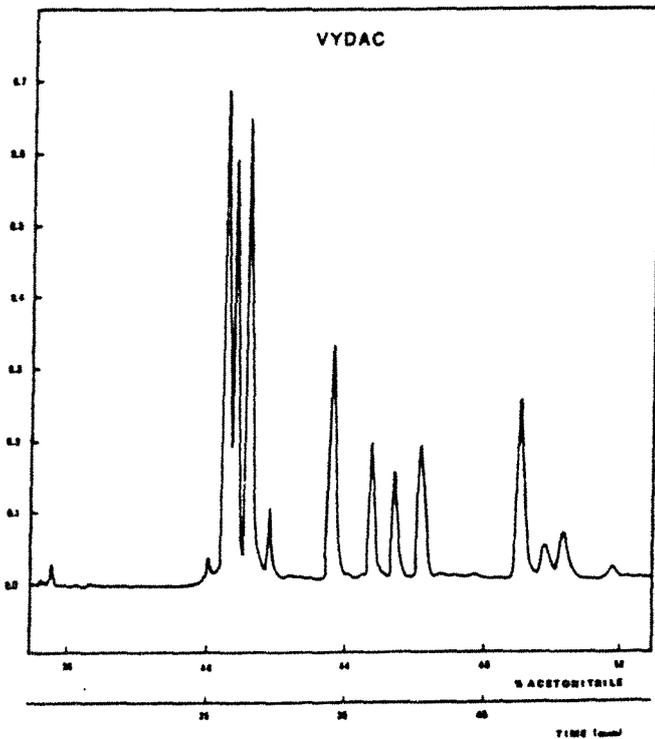


Figure 13 : Chromatographie à polarité de phase inversée  
(colonne VYDAC)

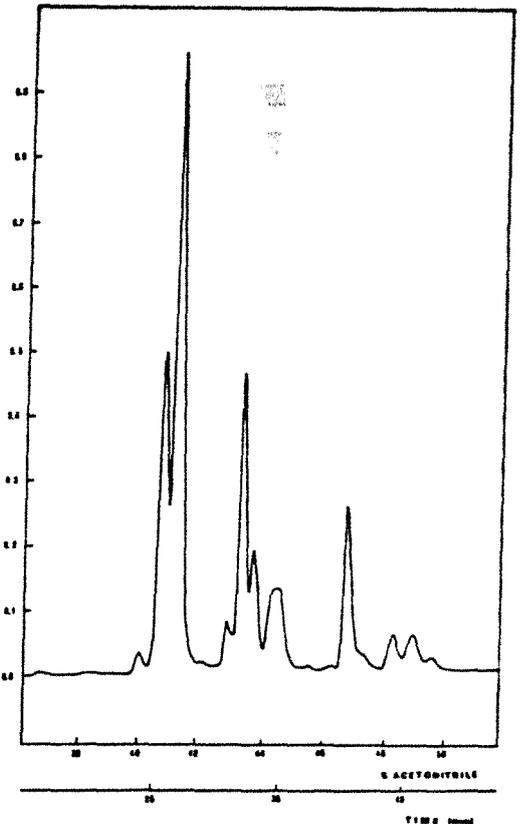


Figure 14 : Chromatographie à polarité de phase inversée  
(colonne SYNCHROPAC)

Volume échantillon : 20µl. Absorbance 223 nm  
Gradient de 30 à 45% de : H<sub>2</sub>O / TFA 0,1% et AcN / TFA 0,07%  
(McCORMICK et al., 1988)

- électrophorèse SDS sur gel de polyacrylamide depuis les années 75-80 (HAY et al., 1973; LEE et al., 1974; CHENG et PARRISH, 1979; XIONG et ANGLEMIER, 1989; SAVAGE et al., 1990; OKAYAMA et al., 1991; CAMOU et SEBRANEK, 1991).

Ces deux méthodes permettent une séparation basée sur le poids moléculaire.

- chromatographie liquide haute performance depuis le début des années 80. Deux types de séparations chromatographiques ont été exploités jusqu'alors :

- la chromatographie d'exclusion sur gel, opérant une séparation basée sur les poids moléculaires, n'offre pas une résolution suffisante (figure 12), et l'identification des protéines n'est pas possible (DAVIS et ANDERSON, 1984).
- la chromatographie à polarité de phase inversée, fonctionnant en gradient de solvants eau/acétonitrile contenant de l'acide trifluoroacétique, assure une séparation basée sur le caractère d'hydrophobicité des protéines; cette méthode permet une résolution satisfaisante et conduit à l'identification de 14 composés (figures 13 et 14) (McCORMICK et al., 1987, 1988) .

Les étalons utilisés pour l'identification sont soit des protéines de muscle de porc, soit le plus souvent des protéines musculaires de lapin, de caractéristiques proches de celles du porc et plus facilement disponibles dans le commerce (SAVAGE et al., 1990).

Suite à une séparation par électrophorèse SDS, des techniques immunochimiques permettent d'identifier une protéine et éventuellement ses fragments protéolytiques par action d'anticorps spécifiques (BANDMAN et ZDANIS, 1988; LEVIEUX et al., 1990).

### 3.3. Composition des protéines du sarcoplasme

Les protéines sarcoplasmiques représentent environ **30% des protéines du muscle** et regroupent les enzymes de la glycolyse, les enzymes du catabolisme du glycogène, la créatine phosphate kinase et la myoglobine.

Le mode d'extraction influence beaucoup les concentrations des différentes protéines. Il est possible toutefois de donner une composition relative des différentes protéines (SAVAGE et al., 1990 : tableau 7).

Les méthodes de préparation des échantillons et de séparation électrophorétique adoptées ne permettent pas de séparer toutes les protéines sarcoplasmiques : certaines protéines migrent de la même façon, telles que phosphorylase b/phosphorylase b kinase et créatine phosphate kinase/phosphoglycérate kinase. Il est donc impossible de les dissocier et d'établir leur proportion relative.

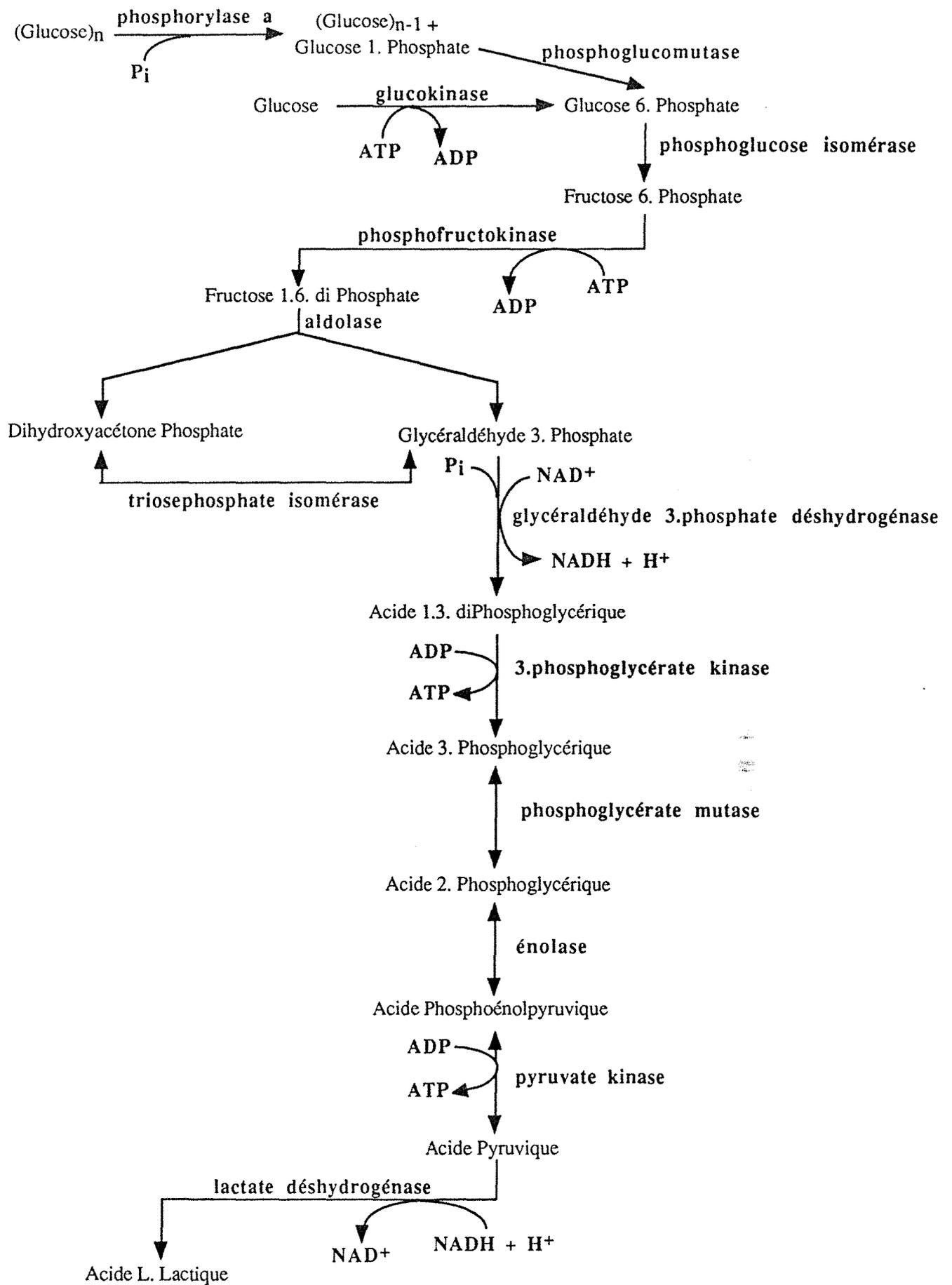


Figure 15 : Les enzymes de la glycolyse

On remarque que la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase, l'aldolase, l'énolase ainsi que la créatine phosphate kinase et la phosphoglycérate kinase sont présentes en quantités importantes dans le sarcoplasme.

La myoglobine ne représente qu'une faible partie des protéines du muscle.

PROTEINES	Proportion relative % SDS.PAGE (SAVAGE et al. 1990)	Poids moléculaire muscle de boeuf DARNALL et KLOTZ, 1975
Phosphorylase b Phosphorylase b kinase	3,40	185 000
Phosphofructokinase	non identifié	360 000
Phosphoglucomutase	1,90	
Pyruvate kinase	6,70	230 000
Phosphoglucose isomérase	2,20	134 000
Enolase	11,80	82 000
Créatine Phosphate kinase Phosphoglycérate kinase	23,20	81 000 56 000
Aldolase	13,60	160 000
Glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase	18,60	144 000
Lactate déshydrogénase	6,00	140 000
Phosphoglycérate mutase	6,70	66 000
Triose phosphate isomérase	2,70	53 000
Myokinase	non quantifié	21 000
Myoglobine	1,10	17 800

Tableau 7: Teneurs relatives des protéines d'un extrait musculaire de porc (1g de muscle dans 10 ml de KCl 0,1M + NaHCO<sub>3</sub> 3mM) et poids moléculaires

La présence dans l'extrait musculaire de la phosphofructokinase, de la phosphoglycérate kinase et de la phosphorylase b kinase varie suivant le mode d'extraction (Mc CORMICK et al., 1988; OKAYAMA et al., 1991).

Des groupements SH sont impliqués dans l'activité des enzymes glycolytiques puisque la glycolyse est inhibée par l'iodoacétate à une concentration n'affectant pas la contraction (JOCELYN, 1972). Quelques enzymes SH-dépendantes ont été isolées: phosphofructokinase, lactate déshydrogénase, glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase et créatine phosphate kinase. La myoglobine ne contient pas de groupe SH.

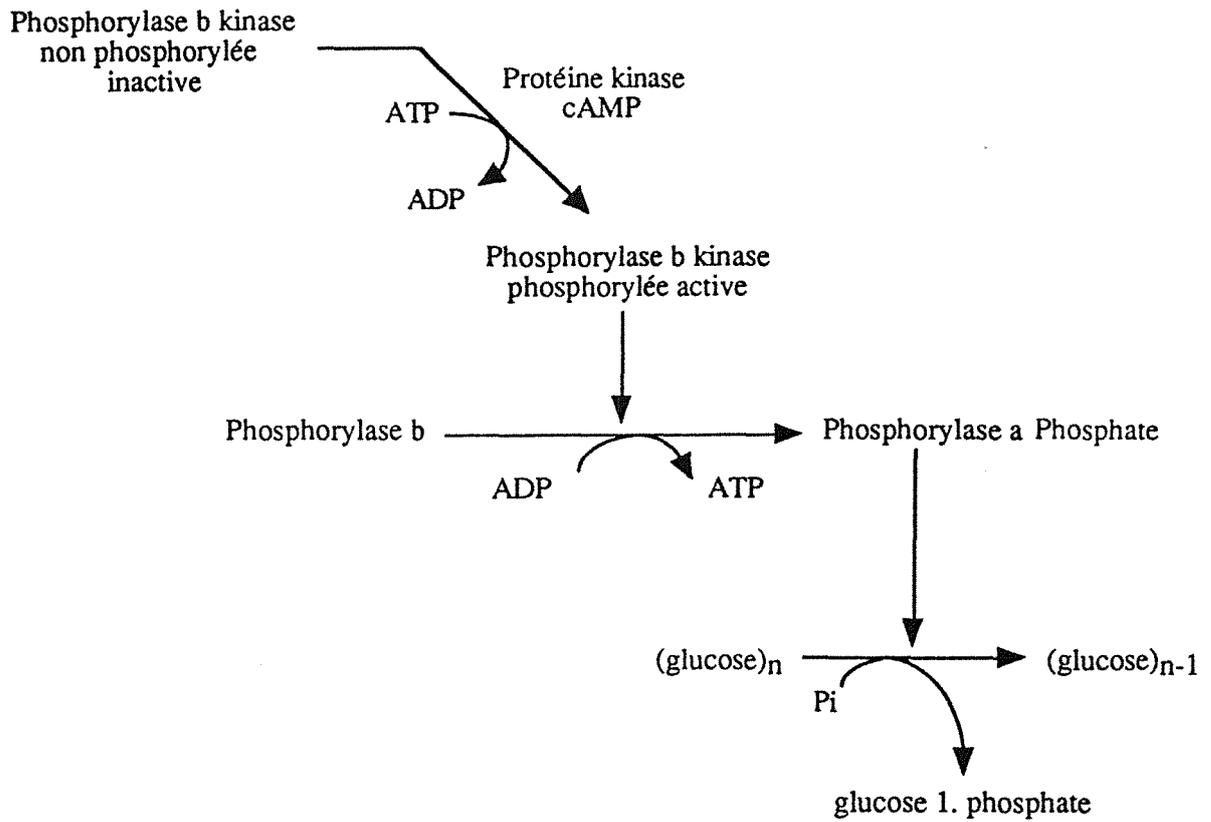


Figure 16 : Participation des phosphorylases à la glycolyse

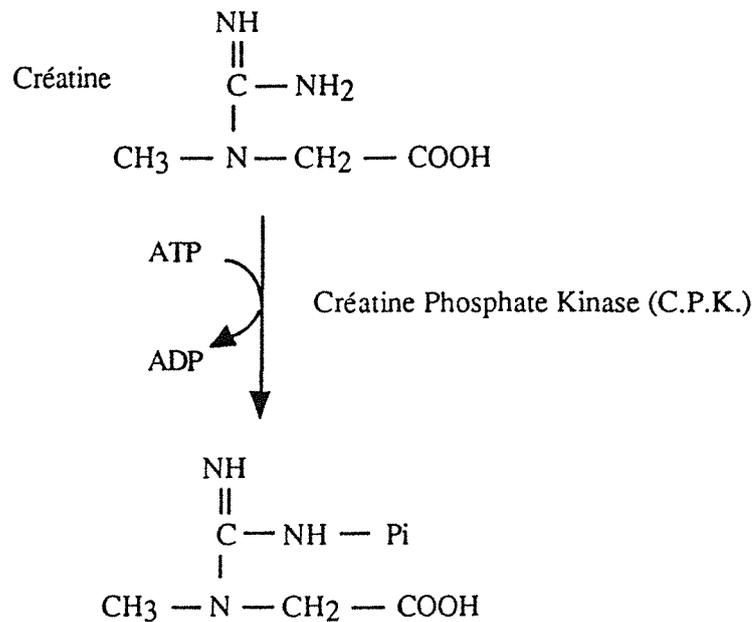


Figure 17 : Transformation de la créatine en créatine phosphate

### 3.4. Fonction des protéines sarcoplasmiques

#### 3.4.1. Les enzymes glycolytiques

Les enzymes glycolytiques représentent 80% des protéines sarcoplasmiques.

Les réactions de la glycolyse sont rappelées figure 15 : lors du métabolisme post-mortem, le glycogène -réserve énergétique du muscle- est dégradé, avec consommation d'ATP et formation d'acide lactique.

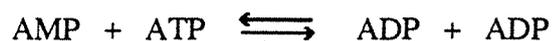
#### 3.4.2. Les autres protéines sarcoplasmiques

Les **phosphorylases a et b** sont deux formes différentes de la même enzyme, la phosphorylase b étant la forme inactive de la phosphorylase a, dont la fonction est de catalyser la dégradation du glycogène avec production de glucose 1.phosphate. Le passage de la forme phosphorylase b à la forme phosphorylase a est contrôlé par la phosphorylase kinase et par régulation hormonale (figure 16).

La **créatine phosphate kinase** catalyse la production de créatine phosphate à partir de créatine (figure 17).

Quand la concentration en ATP est élevée, la créatine est transformée dans le muscle en créatine phosphate laquelle servira à phosphoryler l'ADP en ATP au moment où le muscle en a besoin. La créatine phosphate constitue une réserve énergétique immédiatement mobilisable, fournissant l'ATP nécessaire à la contraction musculaire en attendant que la stimulation de la glycolyse se traduise par la formation accrue d'ATP.

La **myokinase** est une AMPkinase qui catalyse la réaction



Il y a phosphorylation d'un nucléotide 5'.monophosphate en nucléotide diphosphate. Il s'agit d'une réaction réversible.

La **myoglobine**, pigment respiratoire musculaire, est une chromoprotéine formée d'une globine -chaîne polypeptidique unique- associée à un groupement prosthétique contenant du fer (figure 18). Le poids moléculaire est de 17 800 D chez le porc. La teneur en histidine y est relativement élevée (8 à 10%).

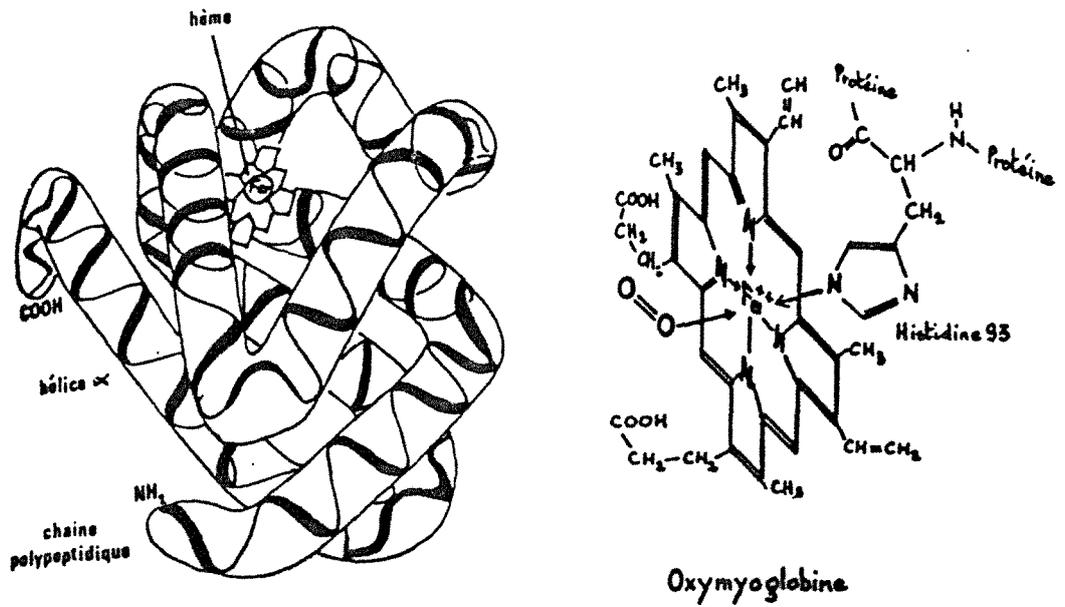


Figure 18 : Structure quaternaire de la myoglobine et structure de l'hème de l'oxymyoglobine

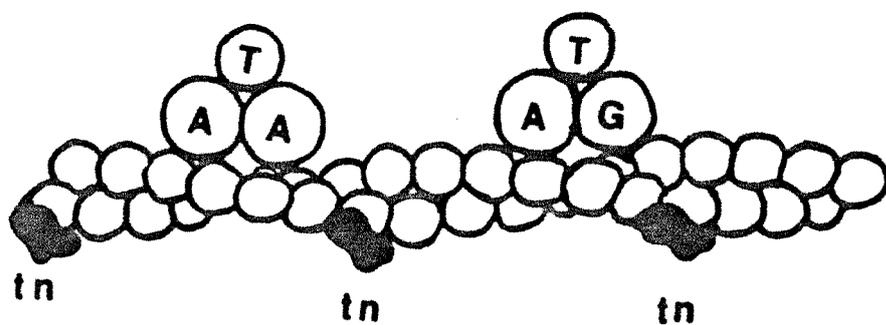


Figure 19: Les deux modes de liaison de l'aldolase (A) et de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (G) au filament d'actine permettant la fixation de la triose phosphate isomérase (T). Le complexe troponine (tn) figure sur le schéma, la tropomyosine est omise pour plus de clarté (STEPHAN et al., 1986).

L'état d'oxydation du fer ( $\text{Fe}^{++}$  ou  $\text{Fe}^{+++}$ ) de l'hème et la nature des ligands liés à ce fer ( $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{CO}$ ) sont à l'origine de variations de couleur et de réactivité de la myoglobine.

La *désoxymyoglobine* est le pigment natif dans la viande; elle possède un atome de fer dans l'hème oxydé sous forme de fer ferreux ( $\text{Fe}^{++}$ ). Ce dérivé rouge pourpre est présent quand la pression partielle en oxygène est faible; on le retrouve ainsi à l'intérieur des viandes fraîchement tranchées.

L'*oxymyoglobine* correspond au complexe myoglobine- $\text{Fe}^{++}$ - $\text{O}_2$ . Il s'agit d'un pigment rouge vif, relativement stable quand la pression partielle en oxygène est élevée, que l'on trouve à la surface de la viande fraîche.

La *metmyoglobine* est une forme oxydée de la myoglobine dans laquelle le fer est à l'état ferrique. Il s'agit d'un pigment brun qui est généralement indésirable dans la viande et les produits carnés. L'oxydation de l'oxymyoglobine en metmyoglobine et la réaction inverse se produisent de façon continue dans le muscle et pendant un certain temps après l'abattage. La préservation de la couleur de la viande fraîche nécessite donc des conditions dans lesquelles la forme réduite prédomine.

### 3.5. Localisation des protéines sarcoplasmiques dans la cellule musculaire

Dans toutes les espèces et dans toutes les formes de muscles, striés ou lisses, une certaine quantité d'enzymes est toujours associée au filament fin du muscle au repos. Il est probable que cette quantité soit fonction de la concentration en enzymes. En activité, l'état physiologique du muscle influence le degré de fixation.

Trois sites de fixation ont été identifiés sur la bande I : la F.actine (CLARKE et MORTON, 1976), la tropomyosine et la troponine (WALSH et al., 1980).

L'aldolase (CLARKE et al., 1984), la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase (WALSH et al., 1980), la pyruvate kinase et les phosphorylases a et b (MARQUETANT et al., 1986) sont capables de se fixer au filament fin.

D'autres enzymes, comme la triose phosphate isomérase, la phosphoglucose isomérase ou la phosphoglucomutase, s'appartiennent aux enzymes déjà liées au filament fin. C'est ainsi que la triose phosphate isomérase utilise l'aldolase et la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase pour se lier au filament fin (STEPHAN et al., 1986 : figure 19). On peut remarquer, par ailleurs, que les enzymes sont disposées dans cette structure dans le même ordre que celui dans lequel elles interviennent pour la transformation des intermédiaires de la glycolyse.

La phosphoglucomutase est liée à la bande I par l'intermédiaire de la lactate déshydrogénase (BRONSTEIN et KNOLL, 1981). Les modes de liaison de la phosphoglycérate kinase et de l'énolase restent indéterminés. D'autres sites de fixation ont été avancés: tubules transverses et vésicules terminales pour la GAPDH (CASWELL et CORBETT, 1985). L'isoenzyme M de la créatine phosphate kinase est une protéine constitutive de la ligne M (WALLIMANN et al., 1977).



Pour les enzymes déjà étudiées, il existe des différences de propriétés cinétiques entre la forme liée et la forme libre. L'aldolase et la GAPDH présentent des cinétiques plus rapides si elles sont fixées (WALSH et al., 1977).

Globalement, la fixation d'enzymes glycolytiques sur le muscle fournit une explication cohérente pour justifier la relation entre l'activité musculaire et l'importance de la glycolyse.

#### 4. EVOLUTION DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES AU COURS DU STOCKAGE

Après l'abattage, la régulation du calcium par les membranes sarcoplasmiques et mitochondriales est déficiente. L'excès de calcium relargué et les agents réducteurs présents dans le sarcoplasme, du fait de l'affaiblissement de la tension en oxygène des tissus, activent les protéases neutres calcium-dépendantes. Rapidement actives après la mort de l'animal, ce sont les premières à attaquer les structures musculaires.

Parallèlement, la glycolyse se poursuit et le pH diminue, l'acidification entraînant une moindre résistance des membranes lysosomales (pH 5,5/5,7).

Le CAF, d'origine sarcoplasmique, semble sans effet sur les protéines sarcoplasmiques (GOLL et al., 1983) tandis que les cathepsines sont capables de les dégrader (DRABIKOWSKI et al., 1977).

In vivo, on n'a cependant aucune preuve de l'attaque des protéines sarcoplasmiques, ni par le CAF ni par les cathepsines.

##### 4.1. Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques

Par électrophorèse sur gel d'amidon, NEELIN et ROSE (1964) et NEELIN et ECOBICHON (1966) ont rapporté de faibles modifications des protéines sarcoplasmiques du muscle de poulet au cours de la maturation, sans avoir identifié les bandes des électrophorégrammes. HAY et al. (1973) confirment ces résultats par électrophorèse SDS sur gel de polyacrylamide en observant des changements entre 0h et 168h p.m pour les protéines de poids moléculaires 150-20 000D. Une insolubilisation de l'ordre de 10 à 15% des protéines sarcoplasmiques a été rapportée par plusieurs auteurs au cours de la maturation de viande de porc de qualité normale



(PENNY, 1969; OFFER et KNIGHT, 1988). Cette évolution n'a pas été observée par WHITAKER et al. (1970) par électrophorèse sur gel d'amidon, ni sur le lapin ni sur le porc. XIONG ET ANGLEMIER (1989), par électrophorèse SDS sur gel de polyacrylamide, notent, à partir de muscle de boeuf, le passage en solution de protéines myofibrillaires mais aucune modification notable des protéines sarcoplasmiques.

SPANIER et al. (1990), sur muscle de boeuf, rapportent une légère augmentation de la concentration en protéines solubles jusqu'à 3,5h post-mortem (+17%) puis une diminution rapide jusqu'à 26h (-16%), et enfin une diminution lente et progressive jusqu'à 360h p.m (-12%). Une évolution similaire est observée pour la créatine phosphate kinase et pour la myoglobine (respectivement 32% et 41,5% d'insolubilisation en 360h) avec en parallèle une fragilisation membranaire.

La dénaturation plus ou moins accentuée de ces fractions protéiques devrait constituer un facteur favorable au développement d'une activité protéolytique à leur niveau.

En fait, si l'on exprime la dégradation des protéines en quantité d'acides aminés libérés, tous les résultats concordent pour conclure à un faible niveau d'activité protéolytique, probablement explicable par la nature des systèmes hydrolytiques mis en jeu (LOCKER, 1960; SHARP, 1963; DAVEY et GILBERT, 1966).

Une légère augmentation de la teneur en acides aminés libres est cependant observée chez le boeuf entre 1 et 7 jours p.m (PARRISH et al., 1969; HARRINGTON et HENAHAN, 1982).

#### 4.2. Incidence de la qualité de la viande sur la solubilité des protéines

La conjonction pH bas/température élevée dénature fortement les protéines sarcoplasmiques (BRISKEY et WISMER-PEDERSEN, 1961; BENDALL et WISMER-PEDERSEN, 1962; CHARPENTIER et GOUTEFONGEA, 1963; CHARPENTIER, 1969) et affecte aussi les protéines myofibrillaires (WISMER-PEDERSEN, 1959; BENDALL et WISMER-PEDERSEN, 1962; SAYRE et BRISKEY, 1963; McLOUGHLIN, 1963; PENNY, 1969 et 1976; HONIKEL et KIM, 1986) en même temps que les membranes cellulaires (GOUTEFONGEA, 1971).

PENNY (1969) avance une dénaturation de 12% des protéines sarcoplasmiques au cours de la maturation des viandes normales tandis qu'elle atteint 28 à 45% dans le cas des viandes PSE extrêmes ( $pH_1 = 5,3$ ). KOLCZAK et al. (1970) et FISCHER et al. (1978) ont montré des différences de composition en protéines sarcoplasmiques entre les viandes normales et les viandes exsudatives. En revanche, CHARPENTIER (1969) ainsi que BORCHERT et al. (1969) n'observent pas de différence dans l'évolution des protéines sarcoplasmiques étudiées par électrophorèse sur gel d'amidon, entre les viandes PSE et les viandes normales. Par simulation de la condition PSE, c'est-à-dire par incubation 4h à 25°C d'une viande avant rigor,



20% des protéines sont insolubilisées (SAYRE et BRISKEY, 1963). Une estimation du même ordre de grandeur a été vérifiée par analyse enthalpique différentielle (HONIKEL et KIM, 1986). Cette observation est confirmée par OFFER et KNIGHT (1988), qui, dans des conditions naturelles, notent une faible fraction de protéines sarcoplasmiques dénaturées (12%) dans une viande normale contre 28 à 45% dans une viande PSE.

Certaines protéines sont particulièrement sensibles au couple température élevée/pH bas:

- la **CPK**, qui représente 10% des protéines sarcoplasmiques, est presque complètement précipitée dans les viandes PSE extrêmes (SCOPES, 1963 et 1964).
- la **phosphorylase b** devient non extractible dans les viandes PSE (FISCHER et al., 1979).
- les concentrations en **phosphoglycérate kinase** et en **lactate déshydrogénase** sont plus faibles dans les viandes exsudatives (FISCHER et al., 1978).

Les mêmes dénaturations sont observées dans une viande normale incubée à 37°C avant rigor (SCOPES, 1963).

La dénaturation des protéines sarcoplasmiques aurait plusieurs conséquences:

- diminution du pouvoir de rétention d'eau du système myofibrillaire du fait de la précipitation des protéines sarcoplasmiques sur les protéines myofibrillaires (BENDALL et WISMER-PEDERSEN, 1962). OFFER et KNIGHT (1988) proposent le mécanisme suivant : les protéines sarcoplasmiques, dans leur état natif, pénètrent le réseau de filaments; après dénaturation, ces protéines s'aggrègent aux structures qui sont exclues du réseau. Ces dernières exercent alors une pression sur les myofibrilles favorisant l'expulsion de l'eau.

OLIVER et al. (1991) estiment le pouvoir de rétention d'eau par l'intermédiaire de la détermination des protéines solubles totales à 24 h post-mortem exprimées en unités d'absorbance par gramme de viande. Des valeurs inférieures à 0,125 indiquent un mauvais PRE (BARTON-GADE, 1984). Le PRE ainsi exprimé présente une corrélation de 0,62 avec le pH<sub>1</sub> et de -0,62 avec la couleur à 24 h donnée par fibre optique (FOPu). LOPEZ-BOTE et al. (1989) ont obtenu des corrélations significatives entre la concentration en protéines sarcoplasmiques et différents critères de qualité de la viande (-0,36 et -0,59 avec les pertes en eau; -0,54 et -0,62 avec la réflectance).

- diminution de l'interaction positive protéines sarcoplasmiques - protéines myofibrillaires sur le PRE (MONIN et LABORDE, 1985).
- affaiblissement du pouvoir colorant de la myoglobine qui se traduit par un aspect plus pâle de la viande. De même, l'oxydation de la myoglobine en metmyoglobine (CHARPENTIER, 1969) entraîne le développement d'une teinte grisâtre.
- diminution du pouvoir émulsifiant.

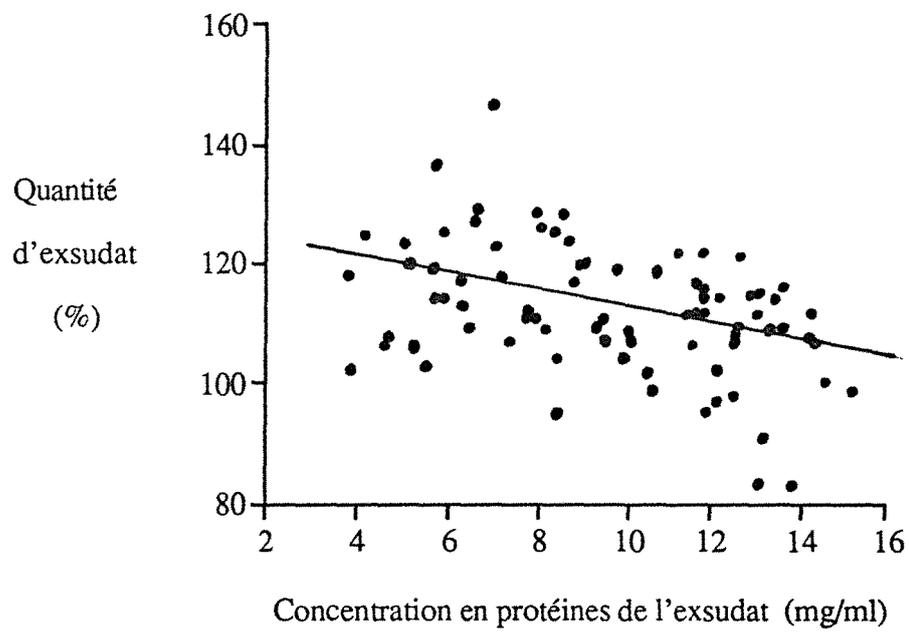


Figure 20 : Relation entre la concentration en protéines de l'exsudat et la quantité d'exsudat (SAVAGE et al., 1990)

### 4.3. Solubilisation des protéines myofibrillaires

XIONG et ANGLEMIER (1989) montrent, sur le Semitendineux de boeuf au cours du stockage (0-10 jours à 4°C), l'apparition progressive d'une protéine de 95 000 D et la présence de plus en plus marquée de trois composés de poids moléculaires supérieurs à 200 kD dans le sarcoplasme.

La "contamination" par des protéines myofibrillaires extractibles semble vraisemblable. Des protéines à forts poids moléculaires peuvent être solubilisées et relarguées des myofibrilles par le CAF (ZEECE et al., 1986b). En effet, l'apparition des trois composés à fort PM dans la fraction sarcoplasmique est étroitement liée à la dégradation des protéines myofibrillaires comme la desmine.

De façon identique, au cours de la maturation, la liaison de l' $\alpha$ .actinine avec le disque Z est affaiblie et la quantité d' $\alpha$ .actinine, extraite par un tampon de faible force ionique, tend à s'accroître (PENNY, 1980).

### 4.4. Relargage de protéines dans l'exsudat

Les mécanismes de formation et les origines de l'exsudat sont encore mal connus.

D'aucuns avancent l'hypothèse d'une origine extracellulaire de l'exsudat qui s'écoulerait dans l'axe des fibres "rétractées" (PENNY, 1975; OFFER et TRINICK, 1983). D'autres avancent que la formation d'exsudat pourrait résulter d'une redistribution de l'eau intra et extracellulaire; l'expulsion d'une partie du liquide serait la résultante d'une pression interne exercée par le tissu conjonctif et la rupture des membranes cellulaires (CURRIE et WOLFE, 1983; OFFER, 1984).

#### 4.4.1. Concentration en protéines de l'exsudat

La concentration en protéines de l'exsudat diminue lorsque la quantité d'exsudat augmente (figure 20) (PENNY, 1975, 1977; SAVAGE et al., 1990).

La gamme de concentrations en protéines de l'exsudat varie suivant les auteurs, ces différences sont imputables aux conditions de stockage de la viande : temps, température (PENNY, 1975 et 1977, EWAN et al., 1979; SAVAGE et al., 1990).

La relation négative entre la concentration en protéines de l'exsudat et la quantité d'exsudat produit pourrait s'expliquer par l'origine intracellulaire de l'exsudat dans les premiers temps de l'exsudation, puis, l'exsudation se poursuivant, par une dilution avec du liquide provenant des myofibrilles. La dénaturation spécifique de certaines protéines serait également à considérer.



#### 4.4.2. Identification des protéines de l'exsudat

Les composés protéiques de l'exsudat ont été peu étudiés jusqu'à présent.

L'exsudat est principalement d'origine sarcoplasmique (HOWARD et al, 1960; KOLCZAK et al., 1970; SAVAGE et al., 1990). Il contient, en effet, des protéines identiques à celles de l'extrait sarcoplasmique, bien que la pyruvate kinase, l'aldolase et la phosphoglucomutase y soient moins abondantes tandis que l'ensemble créatine kinase/phosphoglycérate kinase y est plus abondant. Les exsudats ressemblant le plus aux extraits sarcoplasmiques sont ceux produits en faible quantité et à forte concentration protéique.

SAVAGE et al. (1990) notent cependant dans l'exsudat la présence de trois composés (165 000, 137 000, 129 000 D) non identifiés ; deux de ces trois constituants apparaissant dans l'extrait sarcoplasmique au cours du stockage de la viande. Ces composés peuvent provenir des myofibrilles à moins qu'il ne s'agisse de groupes de protéines sarcoplasmiques non complètement dissociées.

Les protéines sarcoplasmiques sont plus concentrées dans l'exsudat (83 mg/ml) que dans le muscle (55 mg/g) (SAVAGE et al., 1990) probablement du fait de la localisation des protéines sarcoplasmiques dans la cellule musculaire (CLARKE et al., 1985; OFFER et KNIGHT, 1988).

#### 4.4.3. Variations de composition protéique de l'exsudat

Des variations dans la quantité et la composition protéique des exsudats ont été attribuées aux différents degrés de dénaturation des protéines musculaires provoquées par l'acidification post-mortem du muscle (WISMER-PEDERSEN, 1959; PENNY, 1977). Cependant, EWAN et al. (1979) n'obtiennent aucune différence de concentration en protéines et en acides aminés libres dans des exsudats de longes normales et exsudatives.

SAVAGE et al. (1990) insistent sur les variations de composition relatives au volume d'exsudat produit. La variation observée la plus importante est la diminution du rapport créatine kinase/phosphoglycérate kinase quand la quantité d'exsudat augmente. La concentration en myokinase et en protéine de PM 137 000 D (non identifiée) diminue également quand la quantité d'exsudat augmente.

Les quantités absolues de la plupart des protéines exsudées augmentent avec le volume d'exsudat mais au-delà de 12% d'exsudat produit, le rapport CK/PGAK diminue de moitié. Cependant, SAVAGE insiste sur la variabilité individuelle importante des résultats.

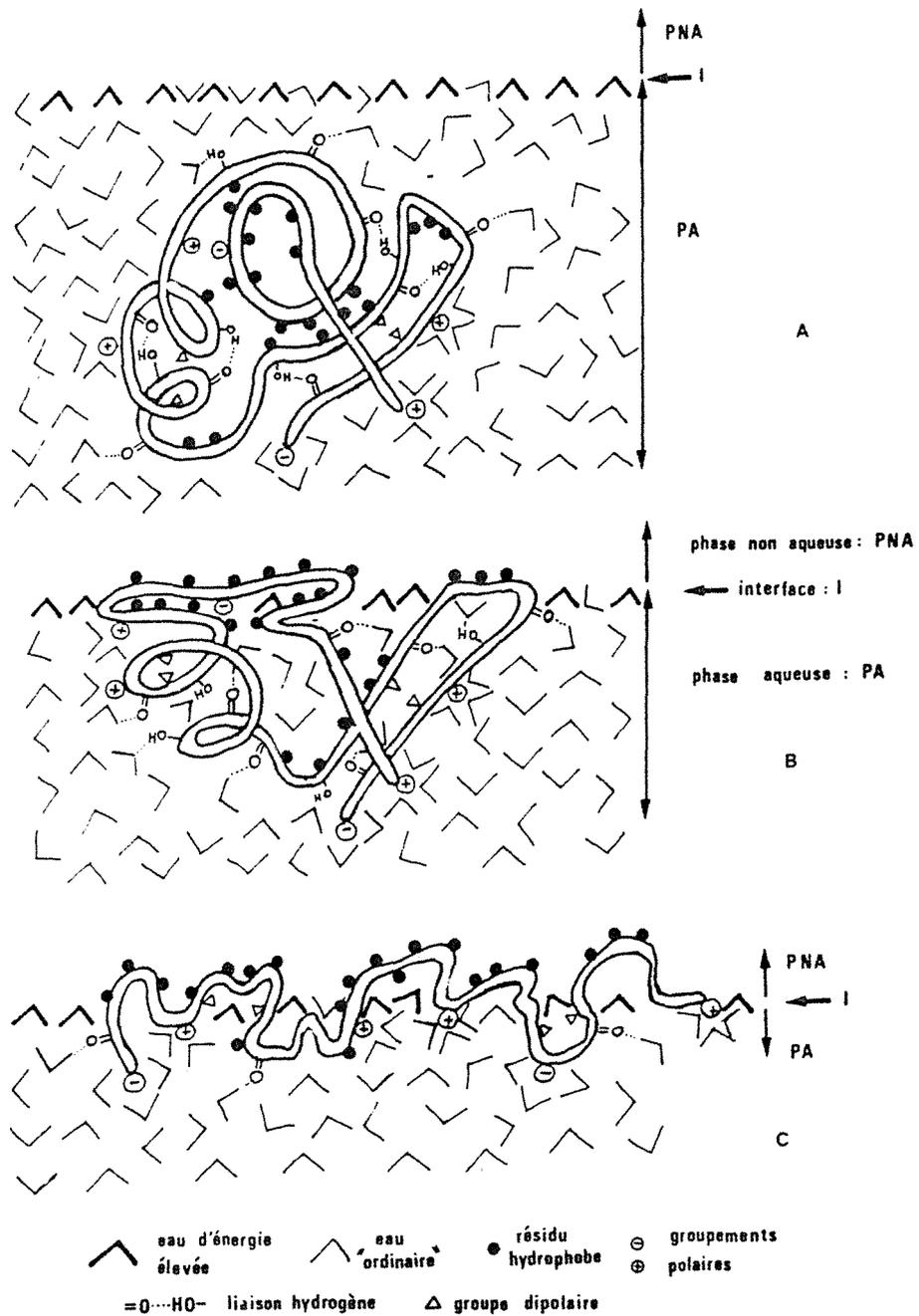


Figure 21 : Schéma de la conformation d'une protéine à une interface (d'après CHEFTEL, CUQ et LORIENT, 1985)

A: protéine globulaire native immergée dans une solution aqueuse

B: protéine globulaire au voisinage de l'interface

C : molécule protéique adsorbée, dépliée et hydratée à l'interface.

## 5. EVOLUTION DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES AU COURS DU CHAUFFAGE

### 5.1. Dénaturation thermique des protéines

La dénaturation des protéines consiste en une désorganisation progressive et rapidement irréversible de la structure moléculaire se traduisant par la rupture d'un certain nombre de liaisons, un déroulement des molécules suivi d'un réarrangement dans l'espace et de la formation de nouvelles liaisons entre les groupements réactifs libérés.

Cette dénaturation provoque notamment la baisse de solubilité des protéines résultant du démasquage de groupes hydrophobes, l'altération de la capacité de fixation d'eau ainsi que la perte de l'activité biologique.

De nombreuses protéines natives ou dénaturées ont tendance à migrer aux interfaces, les groupes hydrophiles restant dans la phase aqueuse et les groupes hydrophobes s'orientant au niveau de la phase non polaire.

#### 5.1.1. Principe de la dénaturation (d'après CHEFTEL, CUO, LORIENT, 1985)

Les molécules protéiques qui s'adsorbent aux interfaces eau/air ou eau/phase non aqueuse sont généralement dénaturées de façon irréversible (figure 21).

Pour interpréter ce phénomène, plusieurs chercheurs ont suggéré qu'il existe des molécules d'eau à des niveaux énergétiques différents:

- 1) celles, éloignées de l'interface, qui sont dans un état énergétique faible et qui inter-agissent avec les sites ioniques et polaires de la protéine, aussi bien qu'avec les autres molécules d'eau.
- 2) celles, présentes près de l'interface, qui sont dans un état énergétique élevé et qui n'inter-agissent pas avec les autres molécules.

La dénaturation protéique commence lors de la diffusion de la macromolécule vers l'interface. A ce stade, la molécule inter-agirait avec des molécules d'eau interfaciales à haut niveau énergétique, de nombreuses liaisons hydrogène intra-moléculaires seraient simultanément rompues et des "microplissements" de la structure se produiraient (Figure 21B). Au stade suivant, la protéine partiellement déroulée est hydratée et activée (P\*) et devient très instable car de nombreux groupements hydrophobes sont présents dans la phase aqueuse. C'est par un déroulement et un étirement ultérieurs de la protéine à l'interface que les résidus hydrophiles et hydrophobes se répartissent respectivement dans les phases aqueuse et non aqueuse. La protéine ainsi adsorbée à la surface est dénaturée.



La dénaturation peut se schématiser en deux étapes:



avec  $P_n$  : protéine native

$P^*$  : protéine hydratée activée

$P_d$  : protéine dénaturée

$H_2O^*$  : eau à énergie élevée

### 5.1.2. Energétique de la dénaturation

La dénaturation des protéines par la chaleur peut être décrite comme une réaction du premier ordre. La constante d'équilibre peut s'écrire  $K_D = (P_d)/(P_n)$

Les principes de la thermodynamique définissent l'énergie d'activation ( $E_a$ ) par

$$E_a = \Delta H_A + RT \text{ avec } d(\ln K_D)/dT = E_a/RT^2 \text{ (loi de Vant Hoff)}$$

avec  $R$  : constante des gaz parfaits et  $\Delta H_A$  : variation d'enthalpie libre

La dénaturation thermique des protéines est caractérisée par une énergie d'activation très élevée, le taux de dénaturation varie rapidement en fonction de la température.

Un homogénat musculaire contient plusieurs protéines, caractérisées chacune par une énergie d'activation et, de ce fait, par une courbe de dénaturation. La solubilité globale des protéines de l'extrait musculaire résulte du comportement individuel de chaque protéine et des concentrations relatives dans l'extrait.

### 5.2. Différents modes de traitement thermique

La technique consistant à plonger des échantillons dans un bain-marie maintenu à ébullition et à les en retirer quand la température à coeur atteint la température souhaitée, génère des gradients de température relativement importants au sein de l'échantillon. Des différences de température pouvant atteindre 45°C ont été observées sur des échantillons portés à coeur à 40°C dans un bain-marie dont la température est maintenue à 88°C (PARSONS et PATTERSON, 1986). Par ailleurs, la conduction thermique dans la viande est telle que, dans un échantillon retiré d'un bain-marie à 88°C et immédiatement placé en refroidissement sous eau froide, la température continue de s'élever jusqu'à 60°C pour un échantillon porté initialement à 50°C à coeur et jusqu'à 66°C pour un échantillon porté initialement à 60°C à coeur.

Bien que le bain-marie soit le plus souvent utilisé dans les études thermiques, certains auteurs utilisent le chauffage par micro-ondes. Pour une même température, le traitement par micro-



ondes provoque moins de modifications dans la viande qu'un chauffage par conduction. En effet, les micro-ondes génèrent une élévation de température beaucoup plus rapide (5 à 10 fois plus rapide suivant la géométrie de l'échantillon) (KIEREBINSKI, 1969) dans l'échantillon, et de ce fait, pour une température finale identique, c'est le facteur durée de chauffage \* température qui détermine l'amplitude de la dénaturation thermique (ROBERTS et LAWRIE, 1974).

Le chauffage peut être pratiqué directement sur un échantillon de viande (DAVIS et ANDERSON, 1984; McCORMICK et al., 1987; COLLINS et al., 1991a et b) ou sur l'extrait musculaire après filtration (SPANIER et al., 1990; STALDER et al., 1991). Toutefois, le broyage de la viande et l'extraction des protéines sarcoplasmiques à partir de la viande cuite sont la cause de variations d'appréciation dans la concentration en protéines sarcoplasmiques. La méthode consistant à chauffer directement les extraits de protéines sarcoplasmiques est reproductible et permet d'obtenir des échantillons plus représentatifs (SPANIER et al., 1990). Il semble, par ailleurs, que les protéines in situ soient "protégées" de la coagulation thermique: les protéines en solution dans l'homogénat sont plus sensibles à l'élévation de température que lorsqu'elles sont incluses dans la masse musculaire.

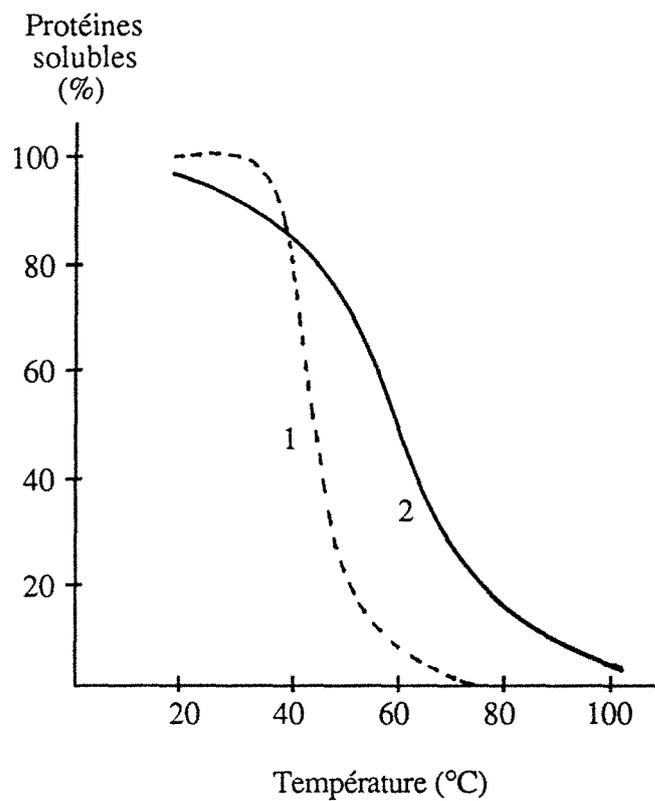
L'analyse enthalpique différentielle est basée sur l'étude des transferts thermiques que subit un échantillon porté à des températures croissantes. Cette technique mesure le flux de chaleur nécessaire au maintien d'un échantillon et d'une référence inerte à la même température alors que la température des deux s'accroît de manière progressive et linéaire. Tout changement thermique induit dans l'échantillon, soit positif soit négatif, est enregistré sur un thermogramme qui permet de déterminer les critères physicochimiques tels que l'enthalpie, la température de transition et les changements de capacités calorifiques. Cette technique ne nécessite qu'un échantillon de petite taille (15mg).

WRIGHT et al. (1977) ont montré que le muscle de lapin produisait trois pics correspondant respectivement à la dénaturation de la myosine, des protéines sarcoplasmiques et de l'actine.

Il existe également une possibilité d'évaluer, par dosage immunochimique, de façon précise et rapide les températures de chauffage auxquelles ont été soumises les protéines solubles du muscle (LEVIEUX et al., 1990, pour la lactate déshydrogénase).

### **5.3. Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques**

La contribution des protéines sarcoplasmiques à la texture de la viande cuite est discutable dans la mesure même où elles sont hydrosolubles (JALANG'O et al., 1987). De fait, elles ont fait l'objet de peu d'intérêt in situ à l'exception de leur rôle de référence pour le contrôle de la



1 : solubilité de la myosine  
2 : solubilité des protéines sarcoplasmiques

Figure 22 : Evolution de la solubilité des protéines musculaires au cours du chauffage (DAVEY et GILBERT, 1974)

température atteinte par un produit. Il existe, en effet, peu de travaux sur le comportement individuel des protéines sarcoplasmiques chauffées in situ.

### 5.3.1. Solubilité globale

Globalement la solubilité des protéines diminue quand la température augmente (ACTON, 1972 : figure 22).

La solubilité des protéines myofibrillaires diminue brutalement entre 55° et 60°C alors que la diminution de celle des protéines sarcoplasmiques est plus progressive: elle commence dès 40°C et n'est pas encore complète à 100°C (DAVEY et GILBERT, 1974).

LAROCHE (1981), pour des chauffages d'une minute à différentes températures, observe une augmentation de solubilité de la matière sèche jusqu'à 60°C et une diminution entre 60 et 80°C. A partir de 45°C, les protéines sarcoplasmiques commencent à être dénaturées ce qui se traduit par le déplissement des hélices alpha, stabilisées en partie par des liaisons hydrogène et ioniques. Dans ces conditions, on observe l'agrégation et parfois la coagulation des protéines.

PARSONS et PATTERSON (1986), par analyse enthalpique différentielle, observent une légère amélioration de la solubilité des protéines sarcoplasmiques entre 20 et 45°C puis une diminution progressive jusqu'à 72,5°C. A 62,5°C, 50% des protéines ont précipité tandis qu'à 72,5°C, plus aucune protéine n'est soluble.

Au cours du chauffage par conduction 20 min à 65°C d'un échantillon de longissimus dorsi de boeuf, toutes les protéines sarcoplasmiques ont précipité, à l'exception de la myoglobine dénaturée à 75°C (ROBERTS et LAWRIE, 1974).

COLLINS et al. (1991a), sur le semi-membraneux de boeuf, observent une diminution de la concentration en protéines solubles de 56,2% à 55°C; 59,6% à 60°C; 80,4% à 63°C et de 85,8% à 66°C par rapport à l'extrait non chauffé.

La perte de solubilité des protéines a été étudiée par HAMM et DEATHERAGE (1960), TRAUTMAN (1966), COHEN (1969), CRESPO et OCKERMAN (1977), CHENG et PARRISH (1979) comme indice de dénaturation thermique des protéines sarcoplasmiques extraites par l'eau ou par des solutions salines de faible force ionique.

La détermination des protéines non dénaturées dans un échantillon de viande chauffée a été exploitée comme base d'une méthode (test de coagulation) permettant de déterminer la température maximale atteinte par la viande. La possibilité d'apprécier le traitement thermique antérieur d'un produit carné présente, en effet, un vif intérêt dans l'industrie de la viande puisque le traitement thermique permet, outre le développement des qualités organoleptiques du produit, de prévenir tout développement bactérien.

Le test de coagulation (USDA-FSIS, 1981) consiste à estimer la température maximale atteinte par une viande préalablement chauffée par détermination de la température pour laquelle les premiers signes de turbidité apparaissent lors du rechauffage de l'extrait filtré d'un produit



cuit. La subjectivité de l'appréciation du point de coagulation, température à partir de laquelle l'extrait apparait trouble, limite cependant la fiabilité de ce test (TOWNSEND et al., 1984). DAVIS et ANDERSON (1983) remarquent que des extraits musculaires, obtenus à partir de viande préalablement chauffée à différentes températures, chauffés 15 min à 70°C présentent une teneur stable en protéines solubles Biuret-positives (2,07 mg), quelle que soit la température de chauffage préalable. Ces auteurs proposent un test consistant à chauffer un extrait musculaire préparé à partir d'une viande déjà traitée thermiquement et à établir le rapport  $r = (\text{concentration en protéines sarcoplasmiques de l'extrait chauffé à } T) / (\text{concentration en protéines sarcoplasmiques de l'extrait chauffé 15 min à } 70^\circ\text{C})$  permettant d'apprécier la température à laquelle la viande a été chauffée au préalable ( $r = 4,89$  pour  $T = 50^\circ\text{C}$ , ou encore  $r = 1,09$  pour  $T = 70^\circ\text{C}$ ).

### 5.3.2. Sensibilité thermique des protéines

Les résultats diffèrent suivant les auteurs : les températures d'insolubilisation sont fonction à la fois du mode de préparation de l'échantillon et du mode de chauffage.

OKAYAMA et al. (1991), en travaillant sur un extrait musculaire contenant beaucoup de sels, ont montré qu'à 70°C la phosphoglucomutase, la pyruvate kinase, la créatine kinase et l'aldolase sont encore solubles, tandis qu'à 80°C, toutes les protéines sont insolubilisées. De même, McCORMICK et al. (1987) ont montré que la pyruvate kinase, la lactate déshydrogénase et la myoglobine sont encore solubles après chauffage à 70°C d'un échantillon de muscle. CALDIRONI et BAZAN (1980) détectent encore la myoglobine après maintien à 68°C.

Suivant le mode de chauffage, à 70-80°C, il n'y a plus aucune protéine en solution.

La **myoglobine** semble affectée par la présence de protéines de plus faible stabilité thermique. Sa dénaturation en présence de sérum albumine bovine se fait à une température inférieure à sa température propre de dénaturation (LEDWARD, 1978). Par ailleurs, la myoglobine supporte des températures plus élevées en solution que in situ (BERNOFSKY et al., 1959).

La **créatine phosphate kinase** a été beaucoup étudiée car c'est une enzyme particulièrement sensible à la dénaturation thermique (SCHWARZ, 1973). Une incubation d'une heure à 30°C et pH 5.0 d'une solution de CPK purifiée altère en grande partie l'activité de l'enzyme (KUBY et al., 1954). In situ, l'incubation du muscle à 37°C, pH 5.5 durant quelques heures entraîne une dénaturation quasi totale de la CPK telle qu'elle n'est plus extractible à pH 7.0 (SCOPES, 1964). La cinétique de dénaturation de la CPK suit une cinétique du premier ordre (SCOPES, 1964); sa dénaturation est étroitement dépendante du pH, la diminution d'une unité de pH augmentant la dénaturation de 2500 fois.



L'activité enzymatique décroît avec la température. Suivant les enzymes et les températures de traitement, cette diminution d'activité est imputable à une diminution de solubilité des protéines sarcoplasmiques et/ou à la dénaturation de l'enzyme considérée.

COLLINS et al. (1991a) notent une diminution d'activité de 26,6% à 55°C, 77,1% à 63°C et 95,5% à 66°C de la **lactate déshydrogénase** contenue dans un extrait de muscle de boeuf. Les activités mesurées dans la viande crue sont variables suivant les auteurs, bien que les résultats concordent avec l'inactivation totale de la LDH bovine après un équilibre à 66-68°C (SPANIER et al., 1990; COLLINS et al., 1991a; STALDER et al., 1991).

#### 5.4. Evolution du pH de la viande

La cuisson de la viande s'accompagne d'une augmentation de quelques dixièmes d'unité du pH de la viande et du point isoélectrique des protéines (HAMM et DEATHERAGE, 1960; ASHGAR et PEARSON, 1980; LAROCHE, 1981). HAMM et IWATA (1962) indiquent que l'élévation de pH est surtout importante jusqu'à 70°C et que la durée de chauffage ait peu d'influence. LAWRIE et PARSONS (1974) notent une diminution du pH après 80°C sur le longissimus de boeuf.

La valeur initiale du pH de la viande joue un rôle controversé sur la variation du pH au cours du chauffage:

- SAVIC et KARAN-DJURDJIC (1955) notent une élévation du pH lorsque le pH de la viande crue est inférieur à 6,4 et une diminution dans le cas contraire.
- BOUTON et al. (1971) et HAMM et DEATHERAGE (1960) avancent que le pH augmente avec la température quand le pH est inférieur à 5,6 et que cette augmentation diminue avec l'élévation du pH initial.
- Cependant, deux échantillons provenant du même morceau de viande peuvent présenter après chauffage des différences de l'ordre de 0,2 unité pH (LAROCHE, 1981).

Les phénomènes fondamentaux impliqués dans l'augmentation du pH sont encore mal élucidés. L'augmentation du pH pourrait être attribuée au démasquage de groupements basiques (groupement imidazole de l'histidine) au cours de la dénaturation et du changement de conformation de l'actomyosine (SHERMAN, 1961; HAMM, 1966).



## **CONCLUSIONS DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL**

Les défauts de qualité de la viande de porc observés ces dernières années sont imputables pour une part à la génétique et pour une autre part aux conditions de pré-abattage et de refroidissement des carcasses.

Notre objectif consiste à rechercher un prédicteur de la qualité de la viande de porc qui soit utilisable en sélection; ce qui revient à mettre au point une méthode de détermination pratiquée sur le muscle vivant qui permette de présumer de la qualité ultime de la viande.

L'étude bibliographique nous a permis de faire le point sur l'évolution des protéines musculaires de la viande après l'abattage et de préciser les différences de comportement des protéines suivant la qualité de la viande.

Les protéines myofibrillaires sont responsables des principales modifications de la structure musculaire au cours de la conservation :

- destruction progressive des stries Z et exclusion de l' $\alpha$ .actinine (KOOHMARAIE et al., 1983; BECHTEL et PARRISH, 1983)
- protéolyse de la troponine T avec production d'un fragment de 30 000 D (McBRIDE et PARRISH, 1977; OLSON et al., 1977; PARRISH et al., 1981)
- fragilisation globale de la structure myofibrillaire avec amélioration de la tendreté.

Ces transformations ont le plus souvent été mises en évidence sur le muscle de boeuf.

L'évolution des protéines sarcoplasmiques apparait modérée dans le cas des viandes normales. L'insolubilisation, qui peut atteindre néanmoins 10% dans ce cas, est beaucoup plus marquée dans le cas des viandes exsudatives (40 à 50% de protéines insolubilisées suivant les auteurs) (PENNY, 1969; OFFER et KNIGHT, 1988; SPANIER et al., 1990). Cependant, ce résultat est controversé : CHARPENTIER et al. (1969), BORCHERT et al. (1969) et WHITAKER et al. (1970) n'observent aucune différence de solubilité des protéines sarcoplasmiques suivant la qualité de la viande.



Par ailleurs, le passage en solution de protéines d'origine myofibrillaire, comme l'  $\alpha$ .actinine ou certaines protéines de poids moléculaire supérieurs à 200 kD, reste à confirmer sur le muscle de porc.

Au cours du chauffage modéré d'un échantillon de viande, la solubilité des protéines sarcoplasmiques diminue dès 40°C (DAVEY et GILBERT, 1974). Suivant les conditions de chauffage et d'extraction des protéines, 50% des protéines précipitent vers 60°C (PARSONS et PATTERSON, 1986; McCORMICK et al., 1987; COLLINS et al., 1991); l'insolubilisation est totale vers 75-80°C (CALDIRONI et BAZAN, 1980; DAVIS et ANDERSON, 1983; PARSONS et PATTERSON, 1986; OKAYAMA et al., 1991). Parallèlement, le pH augmente de quelques dixièmes alors que la température s'élève (HAMM et DEATHERAGE, 1960; ASHGAR et PEARSON, 1980; LAROCHE, 1981).

La créatine phosphate kinase se présente comme une enzyme très sensible à la chaleur (SCOPES, 1964; SCHWARZ, 1973) alors que la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase semblent plus thermostables (McCORMICK et al., 1987; OKAYAMA et al., 1991).

Les modifications des protéines ont été principalement étudiées sur les viandes normales et sur les viandes exsudatives. Cependant la caractérisation des viandes acides est récente (MONIN et al., 1986) et des confusions ont été faites par le passé entre viandes acides et viandes exsudatives. Par ailleurs, peu de travaux portent sur les protéines des viandes DFD. C'est pourquoi il apparaît intéressant de caractériser les protéines sarcoplasmiques des viandes de porc de qualités différentes. Nous avons souhaité préciser les résultats de LOPEZ-BOTE et al. (1989) qui obtiennent des concentrations en protéines sarcoplasmiques significativement différentes entre les viandes DFD (77,6 mg/g) les viandes normales (65,6 mg/g) et les viandes exsudatives (55,2 mg/g).

Il faut signaler également que les protéines sarcoplasmiques, beaucoup étudiées dans les années 70, reviennent au goût du jour du fait des progrès apportés aux techniques analytiques (analyse enthalpique différentielle, immunochimie, HPLC) et des nouvelles préoccupations dans le contrôle de la qualité des viandes (recherche d'indicateurs de chauffage notamment).

La situation des porcs France-Hybrides sur le marché de la viande en 1988 a conduit SANDERS à orienter cette étude préférentiellement vers la caractérisation des viandes exsudatives. Lorsque les conditions opératoires nous l'ont permis, nous avons cependant essayé d'étendre nos observations aux autres défauts qualitatifs.



Nous garderons toujours à l'esprit la nécessité de développer des techniques simples et rapides dans l'optique d'adapter nos méthodes à des déterminations pratiquées à partir de biopsies.

Après avoir exposé les différentes techniques développées dans cette étude, nous préciserons dans une première partie la technique de séparation adoptée pour l'étude des protéines sarcoplasmiques. Dans une deuxième partie, nous ferons le point sur la relation entre la concentration en protéines sarcoplasmiques et des critères de qualité de la viande. Nous préciserons, dans une troisième partie, l'évolution des protéines sarcoplasmiques au cours d'une conservation à 4°C en comparant viandes normales et viandes exsudatives. Dans une quatrième partie, nous compléterons nos résultats par l'étude des protéines sarcoplasmiques au cours du chauffage pour voir dans quelle mesure un traitement thermique exacerbe les phénomènes mis en évidence au cours du stockage.



**MATERIEL**

**METHODES**



## **1. Matériel animal**

Les porcs utilisés pour l'étude de la relation entre la concentration en protéines sarcoplasmiques et les critères de qualité de la viande sont des animaux France-Hybrides de souche pure (Large-White, Hampshire synthétiques, Landrace et Piétrain) qui ont été abattus à l'abattoir municipal de Nevers. L'anesthésie est pratiquée par électronarcose à bas voltage, suivie d'une saignée verticale. En fin de chaîne, les carcasses sont réfrigérées à 2°C. La découpe a lieu 24 heures après l'abattage.

Les viandes utilisées pour la comparaison viandes normales / viandes exsudatives proviennent de porcs charcutiers d'origine génétique non connue, abattus à Compiègne (abattoir VIVAL) dans des conditions identiques à celles rencontrées à l'abattoir de Nevers. Les animaux sont sélectionnés sur la base de la mesure du pH à 45 minutes. Un échantillon de longe est alors prélevé puis transporté en glacière au laboratoire pour analyses.

Les viandes utilisées pour la mise au point des techniques proviennent également de porcs abattus à Compiègne.

## **2. Prélèvements et mesures**

### **2.1. Prélèvements**

Pour les porcs abattus à Nevers, les prélèvements de longe sont pratiqués au moment de la découpe à 24h post-mortem.

A réception au laboratoire, la viande est désossée, débarassée du gras et du conjonctif qui l'entourent; seul le maigre de la noix de côtelette, correspondant au longissimus dorsi, est conservé.

Une tranche de 100 g est mise de côté pour la détermination des pertes au stockage.

Le reste de la viande est hachée au hachoir Moulinex (diamètre des trous de la grille 3 mm). L'utilisation de ce type d'appareil permet d'obtenir des hachages reproductibles quelle que soit la quantité de viande disponible. Cette notion de reproductibilité est extrêmement importante car il n'existe pas de critère permettant de caractériser le degré de hachage d'une viande, autre que le diamètre des trous de la grille. La viande hachée est ensuite mélangée manuellement à 4°C; 6 g sont prélevés pour la mesure du pouvoir de rétention d'eau, le reste est conservé à



l'état congelé à -20°C. Pour les besoins des analyses, les échantillons sont décongelés en une nuit à 4°C.

Pour les porcs abattus à Compiègne, les échantillons sont prélevés au bout d'une heure post-mortem, alors que la température de la longe est encore de l'ordre de 38°C. Les échantillons sont transportés au laboratoire en glacière; après parage, la viande est hachée et conservée à 4°C pour l'étude du comportement des protéines sarcoplasmiques au cours du stockage et du chauffage.

## 2.2. Mesures

Systématiquement, sur tous les animaux étudiés, le pH et la conductivité sont mesurés à 1h, 3h et 20h p.m dans le longissimus dorsi au niveau de la 3-4<sup>ème</sup> dernière côte.

Le pH est mesuré avec un pHmètre portatif Knick 752 muni d'une électrode INGOLD à Xérolyt introduite directement dans la masse musculaire. Le pH correspond à la moyenne de deux ou trois mesures effectuées sur le même site.

La conductivité est déterminée avec un conductimètre WTW suivant la même technique. Les valeurs sont exprimées en mS/cm.

La couleur est appréciée, sur la longe fraîchement coupée à 24 h post-mortem, par comparaison visuelle avec les étalons de la palette japonaise, numérotés de 1 (rose très pâle) à 6 (rouge foncé).

## 3. Extraction et séparation des protéines

### 3.1. Choix du milieu d'extraction

Les protéines sarcoplasmiques sont solubles dans des solutions de faible force ionique.

Nous avons comparé l'efficacité de trois extractants relevés dans la littérature :

- eau distillée
- tampon bicarbonate 3mM contenant du KCl 0,1M (force ionique 0,1)
- tampon phosphate 0,025M pH 7,4 (force ionique 0,1)

Les protéines sarcoplasmiques ainsi extraites sont rapportées aux protéines solubles totales extraites par une solution tampon phosphate 0,1M pH 7,4 contenant de l'iodure de potassium 1,1M (HELANDER, 1957; BARTON-GADE, 1980).

A partir d'un échantillon de viande hachée, 5 extractions sont réalisées avec chaque solution d'extraction : 10g de viande dans 25 ml de solution sont homogénéisés à l'Ultra-Turrax à froid (27 000 t/min) en 3 périodes de 20 secondes entrecoupées par une pause de 10 secondes.



Une filtration sur filtre plissé (Durieux n° 1B) permet la récupération d'un homogénat limpide de couleur rose. On détermine la teneur en protéines par la méthode BCA.

### 3.2. Optimisation de la méthode d'extraction des protéines de la phase aqueuse

Après la phase d'homogénéisation de la viande dans l'eau, il faut une étape de séparation pour éliminer gras et particules grossières et récupérer la phase liquide contenant les protéines sarcoplasmiques.

Sur 10 extraits différents, deux méthodes sont comparées :

- filtration sur filtre DURIEUX 1B
- centrifugation pendant 30 min à 2 000g et à 4°C.

### 3.3. Influence de la durée et de la température sur le rendement d'extraction

10g de viande hachée sont homogénéisés à l'Ultra-Turrax dans 25 ml d'eau; après 0, 15, 30 min et 1h d'incubation, l'homogénat est filtré à la température de conservation. Deux températures sont expérimentées: température ambiante et 4°C. Les protéines solubles sont déterminées sur le filtrat.

Cette opération est répétée 5 fois à partir d'un même morceau de viande.

## 4. Méthodes de dosage

### 4.1. Dosage des protéines sarcoplasmiques

#### 4.1.1. Méthode de LOWRY- CIOCALTEU

Il s'agit de la méthode de LOWRY (LOWRY et al., 1951) modifiée par OYAMA et EAGLE (1956) et ITZHAKI et GILL (1964); elle est basée sur deux réactions complémentaires.

- Principe : formation d'un complexe coloré entre cuivre et liaisons peptidiques d'une part et réduction de l'acide phosphomolybdique-phosphotungstique par les amino-acides aromatiques d'autre part.

Une courbe d'étalonnage est établie pour chaque dosage parce que le réactif n'est pas stable et que la coloration finale s'en trouve modifiée.

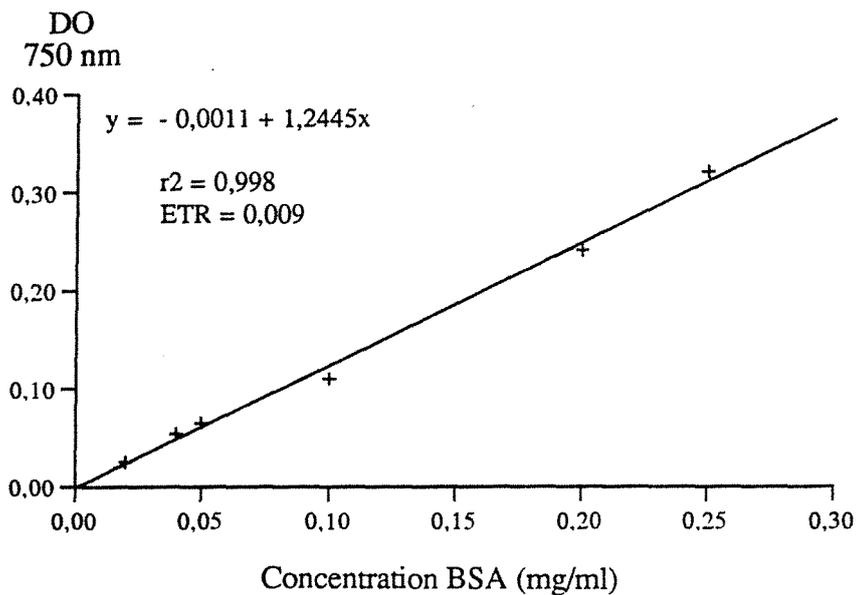


Figure 23: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines selon la méthode LOWRY.  
Protéine témoin Sérum Albumine Bovine

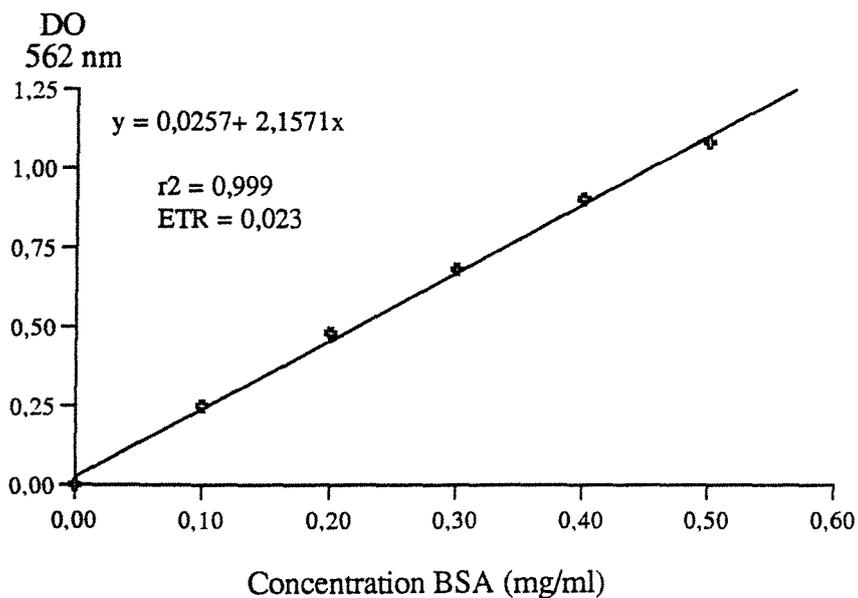


Figure 24: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines selon la méthode BCA.  
Protéine témoin Sérum Albumine Bovine

- Réactifs :

1. Solution de carbonate de sodium alcalin (20g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans 0,1 mol/l de soude).
2. Solution de sulfate de cuivre et de tartrate double de sodium et de potassium (5 g/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans une solution de tartrate de sodium et de potassium à 10 g/l).
3. "Solution alcaline" préparée extemporanément par mélange de 50 ml de (1) et de 1 ml de (2).
4. Réactif de Folin-Ciocalteu MERCK 9001 dilué au demi (mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans l'acide phosphorique et l'acide chlorhydrique).
5. Solution de sérum albumine bovine (BSA) pour la gamme étalon.

- Méthode : 5 ml de solution alcaline sont ajoutés à 1 ml de la solution à doser. Après agitation suivie d'un temps de repos de 10 min, on ajoute 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué. Après 30 min à température ambiante, l'absorbance est lue à 750 nm contre un témoin réactif. La concentration en protéines est déterminée d'après la courbe d'étalonnage obtenue avec la BSA (figure 23).

4.1.2. Méthode au BCA (réactif commercialisé par PIERCE Ref. 23225)

- Principe : l'acide bicinchoninique, sous forme de sel de sodium hydrosoluble, est un réactif sensible, stable et hautement spécifique de l'ion cuivreux  $\text{Cu}^+$  (SMITH et al., 1985).

La méthode à l'acide bicinchoninique allie la réaction du Biuret (protéines réagissant avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$  en milieu alcalin avec production de  $\text{Cu}^+$ ) à une détection efficace du  $\text{Cu}^+$ .

L'interaction de 2 molécules de BCA avec un ion cuivreux forme un produit violet, soluble dans l'eau, présentant une absorbance élevée à 562 nm. Cette réaction colorée implique particulièrement 4 acides aminés: cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine (WIECHELMAN et al., 1988).

Le développement de la réaction colorée permet la quantification spectrophotométrique des protéines en solution.

- Réactifs :

Le réactif est préparé extemporanément par mélange à température ambiante de 100 ml de réactif basique à 2 ml de solution de sulfate de cuivre 4%. Le réactif basique fourni par PIERCE est composé de carbonate de sodium, de bicarbonate de sodium, de tartrate de sodium et du réactif de détection de l'acide bicinchoninique en solution dans la soude 0,2N.

- Méthode : 0,1 ml de solution protéique sont pipetés dans 2 ml de réactif. Après comparaison des 3 méthodes proposées: 30 min à 37°C, 2 h à température ambiante ou 30 min à 60°C, nous avons opté pour l'incubation durant 30 min à 37°C. Les tubes sont ensuite refroidis dans un bain de glace et l'absorbance est lue à 562 nm contre un blanc réactif dans un



délai de 15 min après la fin de la réaction. La concentration en protéines est déterminée à partir de la régression de la courbe d'étalonnage obtenue avec de la sérum albumine bovine (figure 24). Après vérification, la couleur développée pendant la réaction avec le BCA est stable durant une heure après sortie du bain-marie. Les lectures des tubes sont faites au bout de 15 min après la fin de la réaction.

#### 4.2. Dosage de l'azote $\alpha$ .aminé

Dans le but de quantifier la protéolyse subie par les protéines sarcoplasmiques, on soumet l'homogénat obtenu dans les conditions décrites au paragraphe 3 à l'ultrafiltration sur membrane AMICON de seuil de coupure 10 000 D, ce qui permet la récupération d'un ultrafiltrat composé d'un milieu musculaire intracellulaire soluble dans l'eau, débarrassé de toutes ses protéines.

L'ultrafiltrat, limpide, contient les acides aminés libres du muscle.

L'ultrafiltration est développée suivant le procédé Centriprep (AMICON) - système qui permet par centrifugations successives (1 500g 20 min à 4°C) de récupérer 11 ml d'ultrafiltrat et 1 ml de rétentat à partir de 12 ml d'homogénat.

L'ultrafiltrat obtenu est dilué 100 fois avant dosage spectrophotométrique de l'azote  $\alpha$ .aminé par la méthode de HABEED (1966). Les groupements  $\alpha$ .aminés libres sont dérivés par réaction avec l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) et déterminés spectrophotométriquement en milieu aqueux à 335 nm.

Réactifs:         $\text{NaHCO}_3$  4% (p/v) pH 8,5  
                      Acide trinitrobenzène sulfonique (Sigma Ref. P2297) en solution aqueuse (0,1 %)  
                      Solution aqueuse de méthionine 1g/l

Protocole:        1 ml solution acides aminés  
                      + 1 ml  $\text{NaHCO}_3$  4% (p/v)  
                      + 1 ml TNBS 0,1% (p/v)  
                      Incubation 2h à 40°C pour le développement de la couleur jaune.  
                      Lecture de l'absorbance à 335 nm contre un blanc réactif.

La courbe d'étalonnage est établie à partir de solutions aqueuses de concentration connue en méthionine (figure 25).



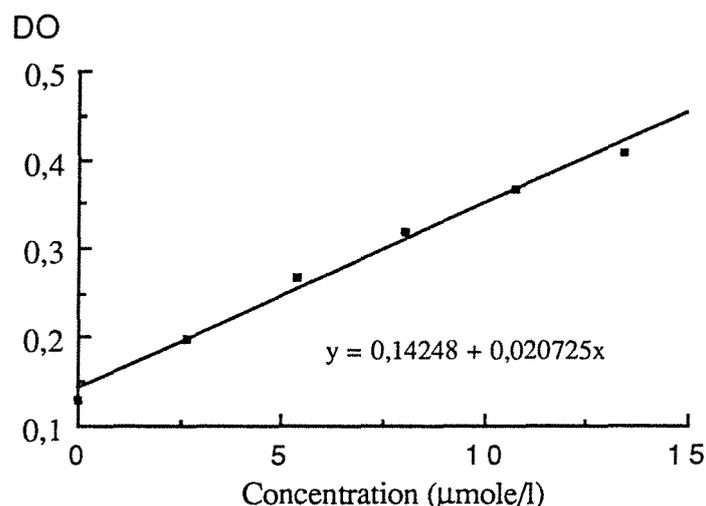


Figure 25 : Courbe d'étalonnage obtenue avec la méthionine pour le dosage des acides aminés à l'acide trinitrobenzène sulfonique  $\lambda_{\max} = 335 \text{ nm}$

## 5. Séparation des protéines

Les études chromatographiques sont pratiquées sur une chaîne HPLC KONTRON system-400 comprenant 2 pompes, un injecteur automatique, un détecteur UV; ces périphériques sont pilotés par une unité centrale équipée d'un logiciel d'intégration.

Compte tenu des progrès techniques réalisés sur les supports de silice, les systèmes de greffage et les phases, les colonnes de perméation gel permettent une séparation rapide (10-20 min) suivant le poids moléculaire des protéines (TOSTE, 1980; HIMMEL et SQUIRE, 1981).

### 5.1. Chromatographie d'exclusion des protéines

Deux types de colonnes ont été expérimentés:

- TSK G2000SW
- TSK G3000SW

Ces colonnes sont des TSK type SW, il s'agit de supports macroporeux formés de particules de silice rigides, sphériques, hydrophiles, de diamètre 10  $\mu\text{m}$  (fabricant TosoHaas). La rigidité des particules assure une excellente stabilité mécanique à la colonne. Le matériau de remplissage de la colonne est chimiquement stable et inerte, l'absence de groupes actifs en surface minimise la dénaturation en cours de chromatographie et assure une récupération importante des protéines. Le volume des pores représente environ 50% du volume total du gel, ce qui assure une bonne sélectivité.

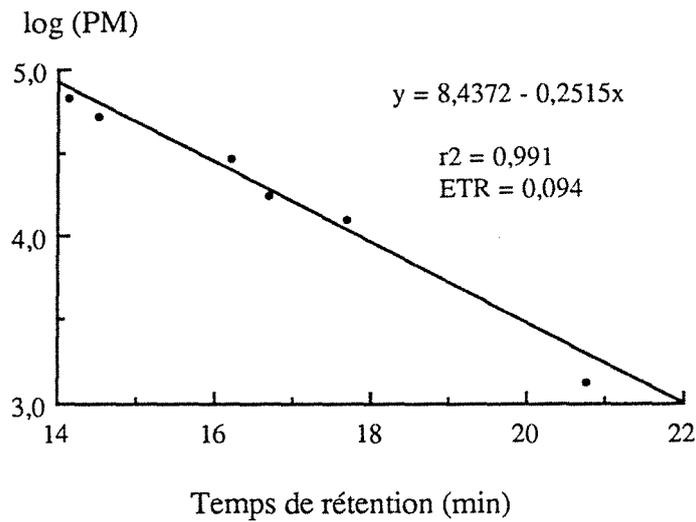


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de la colonne TSK G2000SW  
 Tampon phosphate M/15 pH6,8 + NaCl 0,1M + 0,03% NaN<sub>3</sub>  
 Débit 0,5 ml/min Détection UV 280 nm

Protéines de référence : sérum albumine bovine, triose phosphate isomérase, anhydrase carbonique, myoglobine, cytochrome C, vitamine B12

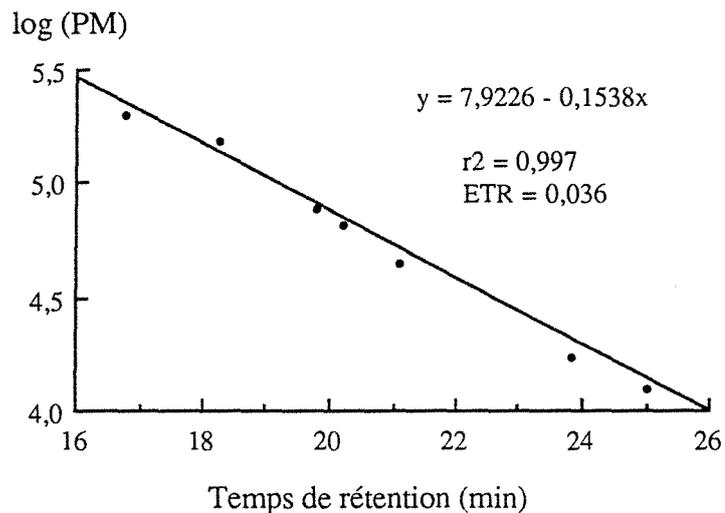


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de la colonne TSK G3000SW  
 Tampon phosphate M/15 pH6,8 + NaCl 0,1M + 0,03% NaN<sub>3</sub>  
 Débit 0,5 ml/min Détection UV 280 nm

Protéines de référence : b.amylase, alcool déshydrogénase, ovotransferrine, sérum albumine bovine, ovalbumine, myoglobine, cytochrome C

Les premiers essais ont été effectués sur une colonne alors disponible, une G2000SW (LKB), de dimensions 0,75\*30cm, de diamètre des pores 12,5 nm, bien que la gamme des poids moléculaires annoncée par le fournisseur (1 000 D à 50 000 D) ne convienne pas spécifiquement aux protéines sarcoplasmiques.

Par la suite, nous avons expérimenté une colonne G3000SW (fournisseur Société Française de Chromatographie sur Colonne), de dimensions identiques à la G2000SW, qui couvre une plage de poids moléculaire plus étendue.

Nous avons travaillé en élution isocratique avec pour phase mobile un tampon phosphate (M/15) pH 6,8 contenant 0,10M de NaCl et 0,03% d'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), pour éviter tout développement bactérien dans la colonne. Débit 0,5 ml/min. Les protéines sont détectées à 280 nm.

Les caractéristiques du programme utilisé pour le fractionnement sur G2000SW sont les suivantes :

Débit 0,5 ml/min

Détection 280 nm

Elution durant 30 min

Température ambiante

Le programme du fractionnement sur G3000SW est le même que sur G2000SW avec un temps d'élution porté à 40 min.

La colonne est équilibrée par passage du tampon à température ambiante avant l'injection des extraits protéiques musculaires; l'injection est réalisée par l'injecteur automatique avec un volume de 20  $\mu\text{l}$ .

Les poids moléculaires apparents sont déterminés d'après la courbe d'étalonnage obtenue à partir de standards de poids moléculaires connus (tableau 8).

Les courbes d'étalonnage sont reportées figures 26 et 27.



Etalons	Fournisseur	Poids Moléculaire (D)	log(PM)
Blue Dextran	Sigma	2.10 <sup>6</sup>	6,301
β amylase (orge)	Sigma	200 000	5,301
Alcool déshydrogénase (levure)	Sigma	150 000	5,176
Ovotransferrine (poule)	Merck	77 000	4,886
Albumine (sérum bovin)	Sigma	66 000	4,819
Triose phosphate isomérase (m. porc)	Sigma	53 000	4,720
Ovalbumine (poule)	Merck	45 000	4,653
Anhydrase carbonique (éryth. bovin)	Sigma	29 000	4,462
Myoglobine (cheval)	Merck	17 200	4,236
Cytochrome C (cheval)	Merck	12 400	4,093
Vitamine B12	Merck	1 355	3,132
Alanine	Merck	89	1,949

Tableau 8 : Protéines de référence pour l'étalonnage des colonnes en chromatographie d'exclusion

## 5.2. Chromatographie à polarité de phase inversée

Nous avons expérimenté un autre type de fractionnement chromatographique : séparation par polarité de phase inversée basée sur le degré d'hydrophobicité des protéines.

Deux types de colonnes ont été essayés: - Nucléosil 300 A C18 (INTERCHIM)  
- C4 300A VYDAC (VYDAC)

La silice Nucléosil se présente sous forme de particules sphériques de surface spécifique 350 m<sup>2</sup>/g. La colonne utilisée (N5C18-25F / Interchim) est longue de 250 mm pour un diamètre interne de 4,6 mm. Le diamètre des particules est de 5 µm, la taille des pores est de 300 A et leur volume de 1 ml/g. La phase greffée de type C18 (14%C) est bien adaptée à la séparation des protéines.

Les phases VYDAC sont des silices sphériques très résistantes, de surface spécifique 90m<sup>2</sup>/g et de volume de pores de 0,5 cm<sup>3</sup>/g. La colonne utilisée (VYDAC 214TP54) possède les mêmes dimensions que la colonne INTERCHIM : 0,46\*25 cm. Les particules ont un diamètre de 5µm et la taille des pores est de 300A. Le greffage est constitué de chaînes carbonées à 4 carbones.

Protéines	Références SIGMA	Origine
Myokinase (EC 2.7.4.3)	M3382	Muscle porc
Aldolase (EC 4.1.2.13)	A1893	Muscle lapin
Créatine phosphate kinase (EC 2.7.3.2)	C3755	Muscle lapin
Glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12)	G9013	Muscle porc
Myoglobine	M0603	Muscle cheval
Enolase (EC 4.2.1.11)	E0379	Muscle lapin
Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	P9136	Muscle lapin
Triose phosphate isomérase (EC 5.3.1.1)	T7401	Muscle porc
Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2)	P3397	Muscle lapin
Phosphoglycérate mutase (EC 2.7.5.3)	P8252	Muscle lapin
Phosphorylase b (EC 2.4.1.1)	P6635	Muscle lapin
Phosphoglucose isomérase (EC 5.3.1.9)	P8391	Muscle lapin
Lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27)	L1254	Muscle lapin

Tableau 9 : Protéines de référence pour l'étalonnage des colonnes de chromatographie à polarité de phase inversée

Les modes opératoires classiques pour l'utilisation de ces colonnes font appel à un gradient de solvants aqueux/organique contenant un agent solvatant comme l'acide trifluoroacétique (TFA). La phase organique est très souvent de l'acétonitrile qui offre une meilleure résolution comparativement aux autres phases organiques.

Différentes compositions de solvants organiques seront comparées : acétonitrile avec 0,07% de TFA, acétonitrile / eau à 0,1% de TFA.

Les caractéristiques du programme utilisé sont les suivantes:

Débit total 1,8 ml/min

Détection 215 nm

Gradient linéaire de 50 à 75% de solvant B sur 55 min

Température ambiante

L'étalonnage est pratiqué avec des étalons SIGMA (tableau 9).

L'étalonnage est réalisé en deux étapes:

- passage de chaque étalon homogénéisé dans l'eau
- passage de chaque étalon homogénéisé dans un extrait musculaire.

Les pH faibles des solvants utilisés (pH 2,5 pour le solvant A et pH inférieur à 2,0 pour le solvant B) et la charge importante des extraits musculaires limitent la durée de vie de la colonne ( en moyenne 40 injections). L'ensemble de nos travaux a nécessité l'utilisation de 6 colonnes VYDAC 214TP54. Pour chaque nouvelle colonne, le passage de 5 protéines de référence permet de garantir l'étalonnage.

Plusieurs étalons (Enolase, MB, CPK, TPI, MK, GAPDH, Ald, PGM, PHb, PGI) présentent un pic commun d'absorption à 9,5 min +/- 0,12 - probablement un composé intervenant dans la purification des protéines, ce pic n'a pas été identifié; ce pic n'existe pas sur les chromatogrammes des extraits musculaires.

L'intégration des chromatogrammes sur la période d'éluion des protéines fournit les surfaces globale et relative de chaque pic. La concentration en protéines de chaque échantillon est, par ailleurs, déterminée par la méthode BCA. Nous caractériserons chaque pic chromatographique par la concentration en protéines (en mg/g de muscle) et la proportion relative de protéines totales qu'il représente.

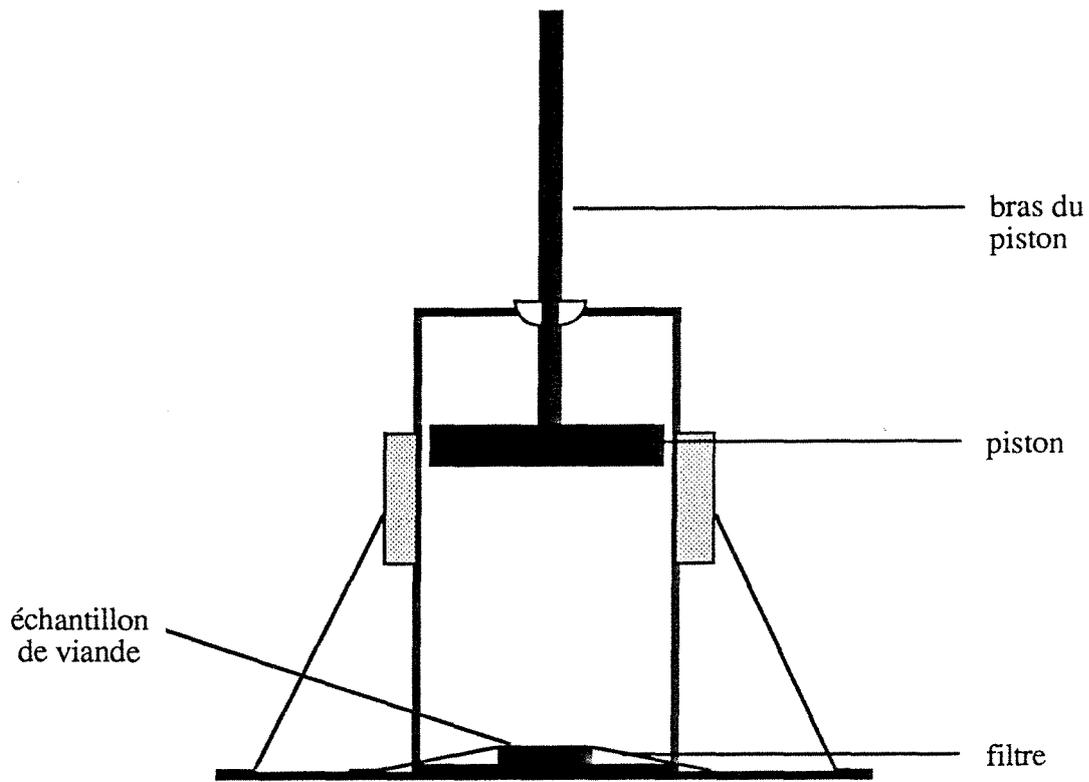


Figure 28 : Dispositif utilisé pour la mesure du pouvoir de rétention d'eau

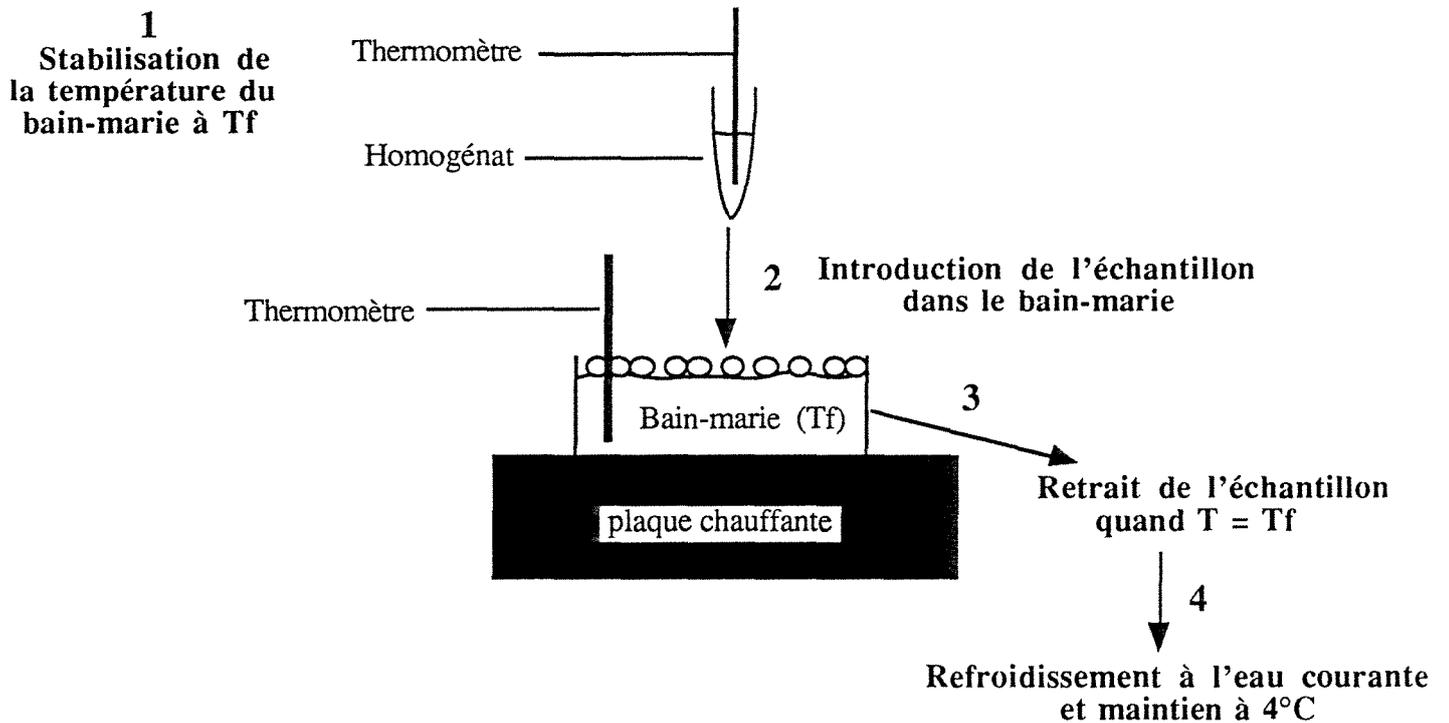


Figure 29 : Schéma de la technique de chauffage utilisée

## 6. Les pertes en eau

### 6.1. Détermination des pertes au stockage

Un morceau (100-150 g) de longissimus dorsi est introduit dans un sachet en plastique scellé sous vide, puis suspendu à 4°C pendant 48h (méthode HONIKEL, 1987).

Les pertes en eau sont définies comme la différence de poids avant et après stockage du morceau de viande rapportée au poids initial de muscle.

$$\text{Pertes en eau (\%)} = ((\text{Pds initial} - \text{Pds final}) / \text{Pds initial}) * 100$$

### 6.2. Pouvoir de rétention d'eau (PRE)

Le pouvoir de rétention d'eau est apprécié par quantification du volume de jus extrait d'un échantillon de viande dans des conditions données. Cette quantité dépend de la méthode utilisée et doit donc être déterminée par une méthode standardisée.

GOUTEFONGEA (1963) a comparé différentes méthodes de mesure du PRE de la viande et a mis en évidence que la plus reproductible, et également la plus simple à mettre en oeuvre, est la compression modérée d'un échantillon de viande broyée disposé entre 2 feuilles de papier filtre.

Nous avons adopté la méthode standardisée par LAROCHE (1981) avec quelques modifications : nous avons fabriqué notre propre dispositif (figure 28) avec un poids de 1kg300 et une hauteur de chute du piston de 5 cm.

Le morceau de viande, après pesée (4 à 6 g), est placé entre deux feuilles de papier filtre WHATMAN n°114 et soumis au poids du piston pendant une heure. La pression exercée par le piston favorise le relargage de l'eau en dehors du morceau. Le gain de poids des filtres rapporté au poids initial de la viande définit le pouvoir de rétention de la viande.

## 7. Conditions de chauffage

Un tube à essai en polyéthylène (1 cm de diamètre et parois de 1 mm d'épaisseur) contenant 5 ml d'extrait musculaire est plongé dans un bain-marie thermostaté à la température Tf (figure 29). La température de l'échantillon est relevée à l'aide d'une sonde de température PT100 plongée dans l'homogénat. L'échantillon est retiré du bain-marie au temps t<sub>0</sub> où sa température à coeur atteint la température de consigne Tf, puis immédiatement refroidi sous eau courante.



Les échantillons sont ensuite filtrés (Durieux N°1B) pour éliminer les protéines coagulées par la chaleur.

## 8. Mesures des activités enzymatiques

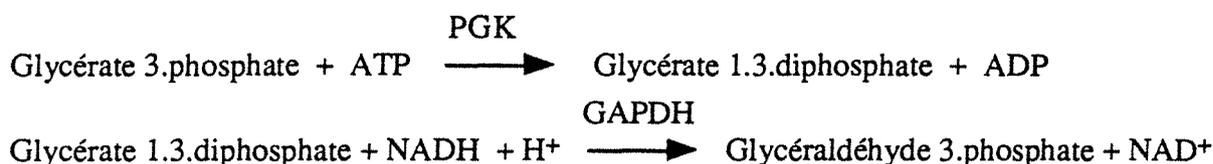
Les déterminations spectrophotométriques sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre SCHIMADZU UV 160 à partir des extraits musculaires aqueux filtrés.

### 8.1. Activité de la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase

Directement à partir de l'homogénat obtenu dans les conditions standard, la détermination de l'activité de la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase est réalisée selon la méthode BERGMAYER (1974).

La méthode est basée sur la biochimie des trioses phosphates de la glycolyse, mais on utilise ici la réaction inverse de la voie physiologique musculaire.

#### Réactions:



#### Réactifs:

- glycérate 3.phosphate	6mM
- tampon triéthanolamineHCl	50mM pH7,6
- EDTA	5mM
Milieu - ATP	3mM
- MgCl <sub>2</sub>	10mM
- NADH	0,234mM
- Phosphoglycérate kinase	2u/ml solution

#### Mesure:

Dans la cuve spectrophotométrique thermostatée à 25°C, on ajoute successivement:

0,1 ml d'extrait enzymatique (dilution au 1/500ème)

3 ml de milieu

On vérifie qu'il n'y a pas de réaction parasite durant 5 minutes, et on initie la réaction par ajout de 0,1ml de substrat glycérate 3.phosphate.

La disparition du NADH est suivie spectrophotométriquement à 340 nm.



Calcul:

$$UI = (DO_{340/mn} * 3,2 * \text{facteur de dilution}) / (6,2 * 0,1)$$

L'activité GAPDH est exprimée en  $\mu$ moles de substrat disparu par minute et par g de muscle.

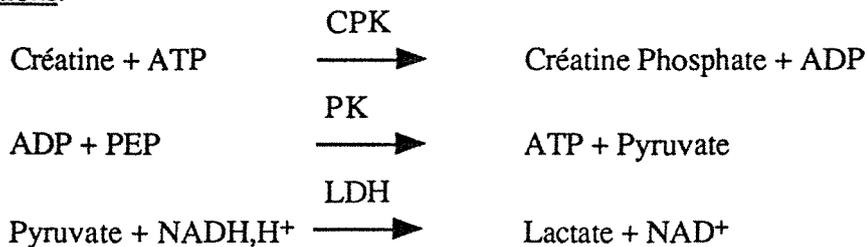
8.2. Activité de la créatine phosphate kinase

L'activité de la créatine phosphate kinase est déterminée par un système enzymatique couplé utilisant la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase.

La méthode utilisée est une adaptation de la méthode de TANZER et GILVARG (1959).

Une unité est exprimée en  $\mu$ moles de créatine disparue par minute à 25°C et pH 8,9.

Réactions:



Réactifs:

- créatine tamponnée 0,40M glycine contenant 53,2mM de créatine et 62mM de carbonate de potassium

- ATP 8,5mM

- NADH 1,22mM

- PEP 2 mM

Milieu - LDH 15u/ml

- PK 7u/ml

- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 28mM

- Glutathion réduit 26mM

pH ajusté à 7,4

Mesure:

Dans une cuve thermostatée à 25°C : 0,7 ml de milieu

+ 2,2 ml créatine

Incubation 3-5 min pour établir l'équilibre thermique

+ 0,1ml d'enzyme (diluée au 1/1 000ème)

La diminution d'absorbance à 340nm est enregistrée pendant 5 à 8 minutes. La pente de la courbe est déterminée sur la partie linéaire.



Calcul:

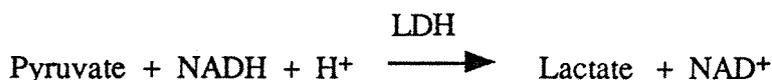
$$UI = (DO\ 340/mn * 3 * \text{facteur de dilution}) / (6,2 * 0,1)$$

L'activité de la créatine phosphate kinase est exprimée en  $\mu$ moles de créatine disparue par minute et par g de muscle.

8.3. Activité de la lactate déshydrogénase

La méthode suivie, inspirée de ANSAY (1974), consiste à déterminer l'activité de la lactate déshydrogénase dans un milieu à haute concentration en pyruvate.

Réaction:



Réactifs:

- Milieu réactionnel :

Tampon triéthanolamine-HCl pH 7,6	100 mM
EDTA	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NADH	0,4 mM
Solution de pyruvate	320 mM

Mode opératoire:

Dans une cuve spectrophotométrique thermostatée à 30°C, on ajoute successivement :

- 0,1 ml d'extrait enzymatique dilué au 1/500ème environ
- 3 ml de milieu réactionnel

Après agitation et vérification de l'absence de réaction parasite, on démarre la réaction par l'ajout de 0,1 ml de solution de pyruvate pour atteindre une concentration finale en pyruvate de 10 mM.

On suit la réaction par variation de la DO à 340 nm pendant 10 min. L'activité est exprimée en  $\mu$ mol/min/g de muscle.



**RESULTATS**

**DISCUSSION**



# 1. TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES

## 1.1. Extraction

### 1.1.1. Choix du milieu d'extraction

L'eau permet l'extraction de 14,4% des protéines solubles du muscle contre 30,6% pour  $\text{NaHCO}_3$  3mM - KCl 0,1M et 26,3% pour le tampon phosphate 0,025M (tableau 10).

Si on admet que l'extraction des protéines sarcoplasmiques par le tampon bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$  3mM-KCl 0,1M) est presque totale, l'eau, comparativement, n'en extrait que 50%.

	Milieux d'extraction	Protéines Solubles mg/g
Protéines Sarcoplasmiques	Eau	31,0 +/- 1,5
	Tampon phosphate 0,025M	56,7 +/- 2,0
	Tampon bicarbonate 0,003M + KCl 0,1M	66,0 +/- 1,9
Protéines Totales	Tampon phosphate 0,1M + Iodure de potassium 1,1M	215,5 +/- 5,5

(moyennes pour 5 répétitions à partir d'un même échantillon de viande)

Tableau 10: Comparaison de l'efficacité de 3 réactifs pour l'extraction des protéines sarcoplasmiques de viande de porc

Ces résultats sont cohérents avec ceux de MA et ADDIS (1973) qui avancent que les protéines sarcoplasmiques extraites par un tampon phosphate représentent 27 à 30% suivant le degré de maturation des protéines solubles totales.

Le principal facteur à l'origine de ces différences de pouvoir d'extraction est la force ionique; le pH étant pour les trois milieux d'extraction étudiés de l'ordre de 7,0. La force ionique du tampon phosphate 0,025M est de 0,10, celle du tampon bicarbonate de 0,10 et celle du tampon phosphate 0,10M de 1,10. Les ions des sels neutres réagissent avec les charges des protéines et abaissent l'interaction électrostatique entre les charges opposées de groupements voisins. En outre, la solvation due à ces ions permet d'augmenter la solvation des protéines, et par suite leur solubilité.

La force ionique du sarcoplasme est de l'ordre de 0,10 - 0,15 M. Lors de l'extraction dans 2,5 volumes d'eau, comme nous la pratiquons, la force ionique de l'extrait est abaissée à environ 0,05M. Dans ces conditions, il est possible que certaines protéines, adsorbées par des particules chargées, ne soient pas extraites par l'eau. L'eau pourrait induire, indépendamment



d'une extraction réduite des protéines comparativement à un tampon de force ionique 0,15M, un déséquilibre au niveau des teneurs relatives en différentes protéines extraites.

Cependant, les profils chromatographiques obtenus pour un extrait musculaire donné avec chacun des trois réactifs sont strictement superposables, à l'exception du fait que l'intensité globale d'absorption est différente.

Les proportions relatives des différentes protéines sont identiques, seule la quantité globale de protéines extraites (surface totale des pics) varie: elle est plus faible dans le cas d'une extraction par l'eau (tableau 11).

	Eau		Tampon phosphate 0,025M		Tampon bicarbonate 0,003M	
	Teneur en protéines mg/g muscle	Teneur relative %	Teneur en protéines mg/g muscle	Teneur relative %	Teneur en protéines mg/g muscle	Teneur relative %
Pic 1	1,2	3,7	2,0	3,4	2,4	3,5
Pic 2	6,0	19,2	11,6	20,0	13,8	19,8
Pic 3	4,8	15,2	8,5	14,7	10,1	14,5
Pic 4	6,1	19,3	11,2	19,2	14,2	20,3
Pic 5	0,5	1,6	0,6	1,1		
Pic 6	4,1	13,1	7,7	13,2	9,4	13,5
Pic 7	1,6	5,0	3,0	5,2	4,0	5,7
Pic 8	1,0	3,3	1,7	3,0	2,3	3,3
Pic 9	1,4	4,5	2,7	4,6	3,1	4,5
Pic 10	1,5	4,7	2,8	4,9	3,3	4,7
Pic 11	1,5	4,7	2,9	5,0	3,6	5,2
Pic 12	1,8	5,7	3,3	5,6	3,6	5,1

Tableau 11 : Comparaison des séparations chromatographiques (sur colonne VYDAC 214TP54) des protéines sarcoplasmiques suivant le réactif d'extraction utilisé

Compte tenu de ces observations et du fait que l'eau est l'agent d'extraction le plus souvent utilisé (SCOPES, 1964; BORCHERT et al., 1969; CRESPO et OCKERMAN., 1977; CALDIRONI et BAZAN, 1980; DAVIS et ANDERSON, 1983, 1984; McCORMICK et al., 1987, 1988), l'extraction des protéines solubles sera, pour la suite des travaux, pratiquée avec de l'eau distillée.



### 1.1.2. Optimisation de la méthode d'extraction des protéines de la phase aqueuse

Après homogénéisation de la viande dans l'eau à l'Ultra-Turrax et incubation à 4°C, nous avons comparé deux techniques, la filtration et la centrifugation, en vue d'éliminer les protéines précipitées ainsi que les impuretés comme le glycogène ou les matières grasses (cf. Matériel et Méthodes).

Le test de Student ( $t = 1,213$ ) révèle qu'il n'existe pas de différence significative entre l'efficacité des deux méthodes (tableau 12).

	Filtration	Centrifugation
Echantillon 1	28,9	26,3
Echantillon 2	25,8	28,3
Echantillon 3	33,3	30,1
Echantillon 4	27,2	27,5
Echantillon 5	25,4	24,6
Echantillon 6	25,5	25,3
Echantillon 7	31,1	27,2
Echantillon 8	34,2	32,7
Echantillon 9	29,3	29,7
Echantillon 10	28,5	29,7

Tableau 12 : Comparaison du rendement en protéines extraites selon la méthode d'extraction utilisée (exprimé en mg/g de muscle)

### 1.1.3. Influence de la durée et de la température sur le rendement d'extraction

La solubilisation des protéines dans l'eau fait intervenir la dissociation d'une partie des molécules de solvant et des molécules de protéines puis une dispersion de ces dernières dans le solvant.

La littérature sur les protéines du muscle montre que la durée de contact entre protéines et solvant ainsi que la température à laquelle est pratiquée l'extraction peuvent influencer le rendement d'extraction. Bien que certains auteurs prolongent l'extraction pendant une heure ou plus, à froid (CAMOU et SEBRANEK, 1991; KARLSSON et LUNDSTROM, 1991), l'extraction est le plus souvent pratiquée de manière extemporanée (DAVIS et ANDERSON, 1984; McCORMICK et al., 1987; TROUT, 1989; SPANIER et al., 1990; STALDER et al., 1991; COLLINS et al., 1991b). HELANDER (1957) n'obtient pas de différences



significatives de rendement d'extraction des protéines sarcoplasmiques avec un tampon phosphate 0,03M entre 1 et 4 heures.

Nous avons opéré avec quatre durées d'extraction (0 min, 15 min, 45 min et 1h) et deux températures différentes (4°C et 25°C).

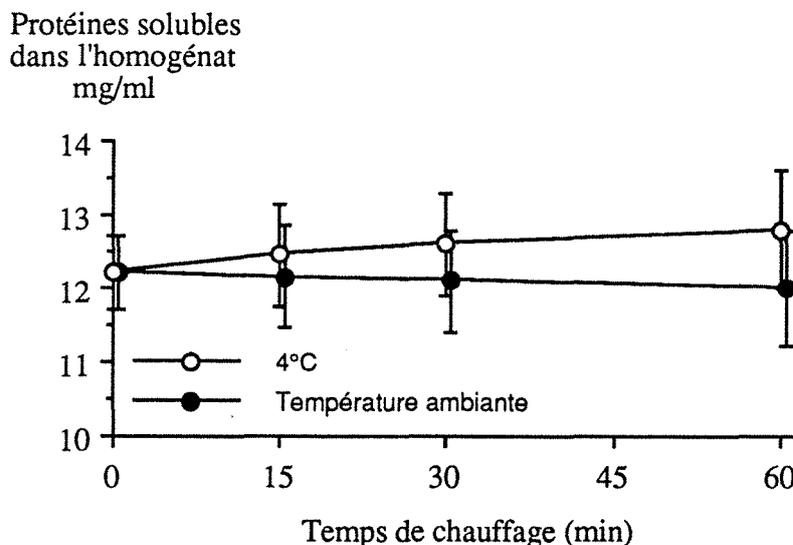


Figure 30 : Influence de la durée d'extraction

A 4°C, augmenter la durée de contact protéines-eau de 0 min à 1 h n'améliore que faiblement le rendement d'extraction : 12,2 mg/ml pour 0 minute contre 12,8 mg/ml pour une heure d'incubation. A température ambiante, l'extraction n'est pas améliorée par une augmentation de la durée.

Compte tenu des variations induites par l'étape d'homogénéisation (coefficient de variation moyen 2,9%), l'effet de la durée d'extraction n'est pas significatif. Par ailleurs, travailler à 4°C permet de limiter une protéolyse éventuelle dans l'échantillon et toute dénaturation due à la chaleur. Aussi, au vu de la figure 30 et pour des raisons pratiques, nous adopterons, pour la suite de nos travaux, un temps d'incubation de 15 min à la température de 4°C.

La **méthode d'extraction** des protéines finalement retenue est donc la suivante:

Mise en solution de 10g de viande hachée dans 25 ml d'eau distillée. Homogénéisation à l'ultra-turrax en 3 périodes de 30 s à 27 000 t/min entrecoupées par des pauses de 10s. Après 15 min de repos, filtration sur filtre plissé Durieux n°1B puis récupération du filtrat contenant les protéines sarcoplasmiques. Toutes les opérations sont pratiquées à 4°C.



## 1.2. Dosage des protéines

Les deux méthodes de dosage, BCA et LOWRY (cf. Matériel et Méthodes) ont été appliquées en parallèle sur 10 extraits musculaires préparés à partir de viande fraîche selon la méthode décrite ci-dessus (tableau 13).

	Méthode BCA	Méthode de LOWRY
Echantillon 1	26,1	27,3
Echantillon 2	31,4	31,6
Echantillon 3	31,2	30,8
Echantillon 4	27,6	29,0
Echantillon 5	28,9	29,2
Echantillon 6	30,3	28,9
Echantillon 7	31,8	32,0
Echantillon 8	29,2	30,1
Echantillon 9	28,7	27,0
Echantillon 10	30,9	29,7

Tableau 13 : Teneur en protéines solubles (mg/g de muscle) de 10 échantillons de viande d'après les résultats des dosages LOWRY et BCA

La confrontation de ces résultats permet de confirmer qu'il n'existe pas de différences significatives ( $t = 0,425$ ) entre les deux méthodes de dosage.

Le dosage selon FOLIN-LOWRY est le plus souvent employé ( MA et ADDIS, 1973; DAVIS et ANDERSON, 1983; LOPEZ-BOTE et al., 1989; COLLINS et al., 1991a et b); les deux méthodes reposent sur la formation d'un complexe, protéines-ions cuivriques, de  $\lambda_{\max}$  différents:

- réactif de FOLIN  $\lambda_{\max} = 750 \text{ nm}$
- acide bicinchoninique  $\lambda_{\max} = 562 \text{ nm}$

Il convient encore de noter que la méthode au BCA, utilisée par SPANIER et al. (1990) est la plus rapide, 40 min au total contre plus d'une heure pour le dosage de LOWRY; par ailleurs, elle nécessite moins de préparations de réactifs et moins de manipulations. Dans ces conditions, le dosage des protéines solubles sera effectué selon la méthode à l'acide bicinchoninique, méthode utilisée en routine au laboratoire.

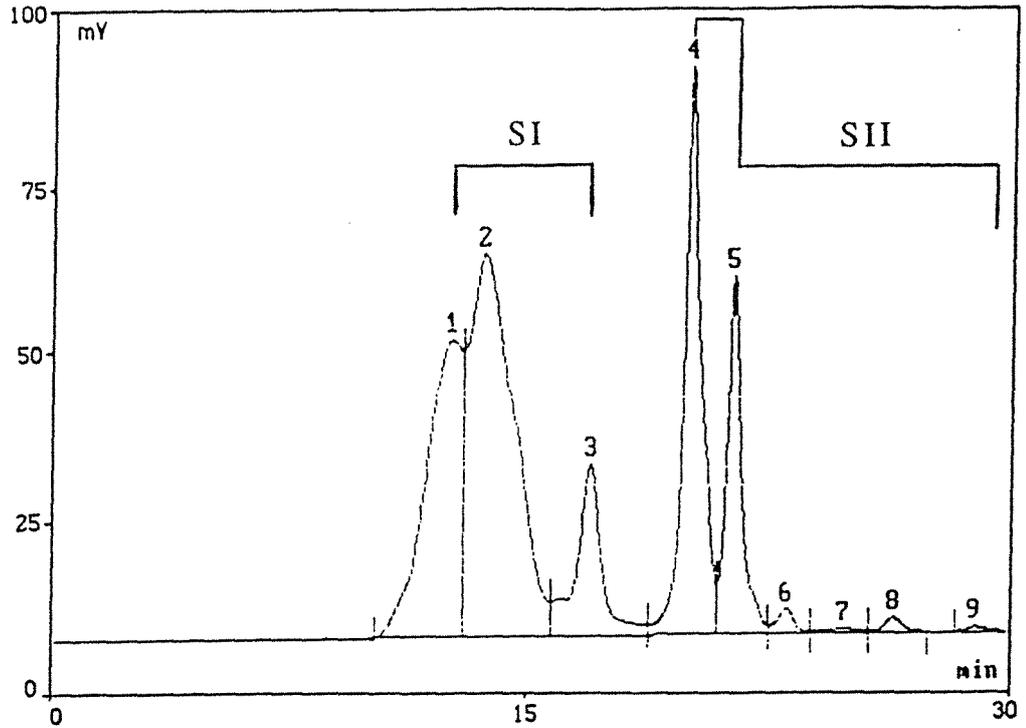


Figure 31 : Séparation chromatographique d'un extrait musculaire sur TSK G2000SW  
 Tampon phosphate M/15 pH 6,8 + NaCl 0,1M + 0,03% NaN<sub>3</sub>  
 Débit 0,5 ml/min. Détection UV 280 nm

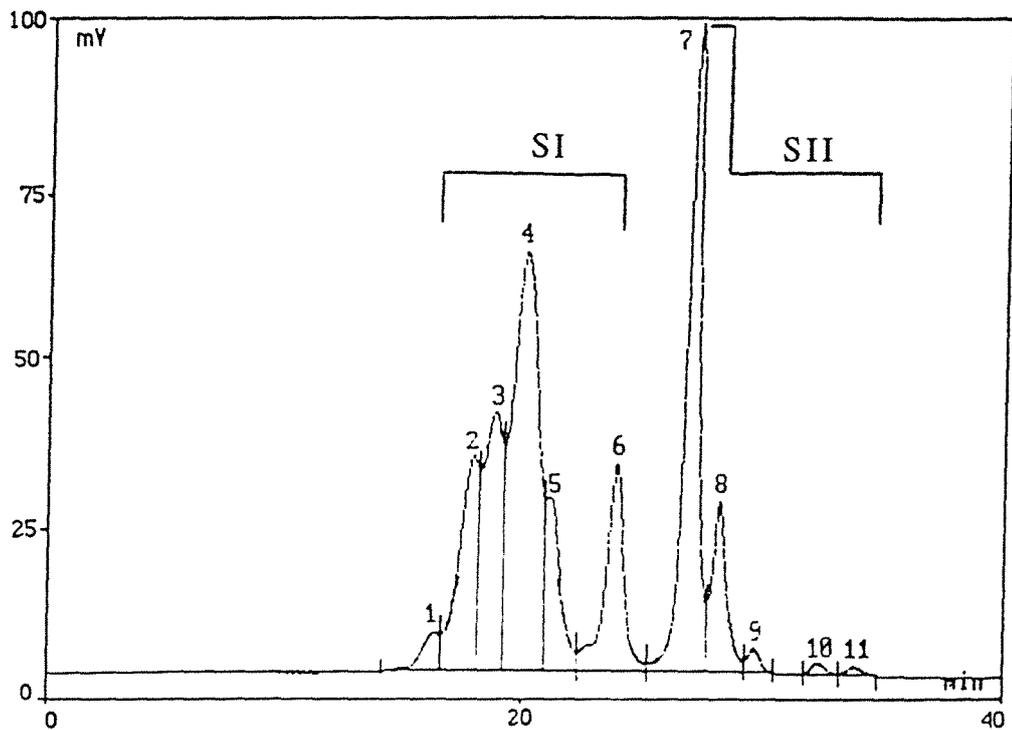


Figure 32 : Séparation chromatographique d'un extrait musculaire sur TSK G3000SW  
 Tampon phosphate M/15 pH 6,8 + NaCl 0,1M + 0,03% NaN<sub>3</sub>  
 Débit 0,5 ml/min. Détection UV 280 nm

### 1.3. Techniques de séparation

#### 1.3.1. Chromatographie d'exclusion sur gel

La chromatographie d'exclusion ou de perméation sur gel permet la séparation des constituants d'un mélange en fonction de leur taille moléculaire. Suivant leur taille, les molécules pénètrent plus ou moins profondément dans les pores accessibles des billes de silice, dans lesquelles elles sont plus ou moins retenues; il en résultera sous l'effet des éluants un relargage sélectif des différents constituants d'un mélange. La taille des pores conditionne la gamme de poids moléculaires pour laquelle le temps de rétention d'une molécule est directement proportionnel au logarithme de son poids moléculaire.

Les premiers essais ont été réalisés sur une colonne TSK G2000SW (colonne LKB de 30cm\*7,5mm, diamètre des pores 12,5nm). Les caractéristiques du programme sont données dans la partie Matériel et Méthodes au paragraphe 5.1.

Les chromatogrammes ainsi obtenus comportent deux séries de pics : la première (SI) regroupant les pics sortis entre 10 et 18 min et la deuxième (SII) les pics sortis entre 20 et 30 min (figure 31).

La série I comporte trois pics; le premier à 12,60 +/- 0,03 min accolé au deuxième sortant à 13,65 +/- 0,06 min et enfin, le troisième, nettement séparé, identifié comme étant la myoglobine à 16,98 +/- 0,04 min. Les pics de la série II sortent au-delà de la limite d'exclusion de la colonne et sont probablement le résultat d'un phénomène d'adsorption indépendant de la séparation par exclusion des pics de la série I. Ces composés, de poids moléculaires inférieurs à 10 000 D, sont vraisemblablement des polypeptides et des nucléotides.

Dans ces conditions, la séparation obtenue sur colonne G2000SW s'avère insuffisante pour pouvoir suivre l'évolution des protéines sarcoplasmiques au cours du stockage ou du chauffage.

Nous avons cherché à améliorer la séparation en utilisant une colonne (G3000SW) dont le domaine de linéarité pour les poids moléculaires couverts est compris entre 200 000 et 10 000D (cf courbe Matériel et Méthodes 5.1). En augmentant la durée d'élution de 30 à 40 min, on observe une légère amélioration de la séparation (figure 32) qui reste cependant insuffisante.

La séparation chromatographique d'un extrait musculaire sur colonne G3000SW est tout à fait comparable à celle obtenue sur colonne G2000SW. La résolution des pics de la première série



est légèrement améliorée : on distingue 6 pics (tableau 14); toutefois, seul celui de la myoglobine est bien individualisé à 23,80 min.

Pic	Temps de rétention (min)	Poids moléculaire (D)
1	16,48 +/- 0,06	239 515
2	17,83 +/- 0,02	150 545
3	18,78 +/- 0,06	108 580
4	19,87 +/- 0,06	74 630
5	21,02 +/- 0,02	50 250
6	23,80 +/- 0,06	19 315

Tableau 14: Caractérisation des pics d'un extrait de protéines solubles de muscle de porc sur TSK G3000SW

La plus grosse protéine, sortant à 16,48 min (poids moléculaire voisin de 240 000 D d'après notre étalonnage) (figure 32) représente la pyruvate kinase; de fait, la phosphofructokinase, de poids moléculaire 360 000 D, ne semble pas présente dans l'extrait musculaire tel qu'il a été préparé. Cette observation a été confirmée par chromatographie à polarité de phase inversée (VYDAC 214TP54). En outre, cette observation est rapportée par d'autres auteurs. En effet, trois protéines ne sont pas identifiées dans les extraits obtenus après homogénéisation du muscle dans l'eau: la phosphofructokinase, la phosphorylase b kinase et la phosphoglycérate kinase (McCORMICK et al., 1988; OKAYAMA et al., 1991).

La plus petite protéine de poids moléculaire égal à 19 000 D est la myoglobine.

Le profil obtenu est comparable à celui rapporté par DAVIS et ANDERSON (1984) qui ont exploité la résolution d'une colonne TSK3000SW préparative de 60 cm de longueur et de 4,5 mm de diamètre. Il semble, dans ce cas, que l'emploi d'une colonne plus longue permette d'améliorer la capacité de chargement sans pour autant améliorer la résolution.

Il ne nous a pas été possible d'améliorer la résolution, ni en augmentant la durée d'analyse, ni en diminuant le débit d'élution.

La reproductibilité de la séparation obtenue après 10 injections successives du même échantillon est satisfaisante : la déviation moyenne pour le pic 6 est de +0,05 pour le temps de rétention et de +2,51 pour la surface du pic.

La récupération des protéines, déterminée par dosage selon la méthode au BCA des protéines de l'extrait avant et après élution, en tenant compte du facteur de dilution atteint 97%.

Une colonne de perméation gel de type G4000SW aurait peut-être permis une amélioration notable de la séparation, mais en aucun cas la résolution de l'ensemble des protéines



constitutives. De ce fait et compte tenu de l'investissement à réaliser pour un résultat "moyen", nos essais en perméation gel se sont limités à l'utilisation d'une colonne G3000SW.

L'identification des différentes fractions passerait nécessairement par la poursuite du fractionnement. Il nous a paru plus judicieux d'explorer une autre technique de séparation, notamment la chromatographie à polarité de phase inversée.

Quelques essais de suivi au cours du stockage et du chauffage des protéines sarcoplasmiques ont cependant été réalisés avec la colonne d'exclusion G3000SW qui présente l'avantage d'être représentative du contenu protéique d'un extrait en fonction du poids moléculaire. Cette démarche nous a paru intéressante pour étudier la dégradation éventuelle de ces protéines.

### 1.3.2. La chromatographie à polarité de phase inversée

La chromatographie à polarité de phase inversée s'est affirmée ces dernières années comme étant une méthode efficace de séparation des macromolécules (LEWIS et al., 1980; REGNIER et GOODING, 1980; PEARSON et al., 1982).

Celle-ci repose sur la circulation d'une phase mobile polaire au contact d'une phase stationnaire constituée de molécules apolaires, porteuses de chaînes hydrocarbonées, greffées sur un support de silice. Les protéines de l'échantillon, entraînées par la phase mobile, sont adsorbées à la surface de la phase inverse avant d'être désorbées par un solvant organique de composition appropriée; la séparation est basée sur les différences de caractère hydrophile-hydrophobe manifestées par les protéines.

Compte tenu de la taille des protéines sarcoplasmiques, il est opportun d'utiliser des supports à larges pores (300 Å) afin d'obtenir une surface maximale de contact entre protéines et support (LEWIS et al., 1980; PEARSON et REGNIER, 1983).

Le type de silice et la nature du greffage déterminent en grande partie la qualité de la séparation.

Les premiers essais ont été pratiqués sur colonne garnie de Nucléosil (silice sphérique de surface spécifique 350 m<sup>2</sup>/g et de volume de pores 1 ml/g) greffé en C18 (taux de greffage 14%C) en adaptant directement le programme utilisé par McCORMICK et al. (1987) : gradient de 35 à 60% de solvant B en 55 min avec un débit de 1,8 ml/min avec pour solvant A, de l'eau à 0,1% de TFA, et pour solvant B de l'acétonitrile à 0,07% de TFA.

La présence d'acide trifluoroacétique (TFA) dans la phase mobile assure une bonne solubilisation des protéines. Le TFA est un acide fort qui protone les groupes carboxyles des protéines et augmente leur affinité pour la phase stationnaire. Les propriétés solvantes du TFA

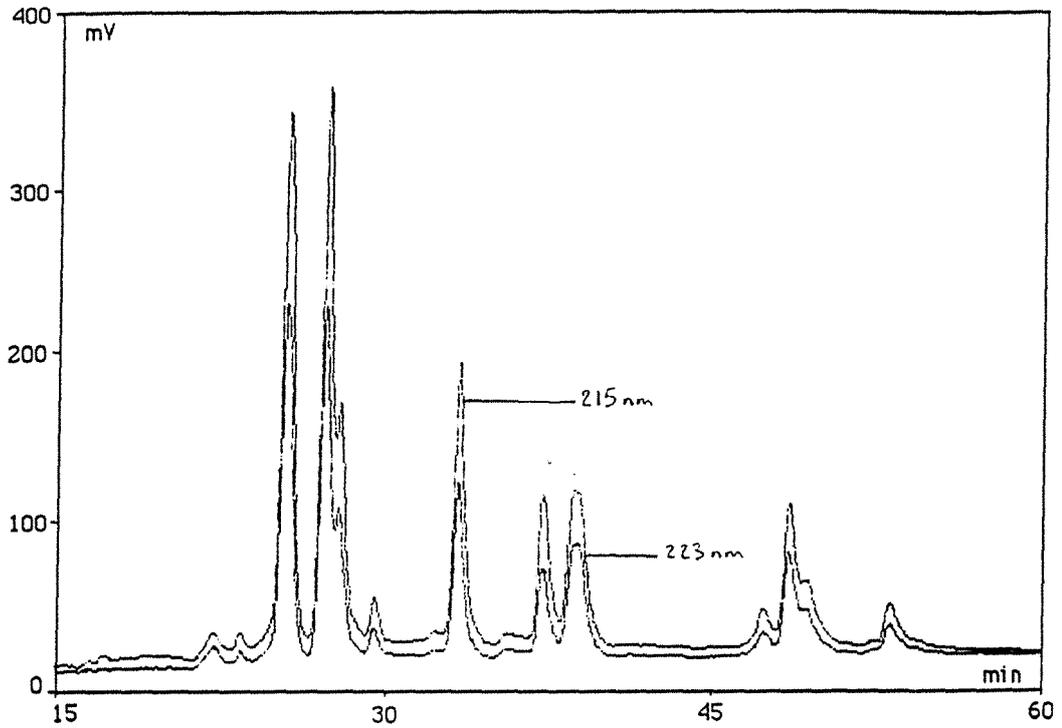


Figure 33 : Comparaison de 2 chromatogrammes obtenus pour un même extrait musculaire à 2 longueurs d'onde de détection 215 et 223 nm. Colonne Nucléosil 300A C18. Débit 1,8 ml/min. Gradient de 35 à 60% de solvant B entre 5 et 60 min avec solvant A : eau + 0,1% TFA et solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA.

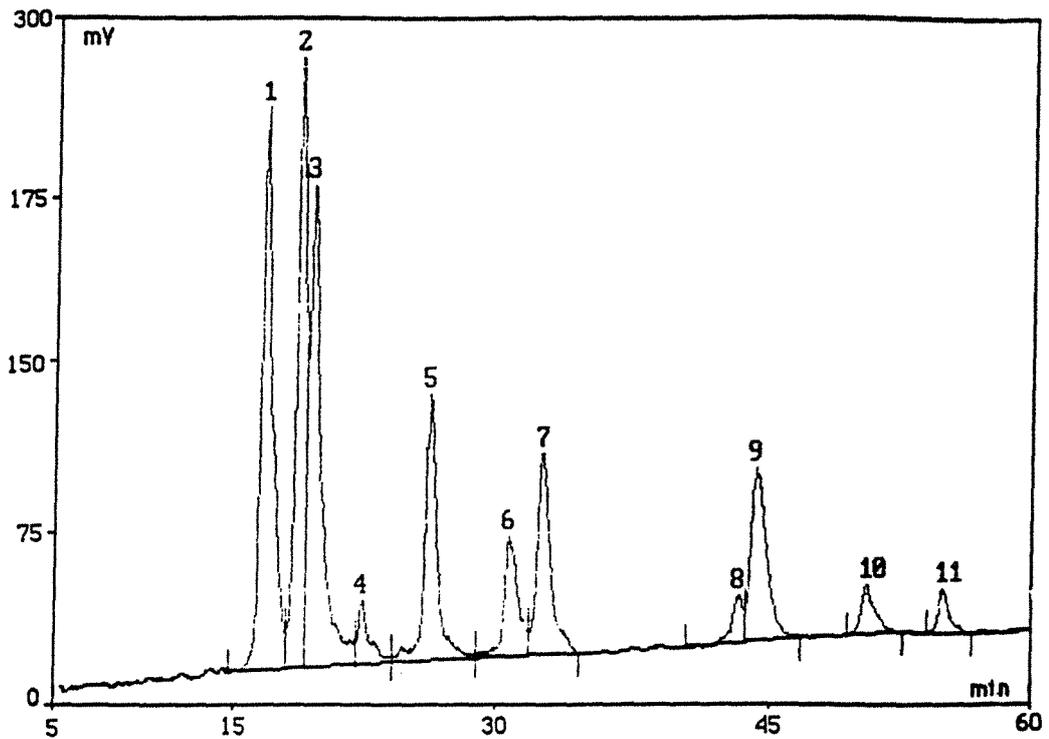


Figure 34 : Séparation chromatographique d'un extrait musculaire aqueux de viande de porc sur colonne à polarité de phase inversée Nucléosil 300A C18. Détection UV 215 nm. Débit 1,8 ml/min. Gradient de 35 à 60% de solvant B entre 5 et 60 min avec solvant A : eau + 0,1% TFA et solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA.

permettent aux protéines de rester solubles dans des conditions de pH et de concentration en solvants organiques qui devraient provoquer leur précipitation (MAHONEY et HERMODSON, 1980). Toutefois le TFA provoque la modification de la structure tertiaire et dénature l'activité biologique des protéines.

Le TFA présente l'avantage d'être volatil et d'avoir un faible coefficient d'extinction ce qui facilite la détection des protéines à 215-220 nm. En effet, la détection à 215-220 nm - longueur d'onde qui caractérise l'absorption des liaisons peptidiques- est préférable à une détection à 254 ou 280 nm, attribuable aux résidus aromatiques non uniformément répartis dans les protéines.

Les protéines sont éluées entre 17 et 48 min, ce qui correspond à une teneur en acétonitrile de la phase mobile de 40 à 54% (v/v). Au cours des 17 premières minutes, les pics d'éluion correspondent aux nucléotides, aux acides aminés et peptides présents dans l'extrait musculaire. Suivant l'extrait musculaire et la nature de la phase de séparation utilisée, les protéines solubles sont repérées sous forme de 10 à 11 pics bien séparés. La légère déformation de la ligne de base est due à la teneur croissante en acétonitrile de la phase mobile. Nous avons comparé les chromatogrammes enregistrés respectivement à 215 et 223 nm (figure 33). On note une absorption différente de l'acétonitrile à ces deux longueurs d'onde et une absorption sensiblement plus élevée des protéines à 215 nm : en moyenne, on enregistre une surface totale de pics de 525 mV.min à 223 nm et de 900 mV.min à 215 nm. Comme les absorptions à 215 et 223 nm relèvent de l'absorption des liaisons peptidiques, nous avons choisi la détection à 215 nm qui correspond à une plus grande sensibilité et à une meilleure détection.

La qualité de la séparation est tout à fait satisfaisante (figure 34); 11 pics bien séparés, à l'exception des pics 2-3 et 8-9, sont dénombrés. Après la cinquième injection, on observe une instabilité de la ligne de base et une nette dégradation de la séparation; il est probable que le pH très bas du solvant B ( $< 1,0$ ) soit à l'origine de la faible durée de vie de la colonne.

Sur les trois colonnes Nucléosil expérimentées, ce phénomène s'est produit entre la quatrième et la huitième injection. Nous avons alors envisagé l'essai d'autres colonnes.

Le solvant B a été sensiblement modifié : acétonitrile/eau 70/30 avec 0,1% de TFA, le pH de ce solvant est de 2,0.

Un autre type de colonne a été expérimenté : colonne VYDAC greffée en C4, utilisée par McCORMICK (1987) pour la séparation des protéines sarcoplasmiques. Les phases VYDAC sont des silices sphériques très résistantes; elles possèdent des caractéristiques adaptées à la



Séparation chromatographique d'un extrait aqueux de muscle de porc  
sur colonne à polarité de phase inversée VYDAC 214TP54

Débit 1,8 ml/min  
Détection UV 215 nm  
Solvant A : eau + 0,1% TFA  
Solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA

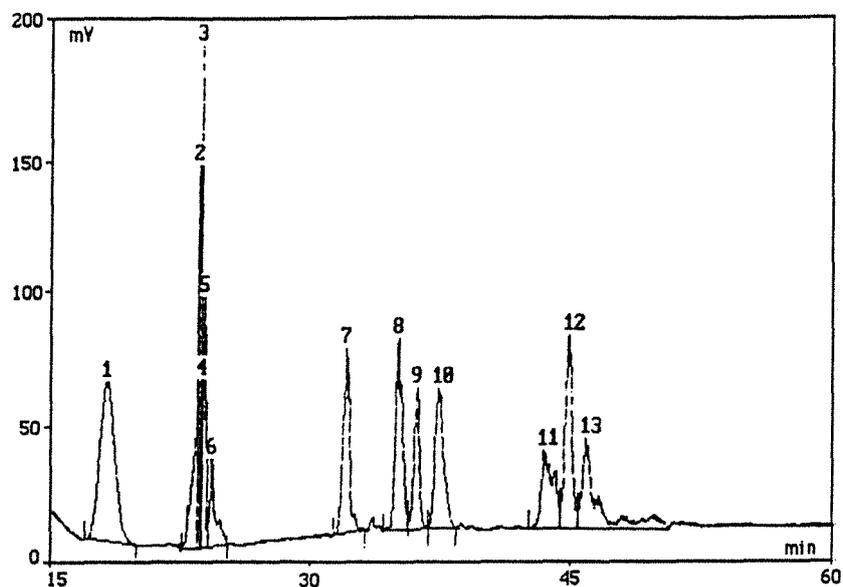


Figure 35 : Gradient de 50 à 80% de solvant B entre 5 et 60 min

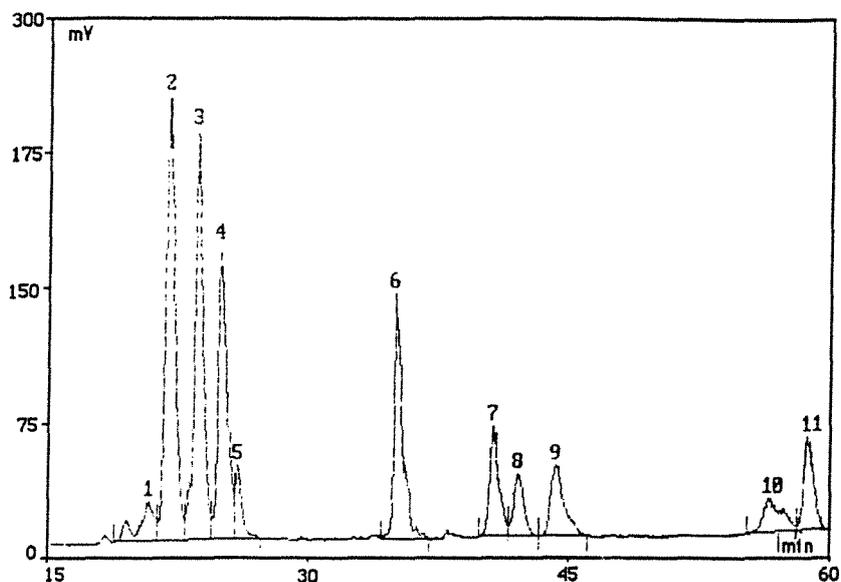


Figure 36 : Gradient de 50 à 70% de solvant B entre 5 et 60 min

Séparation chromatographique d'un extrait aqueux de muscle de porc  
sur colonne à polarité de phase inversée VYDAC 214TP54

Débit 1,8 ml/min

Détection UV 215 nm

Solvant A : eau + 0,1% TFA

Solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA

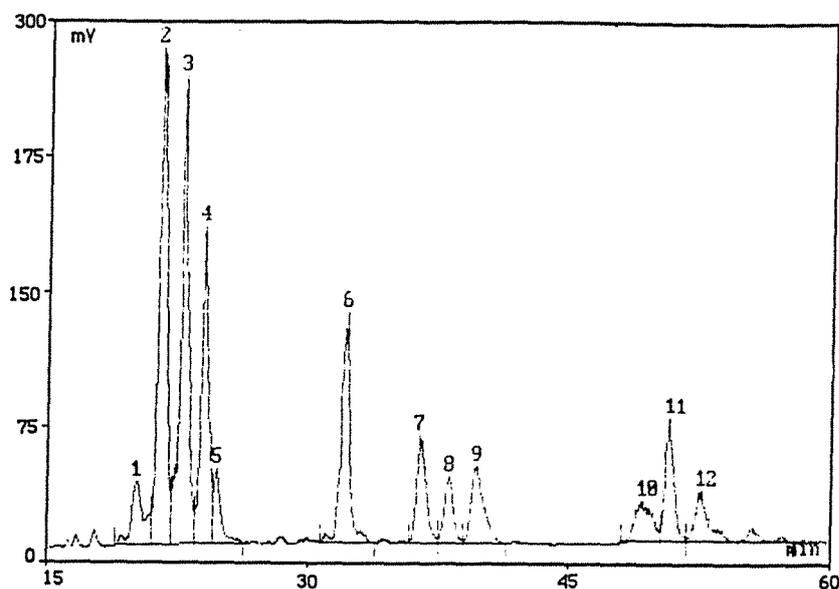


Figure 37 : Gradient de 50 à 75% de solvant B entre 5 et 60 min

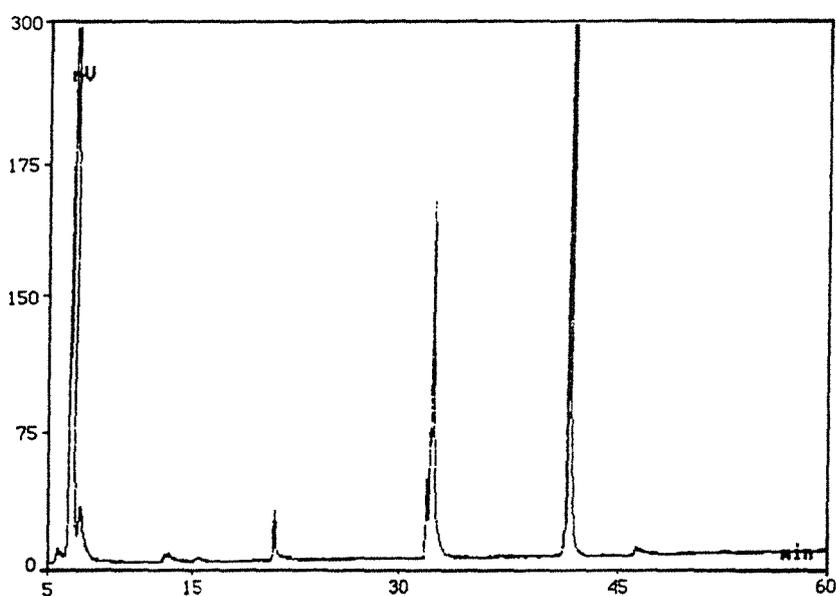


Figure 38 : Gradient de 50 à 60% de solvant B entre 5 et 60 min  
et 60 à 75% de solvant B entre 60 et 90 min

séparation des grosses molécules : une surface spécifique de 90 m<sup>2</sup>/g et un volume de pores de 0,5 cm<sup>3</sup>/g. PEARSON et al. (1982) ont montré la supériorité des silices VYDAC TP sur les LiChrosorb, LiChrospher, Nucléosil, Hypersil, Spherisorb, Spherosil pour la séparation de fragments de globines. Nous avons finalement opté pour une phase en C4, mieux adaptée à la séparation des gros peptides et des protéines, la phase C18 étant plus appropriée à la séparation de peptides de plus petite taille (PEARSON et REGNIER, 1983).

Le programme (dont les caractéristiques sont présentées dans Matériel et Méthodes au paragraphe 5.2) a été adapté en fonction de la nouvelle composition du solvant. Pour une même durée de fractionnement (55 min), nous avons expérimenté trois gradients linéaires différents: de 50 à 80% de solvant B (figure 35), de 50 à 70% (figure 36) et de 50 à 75% (figure 37), avec, pour mémoire, comme solvant A de l'eau à 0,1% de TFA et comme solvant B un mélange acétonitrile/eau 70/30 à 0,1% de TFA.

La meilleure séparation est obtenue avec un gradient de 50 à 75% en 55 min. Dans ces conditions, il apparaît 13 pics bien séparés à l'exception du pic 5 accolé au pic 4. Ce pic 5 n'est d'ailleurs pas individualisé pour tous les échantillons de muscle étudiés.

Par ailleurs, l'augmentation de la durée d'analyse : gradient de 50 à 75% de solvant B durant 85 min n'entraîne pas d'amélioration de la séparation chromatographique.

Une séparation avec palier de gradient : 55 min à raison de 50 à 60% (solvant B) suivi durant 30 min d'un gradient de 60 à 75% (solvant B) a été expérimentée sans aucun résultat intéressant (figure 38).

Un débit de 1,8 ml/min engendrant une pression de l'ordre de 220-250 bars, il est difficilement concevable de travailler avec un débit plus élevé. Cependant, un débit plus modéré n'apporte aucune amélioration et a pour effet d'augmenter la durée de la séparation.

Les protéines sont éluées entre 19 et 51 min, il en résulte 12 pics discernables. D'après notre étalonnage, la plupart des protéines sont éluées sous forme de pics individualisés, à l'exception :

- du dernier pic (n° 13) sortant au bout de 52,2 min qui apparaît associé à la lactate déshydrogénase mais que nous laisserons de côté faute d'une identification suffisante.
- du pic 5, représentant la myoglobine, plus ou moins bien séparé du pic 4, identifié à la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.
- du pic 10 qui regroupe deux protéines : la lactate déshydrogénase et la phosphorylase b.



Protéines	Temps de rétention min	Ecart Type
Myokinase	19,50	0,09
Aldolase	20,50	0,06
Créatine phosphate kinase	22,10	0,10
Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase	23,00	0,05
Myoglobine	24,30	0,12
Enolase	30,90	0,15
Pyruvate Kinase	35,40	0,02
Triose Phosphate isomérase	37,00	0,15
Phosphoglycérate mutase	39,00	0,12
Phosphorylase b	47,00	0,11
Phosphoglucomutase	48,47	0,09
Lactate déshydrogénase	48,69	0,09
Phosphoglucose isomérase	50,80	0,06

Tableau 15 : Etalonnage de la colonne VYDAC 214TP54

Débit 1,8 ml/min. Détection UV 215 nm  
 Gradient de 50 à 75% de solvant B entre 5 et 60 min  
 Solvant A : Eau + 0,1% TFA  
 Solvant B : Acétonitrile/Eau 70/30 + 0,1% TFA

Les résultats obtenus apportent la preuve que l'identification de tous les pics d'un chromatogramme d'extrait de protéines solubles de muscle de porc est possible (tableau 15). Cependant, il y a lieu d'émettre quelques réserves sur la fiabilité de l'étalonnage en raison de la variabilité des temps de rétention des protéines de l'extrait ainsi que des étalons utilisés; ces derniers de pureté relative donnent lieu le plus souvent à plusieurs pics, le pic responsable de l'activité enzymatique n'étant pas toujours aisément identifiable.

A noter en même temps les bonnes performances de la colonne avec de faibles variations des temps de rétention.

Un chromatogramme comportant les principaux pics identifiés est donné figure 39.

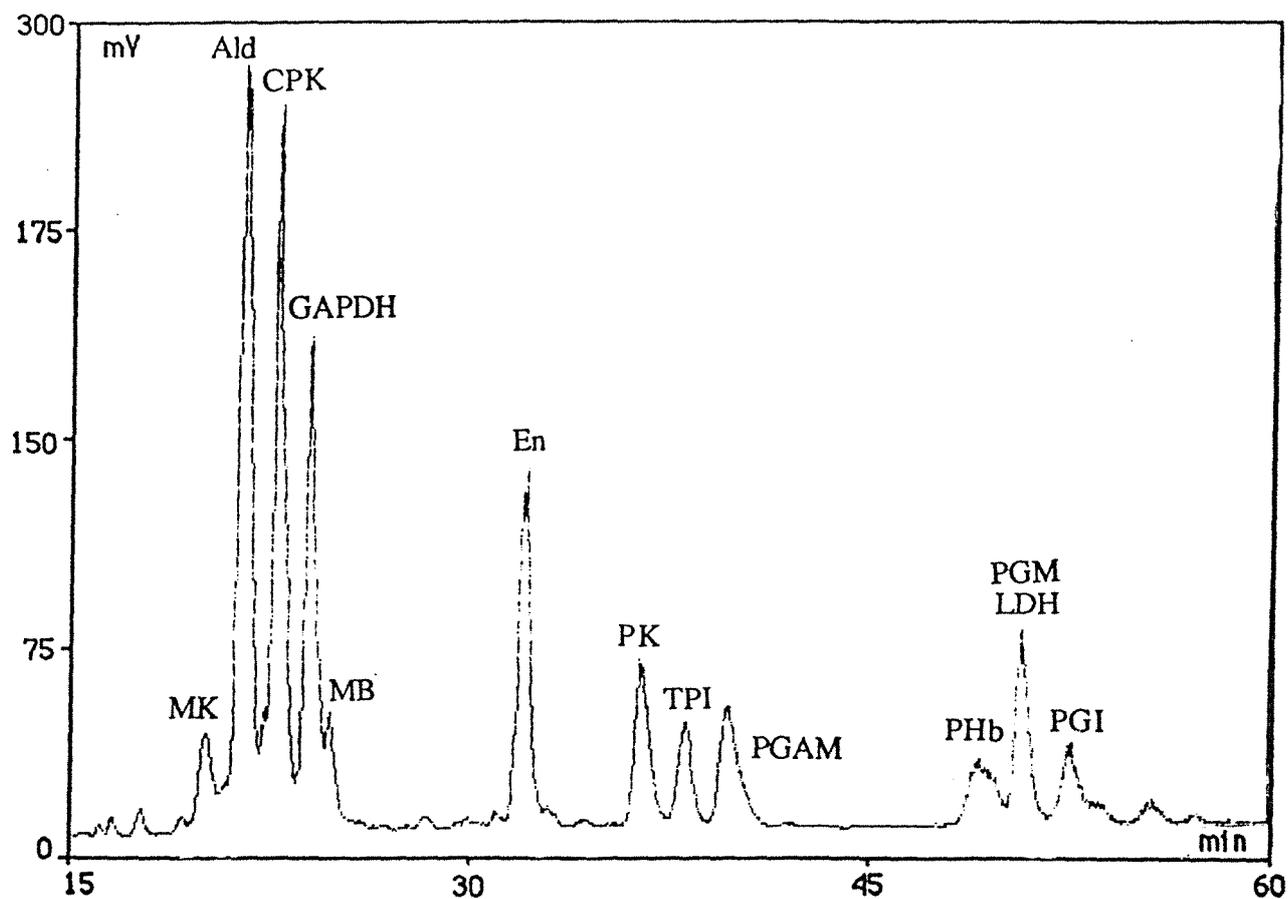


Figure 39 : Identification des pics selon la méthodologie décrite dans la partie Matériel et Méthodes. Séparation chromatographique d'un extrait de protéines solubles de muscle de porc obtenu sur VYDAC 214TP54

Débit 1,8 ml/min

Détection UV 215 nm. Gradient de 50 à 75% de solvant B sur 55 min

Solvant A : Eau + 0,1% TFA

Solvant B : Acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA

Les séparations sont bien reproductibles : pour cinq répétitions correspondant à un même échantillon, le coefficient de variation est de 0,7% pour les temps de rétention et de 8,3 % pour les teneurs en protéines (tableau 16).

Pic	Temps de rétention min		Teneur en protéines mg/g de muscle	
	Moyenne	Ec.type	Moyenne	Ec.Type
MK	19,5	0,1	1,2	0,1
Ald	20,5	0,2	6,0	0,6
CPK	21,9	0,2	4,8	0,5
GAPDH	23,1	0,1	6,6	0,4
MB	30,7	0,2	4,2	0,3
En	35,3	0,1	1,6	0,2
PK	36,9	0,4	1,1	0,1
TPI	39,1	0,5	1,4	0,1
PHb	47,3	0,1	1,5	0,2
PGM-LDH	48,6	0,2	1,5	0,1
PGI	50,5	0,2	1,8	0,1

Tableau 16 : Reproductibilité des séparations  
(nombre de répétitions = 5)

Les fluctuations des temps de rétention pour un même pic sont plus importantes en phase inverse qu'en exclusion (écarts-types respectifs de 0,2 et de 0,05). Nous avons constaté, sur certaines colonnes au cours de leur utilisation, un glissement des profils chromatographiques vers des temps d'élution plus élevés : augmentation d'une à deux minutes des temps de rétention pour un même pic. Cependant l'ordre relatif d'élution est toujours conservé, ce qui permet la comparaison de tous les chromatogrammes entre eux.

Notre étalonnage est en accord avec celui de McCORMICK et al. (1987) qui travaillent dans des conditions identiques. Signalons toutefois que nous ne retrouvons pas la présence de phosphoglycérate mutase au niveau du pic de l'aldolase et que la phosphorylase sort sous forme d'un pic unique alors que la lactate déshydrogénase et la phosphoglucomutase présentent un temps de rétention identique.

La récupération des protéines est de l'ordre de 94%, valeur plus faible qu'en perméation gel. Corrélativement, la durée de vie est plus limitée pour une colonne en phase inverse.

Les colonnes VYDAC 214TP54 sont utilisées avec précolonnes, leur durée de vie est limitée à 40 injections. Au delà, soit la colonne se bouche, soit on observe une détérioration des qualités résolutes.



## 2. PROTEINES SARCOPLASMIQUES ET CRITERES DE QUALITE DE LA VIANDE

Une fois la technique de séparation des protéines mise au point, nous avons précisé, dans un premier temps et pour nos conditions opératoires, les relations existant entre la concentration en protéines sarcoplasmiques d'une viande et certains critères qualitatifs, comme le pH<sub>1</sub>, le pH ultime, le pouvoir de rétention d'eau, les pertes en eau au stockage et la couleur.

Nous avons choisi de travailler dans des conditions réelles d'abattage avec les contraintes suivantes (basées sur les résultats d'études complémentaires portant sur l'influence de différents facteurs sur la cinétique de chute p.m du pH) :

- hétérogénéité génétique des animaux étudiés
- standardisation maximale des conditions d'abattage : tous les porcs ont été abattus le même jour, dans un même abattoir, après avoir subi les mêmes temps de jeûne, de transport et de repos avant abattage.

Travailler sur des animaux issus de schémas génétiques différents a été le moyen pour nous d'obtenir une gamme de viandes de qualités extrêmes sans avoir recours à des artifices pour provoquer l'apparition de défauts de qualité des viandes. Il est évident cependant que nos résultats devront être modulés, du fait même de l'effet significatif que la race exerce sur certains critères de qualité de la viande.

Pour des raisons pratiques de prélèvement, la concentration en protéines sarcoplasmiques est déterminée à partir d'échantillons prélevés à 48 h p.m qui ont été conservés congelés.

### 2.1. Protocole

Sur 72 porcs issus de schémas génétiques différents, le pH et la conductivité sont mesurés à 45 min et 20 h p.m; la couleur appréciée sur palette japonaise à 24h p.m.

Un échantillon de longissimus dorsi est prélevé à 48h p.m : 100 g sont utilisés pour la détermination des pertes au stockage, 6g pour l'estimation du pouvoir de rétention d'eau et le reste est congelé après broyage pour la détermination de la concentration en protéines sarcoplasmiques.

### 2.2. Résultats

Le tableau 17 rassemble les moyennes globales pour les 72 porcs étudiés.

Les mesures de pH pratiquées à 45 min et 20 h p.m permettent une classification qualitative



des viandes, les bornes retenues ont été relevées dans la littérature. Quatre types de qualités de viandes sont distingués (tableau 18) :

- viandes PSE .....  $pH_{45} \leq 6,0$
- viandes DFD.....  $pH_{45} > 6,0$  et  $pHu \geq 6,2$
- viandes acides .....  $pH_{45} > 6,0$  et  $pHu \leq 5,5$
- viandes normales.....  $pH_{45} > 6,0$  et  $5,5 < pHu < 6,2$

	Moyenne	Ecart-type	gamme
pH <sub>45</sub>	6,50	0,32	5,76-6,94
pHu	5,68	0,30	5,35-6,52
LF <sub>1</sub> mS/cm	4,53	1,85	0,80-10,10
LF <sub>u</sub> mS/cm	4,87	2,26	2,40-13,0
Couleur	2,99	0,71	1,5-5,0
PRE %	29,2	5,9	18,7-42,1
Pertes en eau %	4,0	1,4	0,4-6,9
Protéines sarcoplasmiques mg/g	31,6	5,0	22,0-42,3

Tableau 17 : Résultats globaux sur 72 porcs

	Viandes PSE	Viandes Acides	Viandes Normales	Viandes DFD
n	14	15	32	11
pH <sub>45</sub>	5,92 +/- 0,01	6,57 +/- 0,14	6,63 +/- 0,13	6,77 +/- 0,14
pHu	5,52 +/- 0,07	5,43 +/- 0,05	5,66 +/- 0,12	6,32 +/- 0,13
LF <sub>1</sub> mS/cm	7,18 +/- 1,51 a	3,67 +/- 1,20 b	3,97 +/- 1,10 b	3,96 +/- 1,67 b
LF <sub>u</sub> mS/cm	6,56 +/- 2,44 a	3,82 +/- 1,40 b	4,85 +/- 2,43 b	4,19 +/- 1,52 b
Couleur	2,29 +/- 0,33 a	2,77 +/- 0,50 b	2,98 +/- 0,52 b	4,23 +/- 0,43 c
PRE %	37,8 +/- 1,9 a	32,8 +/- 3,3 b	26,1 +/- 3,6 c	22,2 +/- 2,4 d
Pertes en eau %	5,8 +/- 0,8 a	5,5 +/- 1,0 a	3,4 +/- 1,5 b	1,8 +/- 1,4 c
Protéines sarcoplasmiques mg/g	24,8 +/- 2,1 a	28,7 +/- 1,4 b	33,5 +/- 3,4 c	38,6 +/- 2,6 d

Tableau 18 : Concentration en protéines sarcoplasmiques suivant la qualité de la viande (n = nombre d'échantillons)

La classification ainsi établie permet de définir 32 viandes de qualité normale que l'on désignera "viandes normales", 14 viandes acides, 15 viandes exsudatives et 11 viandes DFD.



### 2.2.1. La concentration en protéines sarcoplasmiques comme critère de qualité de la viande

Une analyse de variance met en lumière l'effet significatif de la classification, basée sur le pH<sub>1</sub> et le pH<sub>u</sub>, sur la concentration en protéines sarcoplasmiques. Les viandes normales à 48h p.m sont caractérisées par une teneur en protéines sarcoplasmiques extraites par l'eau de 33,5 mg/g. Les teneurs en protéines des différentes viandes s'écartent de cette valeur de :

- + 5,2 mg/g pour les viandes DFD (38,6 mg/g)
- 4,8 mg/g pour les viandes acides (28,7 mg/g)
- 8,7 mg/g pour les viandes PSE (24,8 mg/g)

Nos résultats confirment ceux de LUNDSTROM et al. (1984) qui observent une solubilité moindre des protéines sarcoplasmiques des viandes PSE par rapport aux viandes normales et des viandes normales par rapport aux viandes DFD, ainsi que ceux de LOPEZ-BOTE et al., (1989) qui utilisent la solubilité des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires pour discriminer les viandes normales des viandes PSE ou DFD. La concentration en protéines sarcoplasmiques apparait comme le meilleur indice de qualité pour une population de viandes normales et DFD alors que la concentration en protéines solubles totales apparait comme le meilleur indice de qualité pour une population de viandes normales et PSE. Globalement, pour une population hétérogène, les protéines sarcoplasmiques représentent le meilleur indice de qualité de la viande. L'extraction pratiquée avec du tampon phosphate permet d'atteindre une concentration de 55,2 mg/g chez les viandes normales, soit 65% de plus que par extraction à l'eau, dans notre cas. En tenant compte de ces observations, la solubilité des protéines sarcoplasmiques des viandes DFD, observée par LOPEZ-BOTE, est plus élevée que celle exprimée par nos résultats (+ 28%), tandis qu'elle est du même ordre de grandeur pour les viandes PSE.

BROWN (1992), qui travaillent dans des conditions identiques à celles de LOPEZ-BOTE, observent également des différences significatives de concentration en protéines sarcoplasmiques, déterminée à 20h p.m, entre des viandes normales et des viandes PSE; la qualité étant appréciée par les valeurs de pH<sub>1</sub> et de pH<sub>u</sub>.

A 48h p.m, la teneur en protéines sarcoplasmiques assure une bonne discrimination des viandes suivant leur qualité. Rappelons cependant que l'effet exercé par la qualité de la viande, définie par les pH<sub>45</sub> et pH<sub>u</sub>, sur la concentration en protéines sarcoplasmiques est à moduler par l'influence que la race exerce sur ces mêmes paramètres. Cette influence n'a pu être quantifiée au cours de notre travail du fait d'un problème d'identification des animaux lors de l'expérience.



La concentration en protéines sarcoplasmiques déterminée à 48 h p.m apparaît donc comme un indice possible de discrimination des viandes suivant leur qualité. L'application de cet indice à la prédiction *in vivo* nécessite de connaître l'évolution post-mortem des protéines sarcoplasmiques de la viande. La concentration observée à 48 h p.m résulte de l'histoire post-mortem de la viande (vitesse de chute du pH, vitesse de refroidissement) mais on peut se demander dans quelle mesure les différences mises en évidence à 48 h p.m existent également dans le muscle *in vivo*. Il apparaît donc nécessaire de préciser l'évolution des protéines sarcoplasmiques de la viande au cours du stockage pour discuter de la possibilité d'utiliser la concentration en protéines sarcoplasmiques comme estimateur de la qualité, voire comme prédicteur.

### 2.2.2. Variations des paramètres de qualité de la viande suivant le pH<sub>1</sub> et le pH<sub>u</sub>

Tous les paramètres étudiés sont significativement influencés par la qualité de la viande définie par les critères pH<sub>1</sub> et pH<sub>u</sub>.

- La conductivité 45 min et la conductivité 20h p.m discriminent les viandes PSE des autres types de viandes; la conductivité plus élevée reflète la fragilisation membranaire, conséquence de l'activation de la phospholipase A2 au cours de l'évolution p.m des viandes exsudatives.
- La couleur, bien qu'étant un critère subjectif (comparaison visuelle avec une palette de référence) présente des corrélations significatives avec les autres critères (+0,80 avec le pH ultime). On remarque cependant que la couleur des viandes acides n'est pas significativement différente de celle des viandes normales.
- Le pouvoir de rétention d'eau traduit la quantité de jus perdu par un échantillon de viande de quelques grammes soumis à une pression standard (figure 28) pendant une heure. Ce volume est plus important pour les viandes exsudatives (45% de plus pour les viandes exsudatives / viandes normales) et plus modéré pour les viandes DFD (-14% pour les viandes DFD / viandes normales).
- Les pertes en eau au cours du stockage de 100 g de viande pendant 48 heures à 4°C sont du même ordre de grandeur pour les viandes acides et les viandes exsudatives, mais significativement plus faibles pour les viandes normales. Les pertes des viandes DFD sont également plus faibles que celles des viandes normales (1,8% contre 3,4%, respectivement).

La concentration en protéines sarcoplasmiques présente des corrélations hautement significatives avec le pH<sub>1</sub>, le pH<sub>u</sub>, la couleur et le pouvoir de rétention d'eau (tableau 19) (figures 40 et 41).



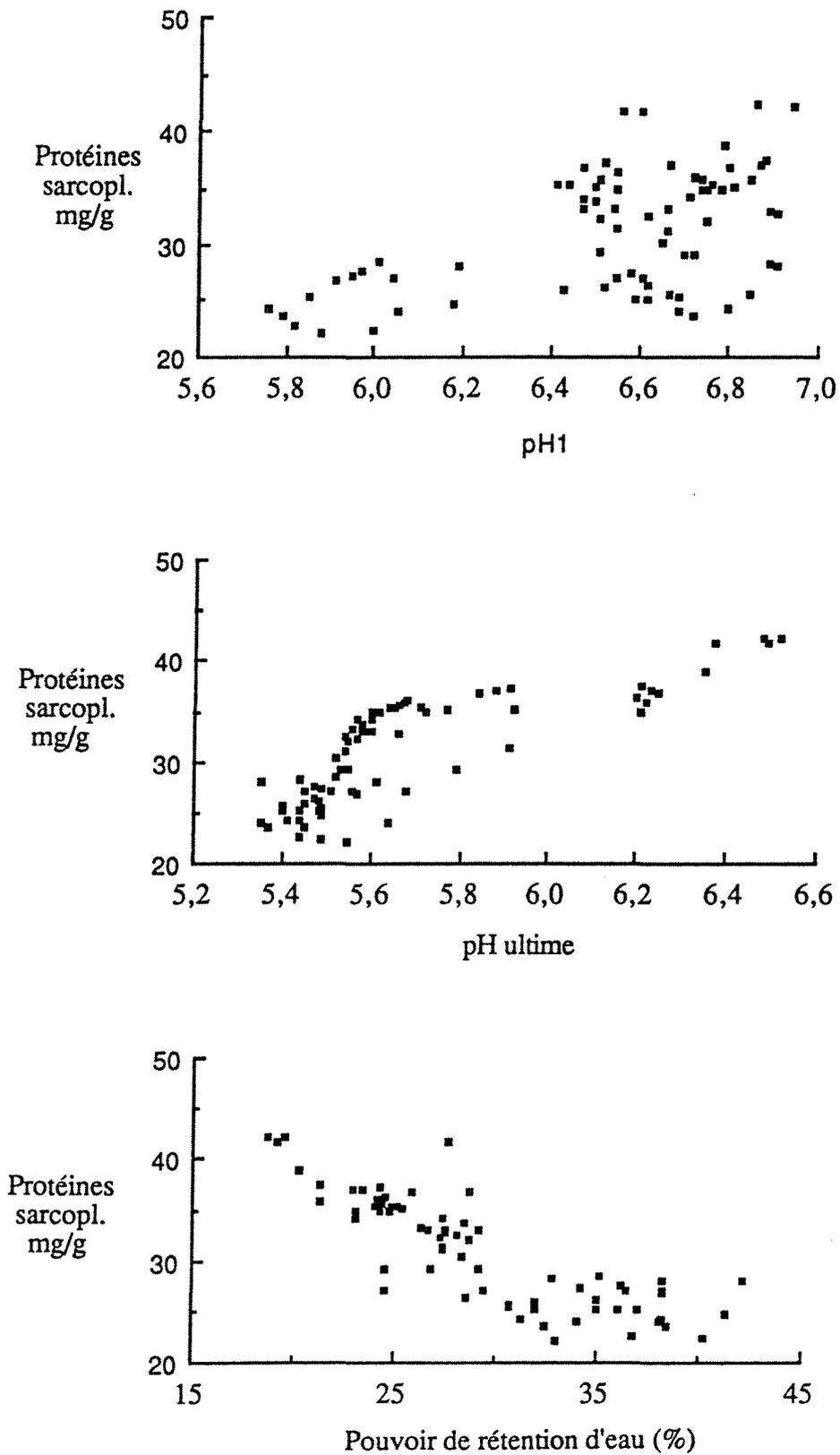


Figure 40 : Relations entre la concentration en protéines sarcoplasmiques et le pH1, le pHu et le pouvoir de rétention d'eau

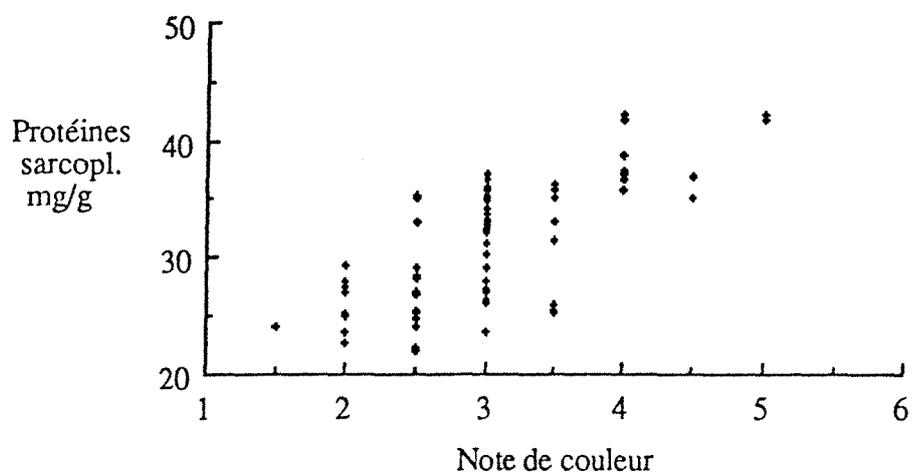
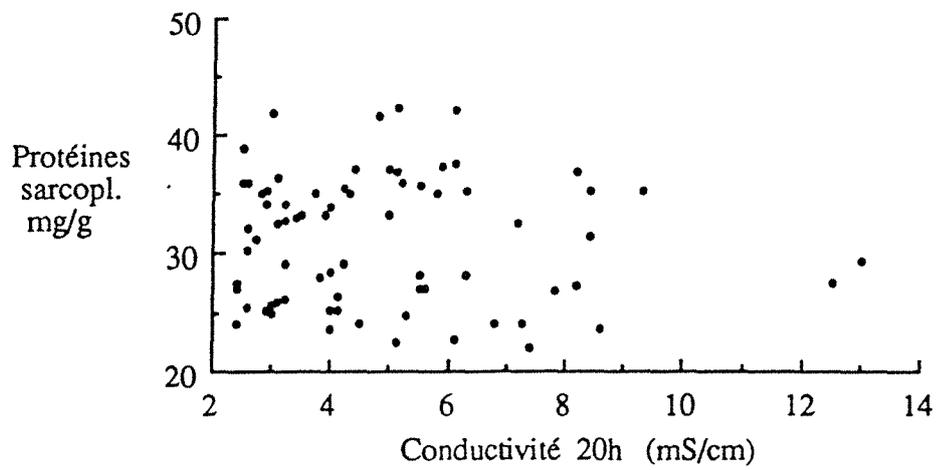
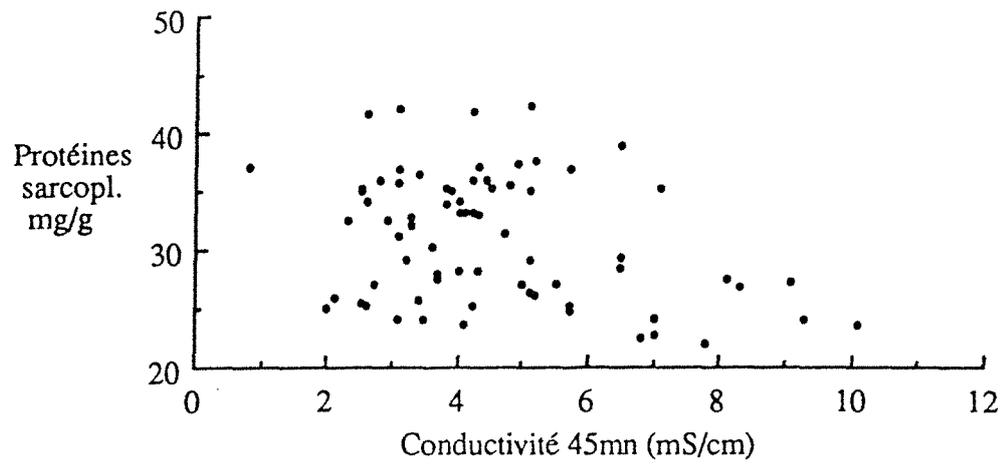


Figure 41 : Relations entre la concentration en protéines sarcoplasmiques et la conductivité 45 min et 20 h p.m et la couleur

	pH1	pHu	LF1	LFu	Couleur	PRE	P. eau	Protéines
pH1	1	0,40	-0,65	-0,31	0,55	-0,74	-0,42	0,71
pHu		1	-0,10	-0,02	0,80	-0,67	-0,69	0,77
LF1			1	0,53	-0,43	0,41	+0,28	-0,43
LFu				1	-0,28	0,19	+0,08	-0,13
Couleur					1	-0,69	-0,60	0,75
PRE						1	+0,74	-0,85
P. eau							1	-0,81
Protéines								1

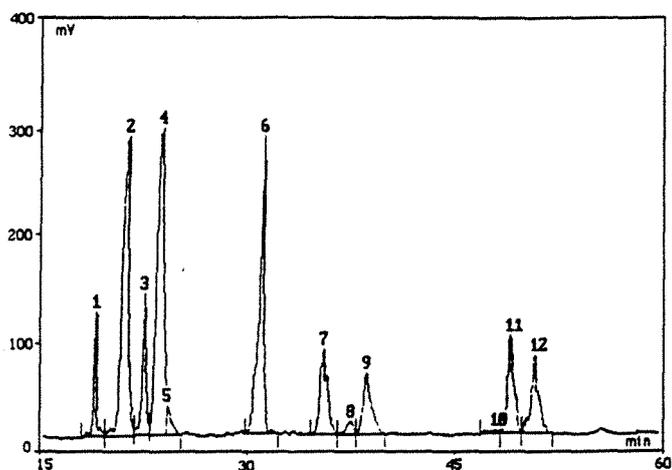
Tableau 19 : Matrice de corrélation des caractéristiques de la qualité de la viande

### 2.2.3. Composition en protéines sarcoplasmiques en fonction de la qualité de la viande

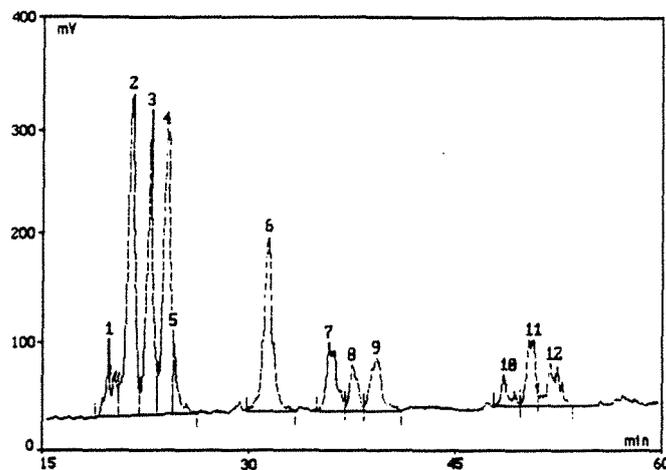
Deux échantillons de chaque catégorie de viandes sont passés en chromatographie à polarité de phase inversée sur colonne VYDAC 214TP54. Le tableau 20 donne les concentrations moyennes en protéines de chaque pic pour les quatre types de viandes définis précédemment, tandis que sur la figure 42 sont reportés les chromatogrammes.

Protéine	Viandes PSE		Viandes acides		Viandes normales		Viandes DFD	
	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %
MK	1,1	4,2	1,5	5,1	1,4	4,2	1,5	4,0
ALD	5,3	20,8	6,3	21,7	7,0	20,9	7,4	19,4
CPK	1,5	5,8	5,0	17,2	5,2	15,4	5,7	15,1
GAPDH	6,4	25,0	4,0	13,7	6,1	18,2	7,3	19,3
MB	0,4	1,4			0,9	2,6	0,8	2,2
En	4,1	16,0	4,0	13,6	4,5	13,4	4,8	12,7
PK	1,8	7,0	1,7	5,8	2,0	5,8	2,2	5,8
TPI	0,2	0,9	1,0	3,6	1,0	3,1	1,5	3,9
PGAM	1,3	5,2	1,3	4,6	1,7	5,1	1,6	4,3
PHb	0,1	0,5	1,4	4,9	0,7	2,0	1,6	4,3
PGM-LDH	1,8	7,1	1,6	5,6	1,7	5,1	2,1	5,4
PGI	1,5	6,1	1,2	4,1	1,4	4,2	1,6	4,1
Teneur tot.	25,5		29,0		33,6		38,1	

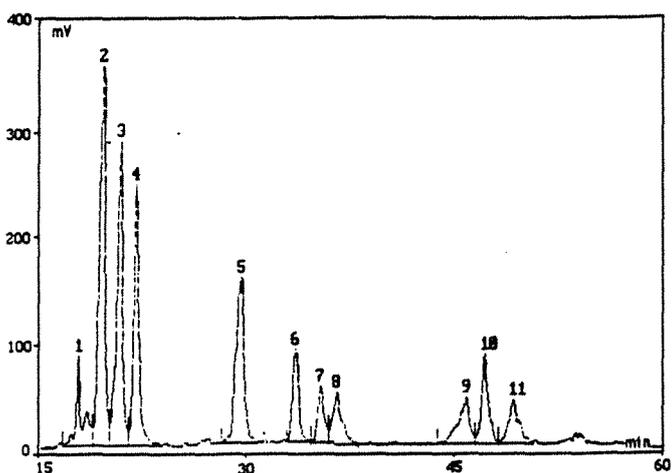
Tableau 20 : Teneur en protéines sarcoplasmiques des 4 types de viandes



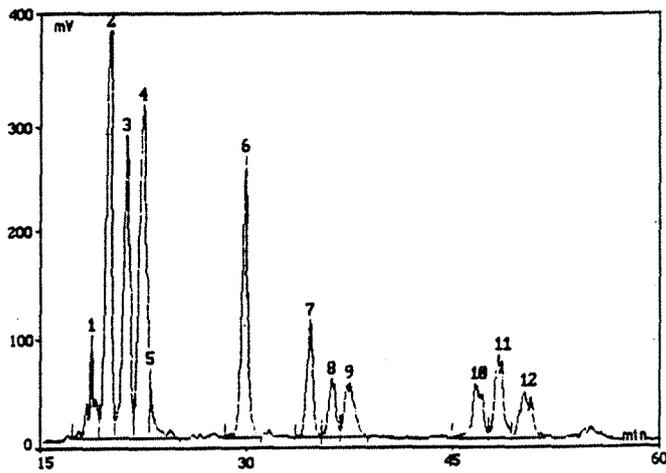
**Viande PSE**



**Viande Normale**



**Viande acide**



**Viande DFD**

Figure 42 : Profils chromatographiques d'extraits musculaires de 4 types de qualité de viande (48h p.m) sur VYDAC 214TP54

Débit 1,8 ml/min

Détection UV 215 nm. Gradient de 50 à 75 % de solvant B sur 55 min

Solvant A : eau + 0,1% TFA

Solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA

On peut donc remarquer d'après la figure 42 que :

- les viandes PSE sont caractérisées par une teneur faible en créatine phosphate kinase (teneur de 1,5 mg/g de muscle pour les viandes exsudatives contre 5,2 pour les viandes normales), en triose phosphate isomérase (0,2 contre 1,0) et en phosphorylase b (0,1 contre 0,7).
- les viandes PSE renferment également une quantité sensiblement plus faible de myokinase, d'aldolase et de myoglobine.
- les viandes acides présentent une teneur anormalement faible en glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase ainsi qu'une teneur en aldolase plus importante que pour les viandes exsudatives mais, en tout cas, plus faible que pour les viandes normales.
- les viandes DFD présentent, quant à elles, une teneur élevée en glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase ainsi qu'en phosphorylase b.

Pour limiter le nombre d'injections en chromatographie (les colonnes sont relativement chères et ont une durée de vie faible), nous avons analysé par HPLC deux échantillons pour chaque type de viandes. L'exploitation de cette technique à grande échelle à des fins de caractérisation de la qualité des viandes nécessiterait d'affiner ces résultats sur un plus grand nombre d'échantillons.

Les différences de composition en protéines sarcoplasmiques observées entre les extraits de viandes normales et ceux de viandes exsudatives nous confortent dans notre choix d'étudier les protéines sarcoplasmiques comme facteur de discrimination des viandes suivant leur qualité.



### 3. COMPORTEMENT DES PROTÉINES SARCOPLASMIQUES AU COURS DU STOCKAGE

Notre objectif à long terme est la mise au point d'une méthode de détermination pratiquée sur le muscle vivant permettant la prédiction de la qualité ultime de la viande. Notre démarche devrait consister maintenant à vérifier si les différences de concentrations en protéines sarcoplasmiques observées à 48h p.m se retrouvent sur le muscle vivant. Cette vérification nécessite la pratique de biopsie, technique lourde à mettre en oeuvre, qui n'était pas envisageable à ce stade de notre étude.

Nous avons donc choisi d'étudier l'influence du stockage sur les protéines sarcoplasmiques en commençant le plus tôt possible après l'abattage de façon à ce que la métabolisme post-mortem modifie le moins possible les protéines sarcoplasmiques.

Cependant, compte tenu des contraintes imposées par le circuit commercial normal des carcasses, il ne nous a pas été possible d'effectuer de prélèvement de viande avant 2h p.m.

L'étude du stockage n'a débuté qu'à 4h p.m et a été limitée à une semaine de conservation en sachet plastique à 4°C.

A 2h p.m, un échantillon est prélevé au niveau de la 3-4<sup>ème</sup> dernière côte; débarrassé de l'os, du tissu conjonctif et du gras de couverture, l'échantillon est haché puis conservé à 4°C sous atmosphère d'air jusqu'au moment de l'analyse après différents délais de stockage.

Le hachage modifie la structure de la viande. De plus, la rupture des membranes cellulaires, en favorisant les contacts enzymes-substrats, exacerbe le métabolisme. De fait, le hachage d'une viande non maturée entraîne une accélération de l'acidification de la viande sans, pour autant, influencer la valeur ultime du pH. XIONG et ANGLEMIER (1989) ont montré sur le longissimus dorsi de boeuf qu'il n'existe pas de différences marquées dans l'évolution des protéines sarcoplasmiques extraites à partir de viande entière ou de viande hachée. Par ailleurs, le hachage de la viande permet d'obtenir un échantillon de composition relativement homogène à partir d'une matière première très hétérogène. Le hachage avec une grille à trous de 3 mm de diamètre assure également l'élimination d'une partie des tissus conjonctif et adipeux contenus dans la masse musculaire.

La conservation sous atmosphère d'air influence l'état d'oxydation de la myoglobine, (initialement sous forme d'oxymyoglobine, la myoglobine s'auto-oxyde en quelques jours en metmyoglobine), mais n'influence pas la concentration en protéines de la viande.



Nous nous sommes focalisés sur le comportement des viandes normales et des viandes exsudatives et avons standardisé au maximum les conditions opératoires. La distinction entre les deux types de viande est basée sur la vitesse et l'amplitude de la glycolyse.

Nous nous intéresserons, dans un premier temps, à l'évolution de viandes de qualité normale que l'on définit par deux critères: -  $\text{pH}_1 > 6,0$   
-  $5,5 < \text{pHu} < 6,2$

### 3.1. Cas des viandes de qualité normale

#### 3.1.1. Protocole

Dix échantillons de longissimus dorsi de viande normale sont hachés et stockés à 4°C. Pour des durées croissantes de conservation comprises entre 4 h et 168 h p.m, 10 g de chaque échantillon sont prélevés pour l'extraction des protéines que l'on dose par la méthode BCA. Deux extraits sont analysés par HPLC.

#### 3.1.2. Evolution de la teneur en protéines

La solubilité des protéines diminue progressivement au cours du temps : 8,5% des protéines sont insolubilisées au cours des premières 48 heures contre 6,3% entre 48 et 96h p.m. Au total, au bout de 6 jours de stockage, on enregistre une diminution de solubilité de 25,7%. La figure 43 retrace l'évolution au cours du stockage de la concentration en protéines sarcoplasmiques rapportée à la concentration déterminée au temps 4 h p.m.

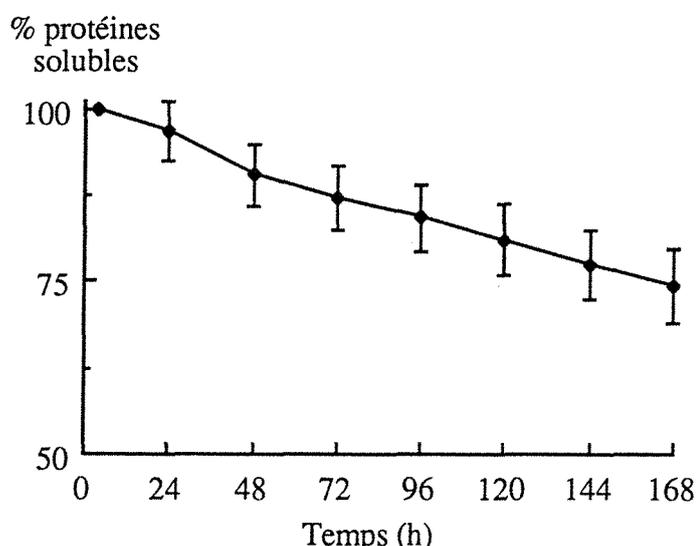


Figure 43: Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques au cours d'un stockage à 4°C sous atmosphère d'air

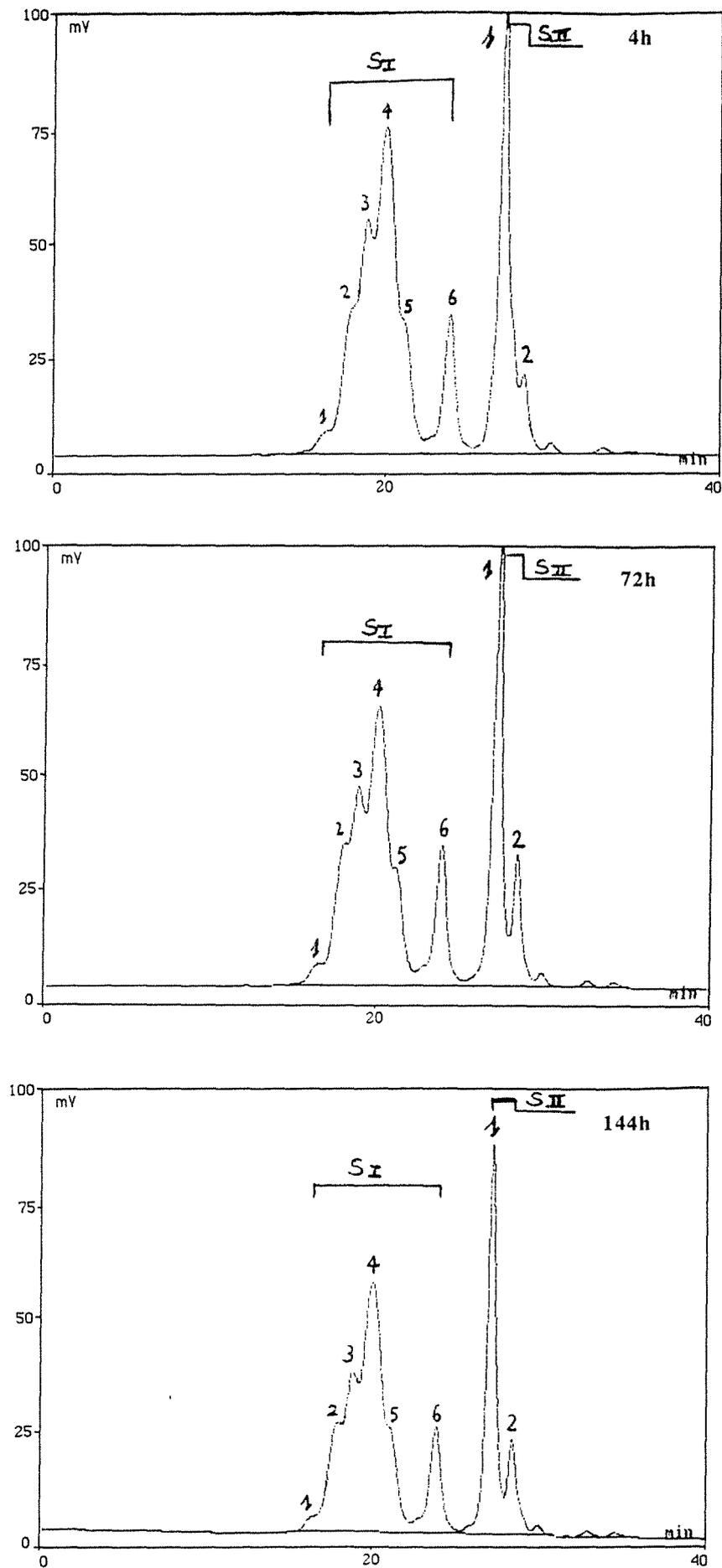


Figure 44 : Evolution au cours du stockage des protéines sarcoplasmiques de viande normale appréciée en chromatographie d'exclusion sur gel

TSK G3000SW  
 Tampon phosphate M/15 pH 6,8 + NaCl 0,1M + 0,03% NaN<sub>3</sub>  
 Débit 0,5 ml/min  
 Détection UV 280 nm

Nos résultats sont sensiblement différents de ceux de SPANIER et al. (1990), qui rapportent, sur muscle de boeuf, une diminution rapide de la solubilité de 16% entre 3,5 h et 26 h p.m (à opposer à 8% dans nos conditions opératoires) puis une diminution progressive de 26 à 360 h (12%).

Cette tendance est confirmée par l'analyse du contenu en protéines sarcoplasmiques par perméation gel (figure 44 et tableau 21):

- Evolution progressive sur 6 jours

- Au bout de 168h, la diminution de la surface totale du chromatogramme est de 24,4% par rapport au temps de référence 4h p.m, ce qui équivaut à une diminution importante de solubilité imputable en grande partie sans doute à la dénaturation des protéines, à la suite d'une oxydation. On n'observe cependant aucune évolution perceptible de la couleur.

Temps (h)	4	12	72	168
Surface Pics I (mV.min)	220,75	215,24	196,07	166,79
Surface Pics II (mV.min)	96,50	96,45	91,83	86,83

Tableau 21 : Evolution de la surface des pics des protéines séparées par gel perméation en fonction du temps de conservation de la viande

On remarque une légère augmentation de surface du pic 2 de la deuxième série de pics, qui tend à se détacher du pic 1 et qui pourrait être le signe d'une légère protéolyse. Cependant la surface totale de chaque série de pics diminue au cours du temps, en relation avec une insolubilisation progressive des protéines. Il est donc possible qu'il y ait une légère protéolyse des composés solubles au cours du stockage avec production de peptides, comme en témoigne le pic 2 de la série II. Ce processus pourrait être contrarié par une insolubilisation qui entraîne la diminution de surface des pics chromatographiques.

Par ailleurs, il ne nous est pas possible de discuter de l'apparition éventuelle de l' $\alpha$ .actinine dans l'extrait, selon les observations de XIONG et ANGLEMIER sur le longissimus de boeuf. En effet, de poids moléculaire 95 000 D, l' $\alpha$ .actinine devrait sortir vers 19,15 min, c'est-à-dire au niveau des troisième et quatrième pics; la résolution insuffisante du profil empêche toute conclusion définitive.

On peut donc dire que, dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas, au cours du stockage, passage en solution de grosses molécules provenant des myofibrilles. Nous ne confirmons pas les résultats de XIONG et ANGLEMIER (1989) qui observent la présence, parmi les protéines solubles extraites par un tampon Tris-HCl 50 mM- KCl 100 mM, de

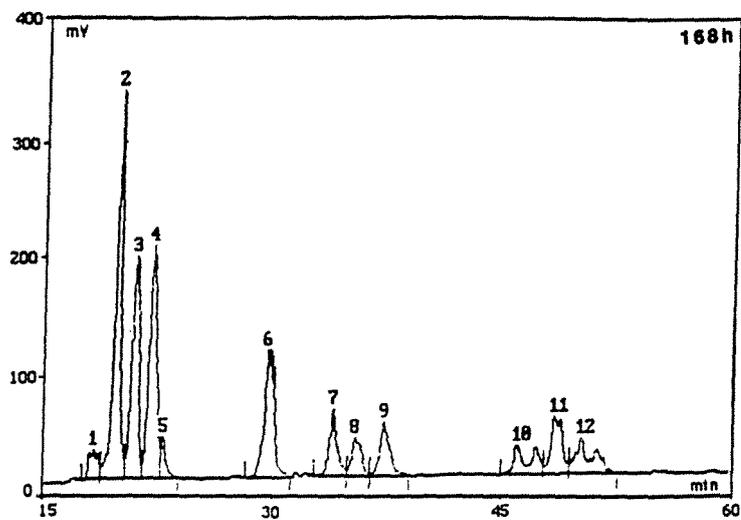
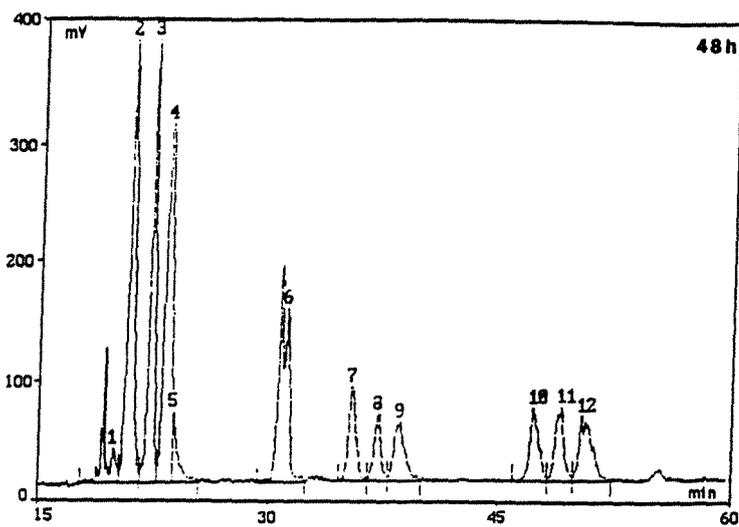
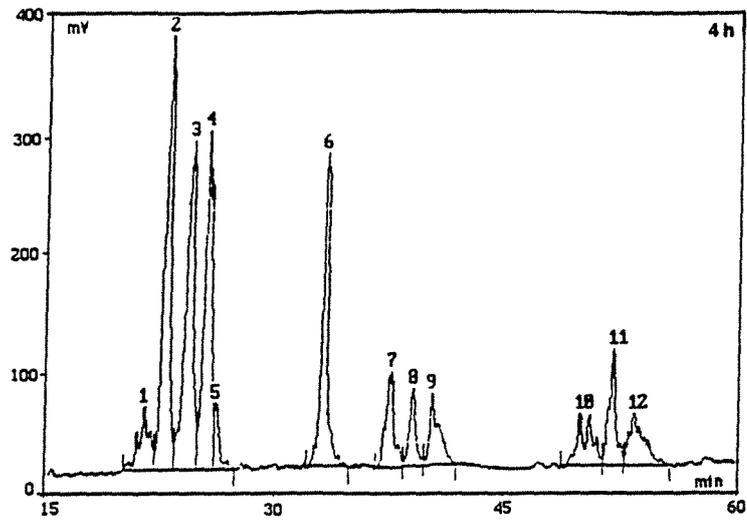


Figure 45 : Evolution au cours du temps de stockage des protéines sarcoplasmiques de viande normale appréciée par chromatographie à polarité de phase inversée

VYDAC 214TP54

Détection UV 215 nm

Débit 1,8 ml/min avec gradient de 50 à 75 % de solvant B sur 55 min

Solvant A : eau + 0,1% TFA

Solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA

composés de poids moléculaires supérieurs à 500 000 D, à partir de muscle de boeuf haché stocké en sachet plastique à 2°C pendant 6 jours. Il est possible dans ces conditions que ce phénomène ne survienne pas avant une semaine de conservation chez le porc ou bien que ces protéines d'origine myofibrillaire ne soient pas extraites par l'eau.

### 3.1.3. Evolution de la composition en protéines

Le passage d'un échantillon d'extrait soluble sur phase inverse corrobore les résultats précédents obtenus en perméation gel (figure 45). La concentration totale en protéines au bout de 4h p.m est de 35,5 mg/g de muscle, tandis qu'elle n'est plus que de 25,2 mg/g après 6 jours de conservation.

Dans le tableau 22 sont répertoriées les évolutions absolues et relatives de chaque constituant protéique. Alors que la concentration en protéines (BCA) attribuée à chaque pic diminue au cours du temps, la proportion relative de chaque protéine dans l'extrait reste sensiblement constante.

Pic	4h		48h		168h	
	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %
MK	1,5	4,1	1,4	4,2	0,9	3,4
Ald	6,7	19,0	6,1	18,6	5,1	20,4
CPK	6,4	18,1	5,2	15,7	3,7	14,8
GAPDH	5,8	16,3	6,0	18,2	4,1	16,5
MB	0,9	2,4	0,8	2,4	0,6	2,3
En	4,4	12,5	4,4	13,5	3,4	13,4
PK	1,8	5,2	1,7	5,0	1,2	4,9
TPI	1,2	3,3	1,0	3,2	0,5	3,4
PGAM	1,6	4,4	1,5	4,6	1,2	4,8
PHb	1,6	4,6	1,5	4,5	1,2	4,6
PGM-LDH	1,8	5,0	1,6	4,7	1,5	5,9
PGI	1,8	5,0	1,8	5,5	1,4	5,6
Teneur totale	35,5		33,0		25,2	

Tableau 22: Evolution en fonction du temps de la teneur en protéines d'un extrait musculaire de viande normale sur VYDAC 214 TP 54 .

La phosphorylase b, protéine très fragile, représente 1,6 mg/g de protéines 4 heures après l'abattage (4h p.m) (soit 4,6% des protéines totales); sa concentration n'est plus que de



1,2 mg/g après 168h de conservation (soit toujours 4,6% des protéines totales). L'énolase présente une concentration de 4,4 mg/g (soit 12,5% ) à 4h p.m et de 3,4 mg/g après 6 jours (soit 13,4% ).

On peut donc en conclure que le délai de conservation des échantillons induit une insolubilisation progressive de toutes les protéines sarcoplasmiques à des degrés différents. La majorité des protéines subissent une insolubilisation de l'ordre de 15 à 25% (aldolase, glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase, enolase, triose phosphate isomérase, phosphoglycérate mutase, phosphoglucose isomérase).

Certains protéines présentent toutefois des niveaux d'insolubilisation plus marqués :

- la perte de solubilité de la créatine phosphate kinase et de la myokinase atteint 40%.
- la myoglobine et la pyruvate kinase sont insolubilisées à 32%.

Le pH de la viande hachée évolue en moyenne dans les vingt premières heures de stockage, de 6,35 à 4h p.m à 5,65 au bout de 20h p.m en moyenne. Par la suite, le pH se stabilise. La diminution de solubilité observée au cours des premières vingt heures peut donc être en partie imputable à la diminution du pH.

Le pic 10, temps de rétention 49,1 min, identifié à la lactate déshydrogénase et à la phosphorylase, a tendance, pour certains échantillons, à se dédoubler à partir de 48 h p.m en deux pics  $t_{r1} = 48,5$  et  $t_{r2} = 48,7$  min correspondant respectivement à chacune des deux protéines.

L' $\alpha$ .actinine de poulet (SIGMA A9776) présente un pic bien individualisé avec un temps de rétention de 48,5 min. La présence d' $\alpha$ .actinine dans l'extrait musculaire devrait donc être révélée par l'apparition d'un pic épaulé au pic 10 ou par l'augmentation de surface de ce pic. Cependant, aucune augmentation de surface du pic 10 n'est observée au cours du temps; il s'agit plutôt du contraire. Il est possible que la diminution de surface de ce pic attribuée à l'insolubilisation progressive de la lactate déshydrogénase et de la phosphorylase b puisse masquer l'apparition de l' $\alpha$ .actinine dans l'extrait sarcoplasmique, cependant il n'est pas possible dans l'état actuel de nos conditions opératoires d'en apporter la preuve.

#### 3.1.4. Quantification de la protéolyse

Le Calcium Activated Factor, présent dans le sarcoplasme (GOLL et al., 1983), pourrait avoir un effet protéolytique sur les protéines sarcoplasmiques accompagné de la libération d'acides aminés dans le sarcoplasme. L'accroissement de la teneur en azote  $\alpha$ .aminé a permis d'apprécier cette activité protéolytique.



Nous avons vu, dans la première partie, que la plus petite protéine de l'extrait musculaire est la myoglobine de poids moléculaire 17 000-18 000 D. Les protéines ont été éliminées de l'extrait par ultrafiltration sur membrane de seuil de coupure égal à 10 000 D; l'azote  $\alpha$ .aminé est finalement dosé dans l'ultrafiltrat par la méthode de HABEED (1966).

La teneur en composés à azote  $\alpha$ .aminé libérés au bout de 24h p.m est de l'ordre de 2,3  $\mu$ mole équivalent méthionine/g de muscle contre 2,7 après 7 jours p.m (figure 46).

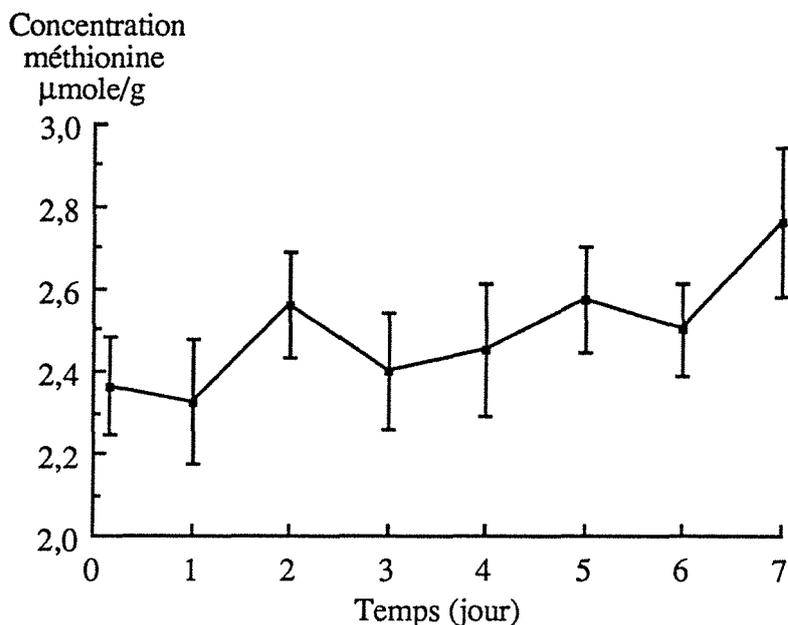


Figure 46 : Evolution de la teneur en composés à azote  $\alpha$ .aminé libérés dans le sarcoplasme au cours du stockage

Le coefficient de variation de cette détermination est de 4,8% pour 10 échantillons. L'écart-type moyen est ici de 0,02 mg/l.

On n'observe donc pas d'évolution significative de la concentration sarcoplasmique en azote  $\alpha$ .aminé au cours de la conservation. Nos observations confirment donc les résultats de SHARP (1963), DAVEY et GILBERT (1966) et EWAN et al. (1979). La tendance à la diminution de la solubilité des protéines après 7 jours de stockage ne se traduit pas pour autant par une augmentation de la teneur en azote  $\alpha$ .aminé libre.

### 3.2. Viandes exsudatives

Un protocole identique à celui des viandes de qualité normale a été appliqué à 10 échantillons de viande sélectionnés pour leur  $pH_1$  inférieur à 6,0.



### 3.2.1. Evolution de la concentration protéique

La concentration en protéines de l'extrait sarcoplasmique diminue sensiblement plus rapidement que dans le cas des viandes de qualité normale : 25,9% de protéines insolubilisées au bout de 72h contre 12,9% pour une viande normale par rapport au temps 4h p.m. Après 6 jours de stockage, la perte de solubilité est de l'ordre de 40% dans le cas des viandes PSE (figure 47).

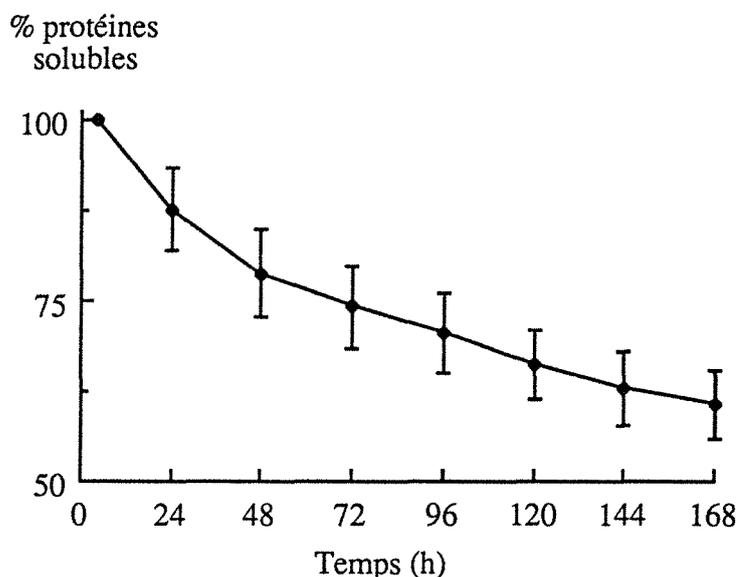


Figure 47: Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques appréciée par dosage BCA  
- cas des viandes exsudatives-

L'insolubilisation des protéines au cours de la conservation s'avère plus marquée dans le cas des viandes exsudatives.

La comparaison des moyennes obtenues pour les deux types de viande (test T) montre que, pour toutes les durées de stockage envisagées, les taux de protéines insolubilisées des viandes normales et des viandes exsudatives présentent des différences significatives.

Par ailleurs, un test T pratiqué sur les différences de taux d'insolubilisation entre deux délais successifs de stockage montre que les pentes des courbes des viandes normales et des viandes exsudatives sont significativement différentes au seuil de 1% à 24h p.m et au seuil de 5% à 48h p.m. Au-delà de 48h p.m de conservation, on n'observe plus de différences notables.

Une modélisation simple des cinétiques d'insolubilisation nous amène à considérer:

- la courbe moyenne des viandes normales comme une droite d'équation  $y = - 0,16x + 99,47$  avec un coefficient de détermination  $r^2 = 0,88$  et un écart-type résiduel ETR = 4,5
- la courbe moyenne des viandes exsudatives comme deux sections linéaires de pentes très différentes, la première, de 4 à 32h p.m, ayant pour équation  $y = - 0,62x + 102,45$  avec  $r^2 = 0,85$  et ETR = 4,13 et la deuxième, jusqu'à 168h p.m,  $y = - 0,15x + 85,36$  avec  $r^2 = 0,77$  et ETR = 5,25.



La principale différence dans l'insolubilisation des protéines sarcoplasmiques au cours du stockage de viandes normales et de viandes exsudatives porte sur les premières 24 heures (pente de - 0,16 pour les viandes normales contre - 0,62 pour les viandes PSE) : les viandes exsudatives sont caractérisées par un taux d'insolubilisation de 12,4 % entre 4 et 24h p.m, ce taux est de 3,2% dans le cas des viandes normales.

Il faut noter par ailleurs que la concentration en protéines sarcoplasmiques au bout de 4h p.m est notablement plus faible pour les viandes PSE : 32,3mg/g que pour les viandes normales (35,2 mg/g). En extrapolant les courbes d'évolution de la solubilité des protéines en fonction du temps de stockage, on obtient une approximation des concentrations en protéines au moment de l'abattage à t = 0 h p.m:

- pour les viandes normales, 35,4 mg/g
- pour les viandes PSE, 33,1 mg/g.

Les 4 premières heures après l'abattage sont le siège d'une évolution très rapide des protéines sarcoplasmiques dans le cas des viandes PSE : 2,5% de protéines précipitées contre 0,6% dans le cas des viandes normales.

La protéolyse des protéines sarcoplasmiques étant insignifiante, les modifications observées au cours de la conservation sont imputables à deux facteurs principaux: le pH et la température. Le pH évolue exclusivement pendant les vingt premières heures post-abattage; la diminution du pH est très rapide dans les viandes exsudatives dans les toutes premières heures après la mort. Au bout d'une heure p.m, au moment du prélèvement, le pH est de 5,95 et la température de 39°C; à 4h p.m après transport et préparation des échantillons, le pH est de 5,65 alors que la température est encore de 18°C. C'est au cours de cette période que les protéines de viandes exsudatives sont dénaturées: 12,4% de protéines sont insolubilisées entre 4 et 24h, soit 14,9% en tenant compte de l'extrapolation au temps 0h p.m. Cette observation est à opposer respectivement aux résultats d'insolubilisation de 3,2% (4 et 24h) et 3,8% (0 et 24h) pour les viandes normales. Au moment de l'abattage, il n'existe qu'une faible différence de teneurs en protéines entre les viandes normales et les viandes PSE, soit 2,3 mg/g à t<sub>0</sub>. Cette différence s'amplifie au cours du stockage : 2,9 à 4h; 6,9 à 96h et se stabilise autour de 6-7 mg/g après 5-6 jours.

Nos résultats sont en contradiction avec ceux de CHARPENTIER et GOUTEFONGEA (1963), de BORCHERT et al. (1969) ainsi que ceux de EWAN et al. (1979); ces auteurs, en effet, n'ont pas observé de différences dans l'évolution des protéines sarcoplasmiques, étudiées par électrophorèse sur gel d'amidon, entre viandes PSE et viandes normales au cours du temps. EWAN et al. (1979) mettent en cause les diverses techniques utilisées qui peuvent générer des résultats différents.

En revanche, nos résultats vont dans le sens de ceux de MA et ADDIS (1973); ces auteurs



notent une modification des teneurs en protéines sarcoplasmiques représentant 19% des protéines solubles au moment de l'abattage et 16% au bout de 24h p.m, soit une évolution de 3% en 24h. Ajoutons que PENNY (1969) avance une dénaturation de 12% des protéines sarcoplasmiques au cours de la maturation des viandes normales tandis que cette dernière peut atteindre 28 à 45% dans le cas des PSE extrêmes. SAYRE et BRISKEY (1963) obtiennent une réduction de 20% de la concentration en protéines sarcoplasmiques par simulation de la condition PSE (incubation 4h à 37°C), tandis que HONIKEL et KIM (1986) estiment également cette dénaturation à 20% par analyse enthalpique différentielle.

### 3.2.2. Evolution de la composition en protéines

La concentration totale en protéines est de 32,1 mg/g de muscle à 4h p.m, elle passe à 25,4 après 48h et à 18,5 au bout de 168h, ce qui se traduit par une diminution globale de la solubilité de 42,4% (tableau 23).

Pic	4h		48h		168h	
	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %
MK	1,2	3,6	1,0	4,1	1,0	5,6
Ald	7,7	23,9	5,3	20,8	4,9	26,4
CPK	2,4	7,4	1,4	5,7	0,2	1,0
GAPDH	6,4	19,8	6,6	25,8	4,4	23,9
MB	1,1	3,5	0,4	1,4	0,2	1,3
En	4,8	14,8	4,1	16,0	2,6	13,8
PK	2,2	6,8	1,8	7,0	1,6	8,8
TPI	0,6	2,0	0,2	0,9		
PGAM	1,8	5,7	1,3	5,1	0,8	4,5
PHb	0,4	1,2	0,1	0,5		
PGM-LDH	2,2	7,0	1,8	7,1	2,0	10,7
PGI	1,3	4,2	1,4	5,6	0,8	4,1
Teneur totale	32,1		25,4		18,5	

Tableau 23: Evolution en fonction du temps de la teneur en protéines d'un extrait de viande exsudative sur VYDAC214TP54

On note des différences de composition entre les viandes normales et les viandes PSE déjà à 4h p.m (tableau 24). Certaines protéines sont dénaturées dès 4 h p.m dans le cas des viandes

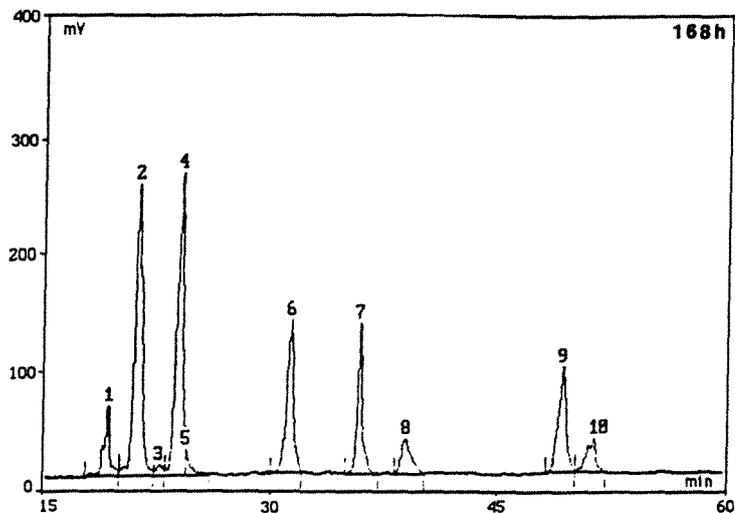
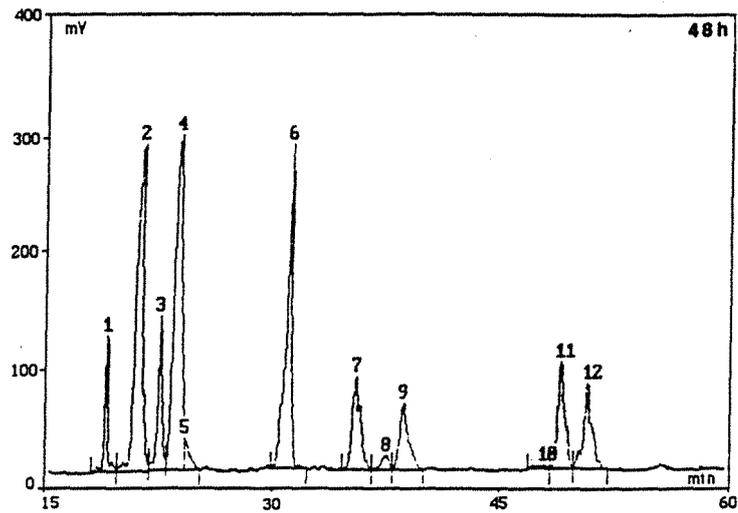
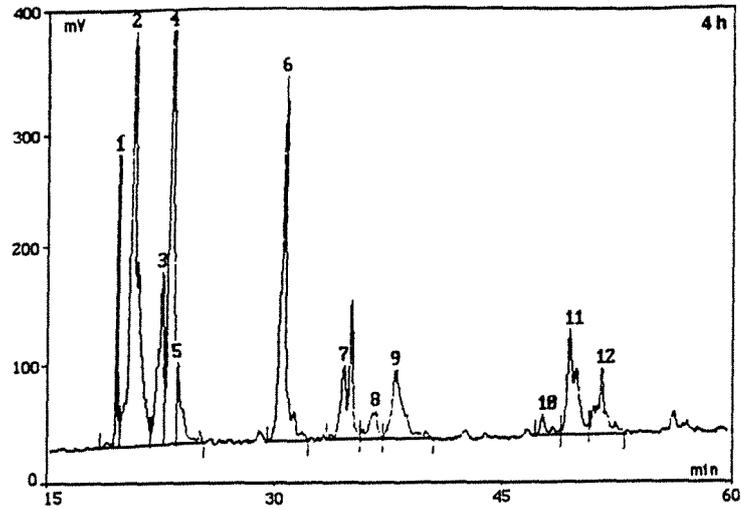


Figure 48 : Evolution au cours du temps de stockage des protéines sarcoplasmiques de viande exsudative appréciée par chromatographie à polarité de phase inversée

VYDAC 214TP54

Détection UV 215 nm

Débit 1,8 ml/min avec gradient de 50 à 75 % de solvant B sur 55 min

Solvant A : eau + 0,1% TFA

Solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA

exsudatives. On note des différences de teneurs relatives entre les deux types de viandes de 18,1 à 7,4% pour la créatine phosphate kinase, 3,3 à 2,0% pour la triose phosphate isomérase, 4,6 à 1,2% pour la phosphorylase b et 5,0 à 4,2% pour la phosphoglucose isomérase.

	Viandes normales		Viandes exsudatives	
	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %	Teneur protéines mg/g de muscle	Teneur relative %
Créatine phosphate kinase	6,4	18,1	2,4	7,4
Triose phosphate isomérase	1,2	3,3	0,6	2,0
Phosphorylase b	1,6	4,6	0,4	1,2
Phosphoglucose isomérase	1,8	5,0	1,3	4,2

Tableau 24 : Teneur en protéines d'extraits de viandes normale et exsudative à 4 h p.m (chromatographie sur VYDAC 214TP54)

Le profil chromatographique d'un extrait soluble de viande PSE se modifie de façon importante au cours du stockage (figure 48):

- insolubilisation totale de la phosphorylase b à partir de 72h p.m
- insolubilisation totale de la triose phosphate isomérase à partir de 96h p.m
- diminution drastique de la créatine phosphate kinase au bout de 6j : 91,7%

La myoglobine apparaît affectée par l'état PSE ce qui se traduit par une perte de solubilité de 81,8% au bout de 6 jours. Cette observation est importante car elle permet d'expliquer la pâleur des viandes exsudatives (tableau 25).

En revanche, il n'apparaît aucune différence d'insolubilisation de la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase pour les deux types de viandes.

De même, on observe une dégradation plus importante de la phosphoglucose isomérase dans le cas des viandes exsudatives (38,5% contre 22,2%) et de la phosphoglycérate mutase (55,6% contre 25,0%).

L'insolubilisation de la triose phosphate isomérase dans les viandes exsudatives n'est pas rapportée par la littérature, mais cette enzyme n'a jamais fait l'objet d'études spécifiques. Par contre, les comportements de la créatine phosphate kinase et de la phosphorylase b ont été beaucoup étudiés. SCOPES (1963 et 1964) a montré que la créatine phosphate kinase est totalement précipitée dans les viandes PSE extrêmes alors que PFEIFFER et al. (1979) n'observent aucune différence de concentration en CPK entre ces deux types de viandes. La



phosphorylase b n'est plus extraite des viandes PSE (FISCHER et al., 1979) ainsi que des viandes incubées à 37°C quelques heures après l'abattage (SCOPES, 1963).

	Viandes normales		Viandes PSE	
	Protéines insolubilisées mg/g de muscle	Protéines insolubilisées %	Protéines insolubilisées mg/g de muscle	Protéines insolubilisées %
MK	0,6	40,0	0,2	16,7
Ald	1,6	23,9	2,8	36,4
CPK	2,7	42,2	2,2	91,7
GAPDH	1,7	29,3	2,0	31,3
MB	0,3	33,3	0,9	81,8
En	1,0	22,7	2,2	45,8
PK	0,6	33,3	0,6	27,3
TPI	0,3	25,0	totalité	100
PGAM	0,4	25,0	1,0	55,6
PHb	0,4	25,0	totalité	100
LDH-PGM	0,3	16,7	0,2	9,1
PGI	0,4	22,2	0,5	38,5

Tableau 25: Insolubilisation des protéines d'extraits de viandes normale et exsudative exprimée par la diminution de la teneur en protéines (chromatographie sur VYDAC 214TP54) entre 4h et 168h après l'abattage

### 3.3. Influence du pH et de la température sur la solubilité des protéines sarcoplasmiques

Nous avons essayé de voir dans quelle mesure les modifications de pH et de température peuvent influencer le comportement des protéines sarcoplasmiques de la viande.

#### 3.3.1. Protocole

A partir d'un échantillon de viande normale 24h p.m, 10g de viande sont hachés puis homogénéisés dans des solutions aqueuses de HCl ou NaOH. Les pH sont alors ajustés à 5,3; 5,7 et 6,0. Pour chaque pH, deux homogénats sont préparés, l'un est incubé 2h à 4°C, l'autre 2h à 37°C.

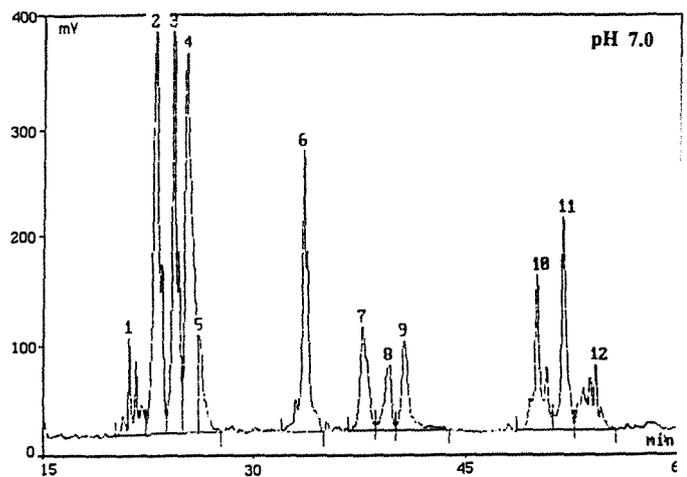
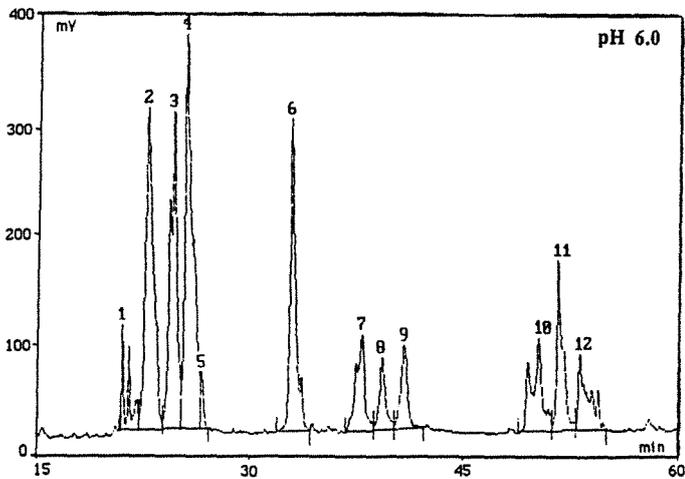
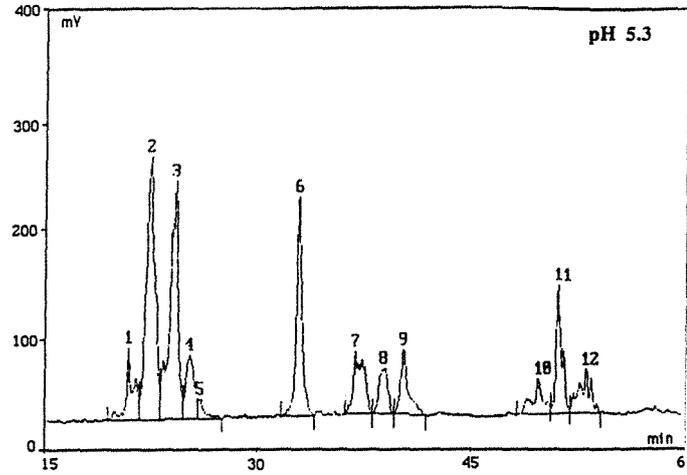
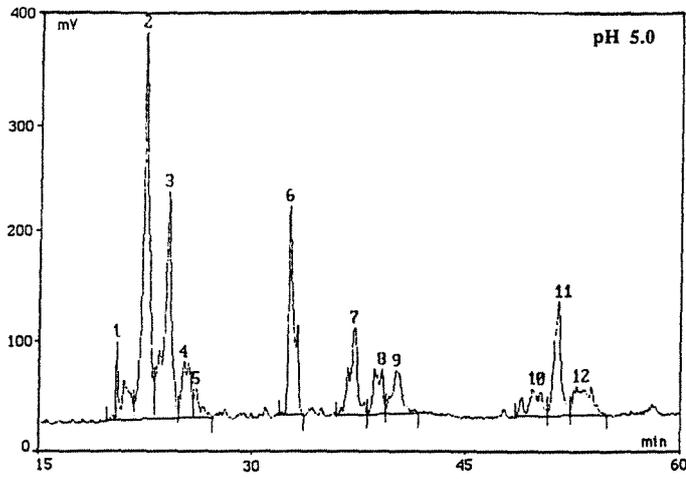


Figure 50 : Influence du pH sur la solubilité des protéines sarcoplasmiques appréciée par chromatographie à polarité de phase inversée

VYDAC 214TP54

Détection UV 215 nm

Débit 1,8 ml/min avec gradient de 50 à 75 % de solvant B sur 55 min

Solvant A : eau + 0,1% TFA

Solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA

### 3.3.2. Influence du pH

A pH 7,0, on observe une augmentation de solubilité de 40% (figure 49) par rapport à pH 5,0.

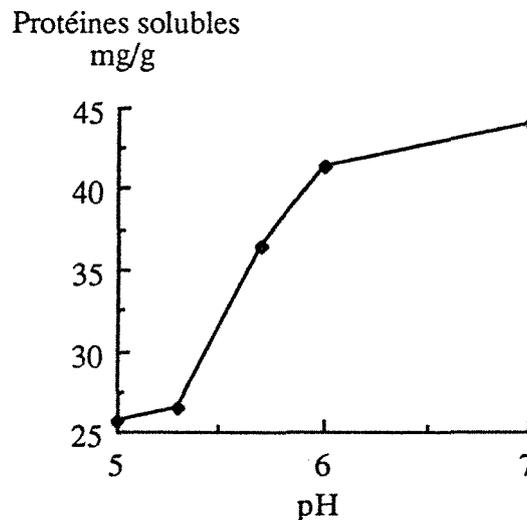


Figure 49 : Influence du pH sur la teneur en protéines d'un extrait aqueux de viande normale

Les filtrats recueillis sont analysés par chromatographie à polarité de phase inversée. Le tableau 26 résume l'évolution de chaque pic en fonction du pH.

Le point isoélectrique des protéines sarcoplasmiques est de l'ordre de 4/4,5, ce qui explique qu'à des pH se rapprochant de cette valeur, la solubilité soit plus faible qu'à des pH plus élevés.

Globalement, les concentrations de chaque protéine sont multipliées par un facteur 1,2-1,9 entre pH 5,0 et pH 7,0 (figure 50). Trois exceptions sont toutefois à noter :

- la teneur en glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase est multipliée par 6,4
- la teneur en phosphorylase b est multipliée par 3,3
- la teneur en myoglobine est multipliée par 2,8

Il n'existe aucune différence sensible dans les concentrations en chacune des protéines entre pH 5,0 et pH 5,3.

La glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase apparait très sensible aux effets du pH, on note un accroissement important de la solubilité entre 5,3 et 5,7 qui pourrait expliquer la faible concentration en GAPDH observée pour les viandes acides (cf. partie 2) par rapport respectivement aux viandes normales et aux viandes exsudatives dont le pH ultime est plus élevé que celui des viandes acides (5,52 contre 5,43).



Protéine	pH 5,0		pH 5,3		pH 5,7		pH 6,0		pH 7,0	
	Teneur en protéines		Teneur en protéines		Teneur en protéines		Teneur en protéines		Teneur en protéines	
	mg/g muscle	%								
MK	1,2	4,9	1,4	5,3	1,6	4,5	1,3	3,1	1,7	3,7
ALD	6,2	24,5	6,1	22,7	6,8	19,3	7,1	17,4	3,8	17,3
CPK	4,4	17,5	5,4	20,0	4,0	11,4	6,1	14,9	6,1	13,5
GAPDH	1,3	5,0	1,5	5,4	6,7	19,0	8,3	20,3	8,3	18,4
MB	0,5	1,9	0,4	1,4	1,6	4,6	0,4	1,1	1,4	3,2
En	3,0	12,0	3,4	12,7	4,2	12,0	4,9	11,9	4,9	10,8
PK	1,8	7,3	1,8	6,8	1,9	5,4	2,3	5,7	2,3	5,2
TPI	1,2	4,7	1,1	4,0	1,1	3,0	1,3	3,1	1,4	3,2
PGAM	1,1	4,5	1,4	5,2	1,5	4,2	1,6	3,9	2,1	4,7
PHb	1,0	3,9	1,0	3,8	1,8	5,2	2,7	6,5	3,3	7,1
PGM-LDH	2,1	8,4	2,1	7,7	2,4	6,7	2,8	6,9	3,4	7,3
PGI	1,4	5,4	1,3	5,0	1,7	4,7	2,1	5,1	2,3	5,1
Teneur tot.	25,2		26,9		35,3		40,8		45,0	

Tableau 26 : Influence du pH sur la composition protéique de l'extrait appréciée par chromatographie sur VYDAC 214TP54

La phosphorylase présente une augmentation progressive de la solubilité avec une augmentation plus marquée entre 5,3 et 5,7 (le pic 9 correspond à une concentration en protéines de 1,0 mg/g à pH 5,3 et à 1,8 mg/g à pH 5,7).

Les autres protéines qui apparaissent dénaturées dans le cas des viandes PSE, ne semblent pas perturbées par les modifications de pH :

- la teneur en triose phosphate isomérase ne varie pas suivant le pH
- pas de différence notable pour la créatine phosphate kinase qui présente une solubilité moindre à pH 5,0-5,7 et plus importante à pH 6,0-7,0.

L'augmentation globale de solubilité entre pH 6,0 et 7,0 (10,3%) est moindre qu'entre pH 5,0 et 5,7 (40%). Entre pH 6,0 et pH 7,0, la teneur en certaines protéines n'est pas modifiée, c'est le cas de l'aldolase, de la créatine phosphate kinase, de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, de l'énolase, de la pyruvate kinase, de la triose phosphate isomérase et de la phosphoglucose isomérase cependant que les concentrations en myokinase, phosphoglycérate mutase, phosphorylase b et lactate déshydrogénase-phosphoglucomutase sont accrues de 20 à 30%. Encore une fois, la myoglobine présente un comportement particulier puisqu'on note une solubilisation moindre à pH 6,0 et une solubilisation un peu plus grande à pH 5,7 et 7,0.

Protéine	pH 5,0		pH 5,0 2h-37°C°		pH 5,7		pH 5,7 2h-37°C		pH 7,0		pH 7,0 2h-37°C	
	Teneur en protéines		Teneur en protéines		Teneur en protéines		Teneur en protéines		Teneur en protéines		Teneur en protéines	
	mg/g muscle	%										
MK	1,3	4,9	0,7	3,6	1,5	4,5	1,1	3,7	1,6	3,7	1,5	3,7
ALD	6,4	24,5	5,7	30,3	6,6	19,3	6,6	23,1	7,5	17,3	7,5	18,5
CPK	4,6	17,5	2,2	11,6	3,9	11,4	1,3	4,4	5,9	13,6	5,6	13,7
GAPDH	1,3	5,0	0,2	1,0	6,5	19,0	4,4	15,4	8,0	18,5	6,4	15,7
MB	0,5	1,9	0,3	1,8	1,6	4,6	1,7	5,8	1,4	3,2	1,3	3,2
En	3,2	12,0	2,7	14,2	4,1	42,1	3,7	13,0	4,6	10,6	4,5	11,1
PK	1,9	7,3	1,9	10,0	1,8	5,4	2,0	7,1	2,2	5,2	2,2	5,4
TPI	1,2	4,7	0,5	2,5	1,0	3,0	1,3	4,5	1,4	3,2	1,3	3,2
PGAM	1,2	4,5	1,2	6,2	1,4	4,2	1,7	5,9	2,0	4,7	2,2	5,5
PHb	1,0	3,9	0,4	1,9	1,8	5,2	1,2	3,9	3,1	7,2	2,8	6,8
PGM-LDH	2,2	8,4	2,0	10,5	2,3	6,7	2,3	8,1	3,3	7,6	3,2	7,8
PGI	1,4	5,4	1,2	6,4	1,6	4,7	1,5	5,1	2,2	5,2	2,1	5,3
Teneur tot.	26,2		19,0		34,1		28,8		43,2		40,6	

Tableau 27 : Influence du couple pH/température sur la composition en protéines sarcoplasmiques de l'extrait musculaire de longissimus de porc appréciée par chromatographie sur VYDAC 214TP54

Aux pH rencontrés dans une viande maturée (5,3-5,7), la composition relative en chacune des protéines est cohérente avec nos résultats précédents. La glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase présente une sensibilité marquée en fonction du pH dans la gamme considérée: une concentration de 1,5 mg/g à pH 5,3 contre 6,7 à pH 5,7. Une faible concentration en GAPDH semble caractéristique des viandes à caractère acide prononcé.

### 3.3.3. Action conjointe du pH et de la température

Nous avons essayé d'étudier l'influence du maintien d'une température élevée, 37°C pendant 2 heures, sur différents extraits d'une même viande normale à trois pH différents: 5,0; 5,7 et 7,0.

Les résultats sont présentés dans le tableau 27 et illustrés par la figure 51.

Le maintien pendant 2h à 37°C provoque l'insolubilisation de :

- 27,5% des protéines à pH 5,0
- 15,5% des protéines à pH 5,7
- 6% des protéines à pH 7,0.

Nos résultats sont cohérents avec ceux de PENNY (1967) qui observe 8 à 20% de protéines sarcoplasmiques dénaturées après 4h à 37°C.

A pH 5,0, les protéines les plus touchées sont :

- la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase avec 84,6%
- la phosphorylase b avec 60%
- la triose phosphate isomérase avec 58,3%
- la créatine phosphate kinase avec 52,2%
- la myokinase avec 46,2%

de protéines insolubilisées

A pH 5,7,

- la créatine phosphate kinase avec 66,7%
- la phosphorylase avec 33,3%
- la GAPDH avec 32,3%
- la myokinase avec 26,7%

de protéines insolubilisées

A pH 7,0,

- la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase avec 20%
- la phosphorylase b avec 9,7%
- la triose phosphate isomérase avec 7,1%
- la créatine phosphate kinase avec 5,1%

de protéines insolubilisées

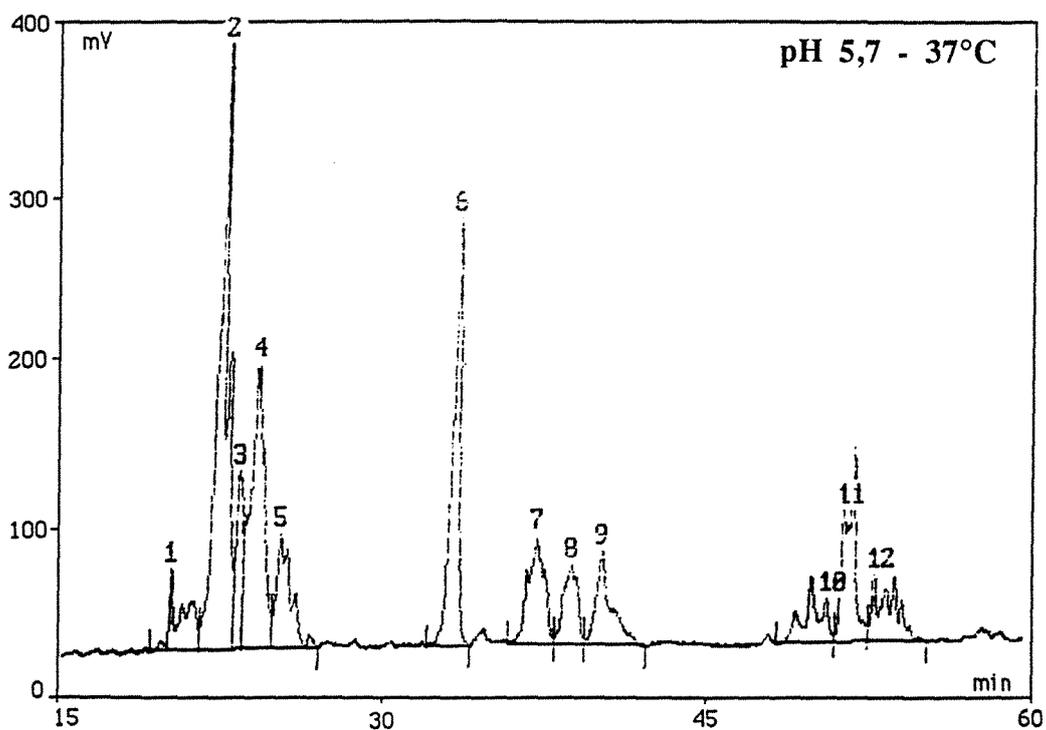
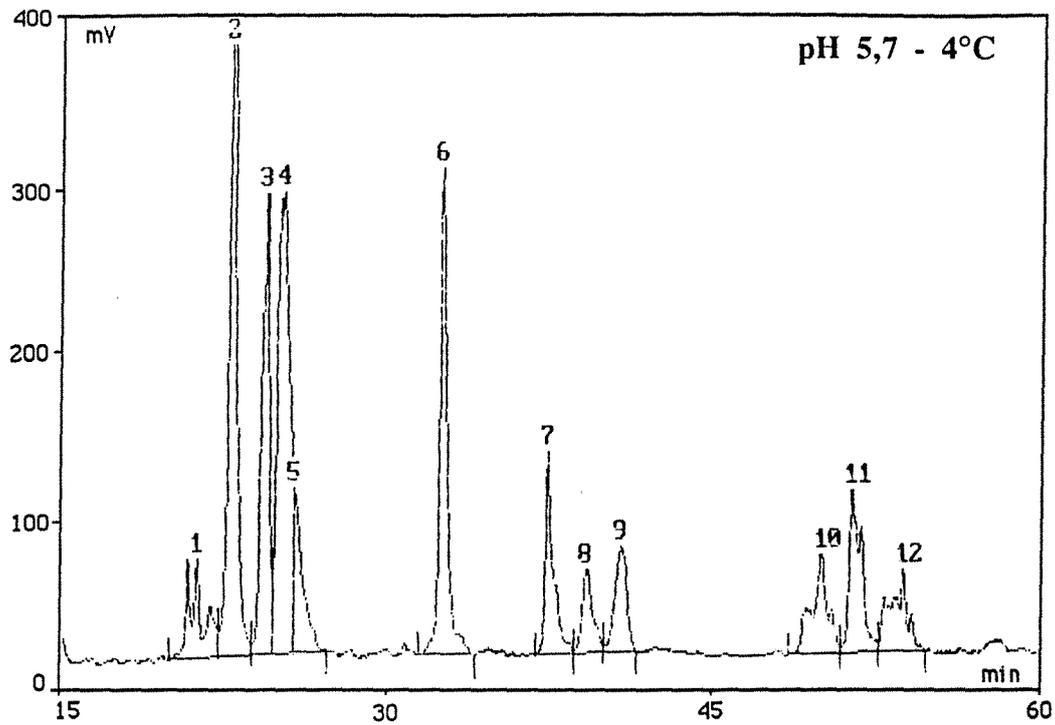


Figure 51 : Incidence de l'interaction pH/température sur les protéines sarcoplasmiques appréciée par chromatographie à polarité de phase inversée

VYDAC 214TP54

Détection UV 215 nm

Débit 1,8 ml/min avec gradient de 50 à 75 % de solvant B sur 55 min

Solvant A : eau + 0,1% TFA

Solvant B : acétonitrile/eau 70/30 + 0,1% TFA

La composition protéique d'un extrait musculaire est sérieusement modifiée par une incubation de 2h à 37°C.

Les modifications les plus importantes sont observées à pH 5,0; la GAPDH représente 5% des protéines de l'extrait et seulement 1% après traitement durant 2h à 37°C.

La créatine phosphate kinase, la triose phosphate isomérase et la phosphorylase b représentent respectivement 17,5; 4,7 et 3,9 % des protéines sarcoplasmiques totales avant traitement et 11,6; 2,5 et 1,9 après 2h à 37°C.

On observe également une sensibilité exacerbée de la myokinase qui est insolubilisée au seuil de 46,2% après incubation à pH 5,0 durant 2h à 37°C.

A pH 5,7, à l'exception de la TPI, on note l'insolubilisation des mêmes protéines qu'à pH 5,0 à des degrés moindres à l'exception de la CPK dont la teneur passe de 3,9 à 1,3 mg/g, soit en teneur relative de 11,4 à 4,4%.

A pH 7,0, on observe 6% de protéines précipitées avec une insolubilisation encore importante pour la GAPDH (20%) et relativement modérée pour les autres (CPK, PHb, TPI).

Certaines protéines apparaissent particulièrement résistantes à un traitement à 37°C quel que soit le pH : aldolase, myoglobine, pyruvate kinase, phosphoglycérate mutase et phosphoglucose isomérase.

Pour chaque pH considéré, il est possible de classer les protéines selon leur thermosensibilité à 37°C.

De la plus sensible vers la moins sensible à pH 5,0, nous avons:

**GAPDH<PHb<TPI<CPK<MK<MB<PGI<En<Ald<PGM-LDH<PK-PGAM**

Cette hiérarchie devient **GAPDH<PHb<TPI<CPK<MB<MK<PGI<PGM-LDH<PK<En<PGAM-Ald** à pH 7,0.

A tous les pH, GAPDH, PHb, TPI, CPK, MK et MB sont les protéines les plus sensibles à la chaleur.

L'incubation d'un échantillon de viande à 37°C durant 2h ne reflète en aucun cas les conditions rencontrées en circuit classique de refroidissement des carcasses. En effet, même dans le cas des viandes exsudatives, la température de 37°C n'est pas maintenue dans la longe pendant une durée aussi longue. Cependant, les conditions expérimentales nous ont permis de confirmer l'incidence du maintien d'une température relativement élevée sur certaines protéines sarcoplasmiques, telles que la créatine phosphate kinase, la phosphorylase b, la triose phosphate isomérase, la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et la myokinase.



Il apparait que les conditions de pH et de température après l'abattage conditionnent l'évolution des protéines sarcoplasmiques. En effet, in vivo, les différences de concentration et de composition en protéines sarcoplasmiques entre les viandes normales et les viandes exsudatives apparaissent faibles (estimation à 0h p.m d'une teneur en protéines sarcoplasmiques de 35,4 mg/g pour les viandes normales et de 33,1 mg/g pour les viandes exsudatives). Ces différences, qui relèvent d'un défaut métabolique de la cellule musculaire, ne s'expriment qu'après la mort de l'animal.

Aussi, l'application d'un test, pratiqué à partir d'une biopsie et permettant la discrimination des viandes suivant leur qualité, nécessiterait la mise en place d'une phase de maturation qui permette le développement des différences. Cette phase pourrait consister en une étape de chauffage modéré de la viande prélevée par biopsie: incubation 2h à 40°C ou à une température plus élevée pendant une durée plus courte. La concentration en protéines sarcoplasmiques ensuite déterminée serait comparée à une échelle de référence permettant le classement des viandes par type de qualité.

Dans cette optique, nous avons précisé l'incidence d'un chauffage de 30 à 80°C sur les protéines sarcoplasmiques.



#### 4. COMPORTEMENT DES PROTÉINES SARCOPLASMIQUES AU COURS DU CHAUFFAGE

Compte tenu des différences mises en évidence quant à l'évolution des protéines sarcoplasmiques de viandes de qualité normale et de viandes exsudatives au cours de la conservation à 4°C, il nous a paru intéressant de compléter ce travail par l'étude du comportement des protéines sarcoplasmiques soumises à un chauffage de 30° à 80°C. Le chauffage de la viande pourrait, en effet, exacerber les transformations des protéines et permettre une discrimination plus simple et plus rapide des viandes de qualités différentes.

La diversité des modes opératoires mis en oeuvre lors des études sur l'évolution des protéines musculaires soumis à des traitements thermiques (nature de l'échantillon, état de maturation, technique et durée du traitement) rend délicate toute comparaison entre les différents résultats reportés dans la littérature.

Dans ces conditions, il apparait donc nécessaire de rationaliser et d'optimiser les conditions expérimentales.

La méthode de chauffage adoptée est présentée figure 29. L'échantillon, placé dans un bain-marie à température constante (Tf), en est retiré lorsqu'il a atteint l'équilibre thermique; il est alors refroidi sous eau courante. Nous avons délibérément rejeté la méthode consistant à placer les échantillons dans un bain-marie à l'ébullition et à les en retirer dès qu'ils ont atteint la température voulue; cette méthode génère, en effet, des gradients de température importants au sein de l'échantillon rendant la maîtrise de la température imprécise (PARSONS et PATTERSON, 1986).

C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'influence du chauffage directement à partir des homogénats musculaires, et non à partir d'échantillons de muscle homogénisés dans l'eau, de façon à nous affranchir des variations induites par l'hétérogénéité du tissu musculaire ainsi que de l'étape d'homogénéisation et d'extraction des protéines. Cette démarche a été adoptée pour des raisons identiques par de nombreux auteurs (DAVIS et ANDERSON, 1984; SPANIER et al., 1990; STALDER et al., 1991).



## 4.1. Viandes de qualité normale

### 4.1.1. Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques d'un extrait musculaire au cours du chauffage

#### 4.1.1.1. Protocole

Le chauffage a été pratiqué au bain-marie sur 10 extraits obtenus à partir d'échantillons de longe congelée ( $t = 48\text{h p.m}$ ) sélectionnés pour leur "qualité normale", c'est-à-dire  $\text{pH}_1 > 6,0$  et  $5,5 < \text{pH}_0 < 6,2$

Les tubes contenant les homogénats sont plongés dans un bain-marie à la température  $T_f$ . L'homogénat atteint la température  $T_f$  au temps  $t_0$  ( $t_0$  temps d'équilibre de l'échantillon à la température  $T_f$  du bain-marie), les tubes sont alors retirés du bain-marie puis placés immédiatement en refroidissement à  $4^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.1.2. Résultats

La concentration en protéines solubles de l'extrait diminue lorsque la température augmente (tableau 29). L'équilibre thermique de l'échantillon à  $30^\circ\text{C}$  ou à  $40^\circ\text{C}$  améliore faiblement la solubilisation des protéines sarcoplasmiques. A  $45^\circ\text{C}$ , on note une insolubilisation de 9,8% des protéines. A  $50^\circ\text{C}$ , 21,4% des protéines sont précipitées. A partir de  $50^\circ\text{C}$ , on observe la formation d'un précipité blanchâtre au fond du tube.

Température ( $^\circ\text{C}$ )	% protéines solubles	
	Moyenne	Ec.Type
cru	100,0	
30,0	100,2	6,5
40,0	100,6	6,8
45,0	90,2	6,1
50,0	78,6	5,9
55,0	66,8	5,4
60,0	48,2	3,4
62,5	32,0	2,4
65,0	20,2	1,8
67,5	11,9	1,0
70,0	3,1	0,2
75,0	0,0	

( $n = 10$ )

Tableau 29 : Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques d'extraits musculaire soumis à différents équilibres thermiques

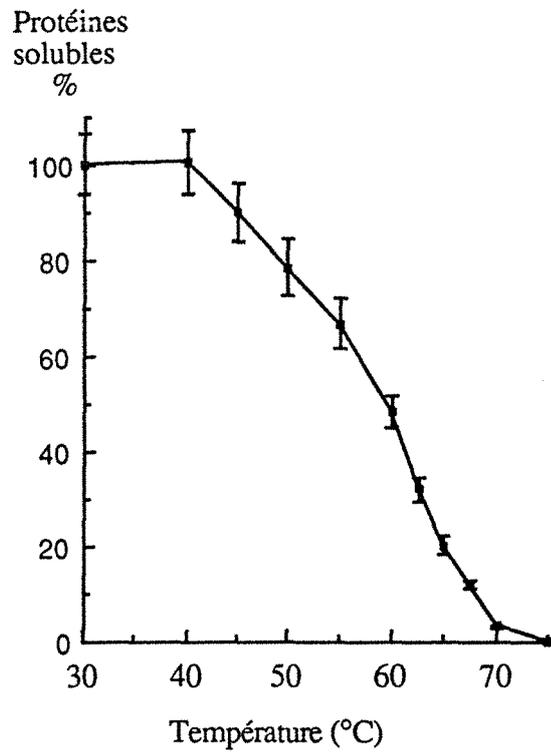


Figure 52 : Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques d'extraits musculaires soumis à équilibres thermiques successifs - cas des viandes normales -

On note une importante diminution de solubilité entre 55 et 65°C (perte de 46,6% de protéines solubles). A 70°C, 96,9% des protéines ne sont plus extractibles.

Des essais de modélisation seront présentés en partie 4.3.

Le coefficient de variation moyen de la teneur en protéines résiduelles pour une série de 10 homogénats est de 9%, valeur assez faible par rapport aux données de la littérature. Deux raisons principales peuvent être avancées:

- le chauffage direct de l'homogénat limite la variabilité induite par l'extraction
- la sélection des échantillons traités, basée sur les pH<sub>1</sub> et pH<sub>u</sub>, permet de s'assurer une homogénéité suffisante des échantillons pour garantir le déroulement de la glycolyse, lequel influence le comportement des protéines sarcoplasmiques (SCOPES, 1963 et 1964; OFFER et KNIGHT, 1988).

Le comportement des protéines sarcoplasmiques de la viande au cours du chauffage a été peu étudié du fait de leur contribution limitée à la texture de la viande cuite (JALANG'O et al., 1987). La littérature porte principalement sur leur rôle de référence dans le contrôle des températures appliquées aux produits carnés, en relation avec leurs profils d'insolubilisation et/ou d'inactivation. Quelques auteurs se sont également intéressés au rôle des protéines sarcoplasmiques dans les propriétés émulsifiantes et liantes de la viande. De plus, la myoglobine a fait l'objet d'études spécifiques sur le déterminisme de la couleur des produits transformés.

Les variations de méthodologie suivant les études sont nombreuses et limitent les comparaisons entre les différents résultats. Les techniques d'étude du comportement des protéines sarcoplasmiques de la viande au cours du chauffage présentent, en effet, des variations de plusieurs types :

- nature de l'échantillon sur lequel est pratiqué le chauffage (espèce animale, muscle, taille de l'échantillon, état du muscle - entier ou broyé -, homogénat - eau ou solutions salines)
- technique de chauffage employée (bain-marie à ébullition, bain-marie thermostaté à la température étudiée)
- durée du chauffage
- méthode d'extraction des protéines sarcoplasmiques (eau, solutions salines).

D'une façon globale, les courbes d'insolubilisation des protéines au cours du chauffage présentent des profils similaires suivant les auteurs; leurs caractéristiques varient avec les conditions de l'étude.



DAVIS et ANDERSON (1983) chauffent directement la viande de porc avant de pratiquer l'extraction aqueuse des protéines. Après équilibre thermique à 45°C, ces derniers observent 94,4% de protéines en solution contre 90,2% d'après nos résultats. Cette différence s'amplifie avec l'augmentation de la température : à 70°C, 22,6% de protéines sont encore en solution d'après DAVIS et ANDERSON (1983) contre 3,1% selon nos résultats expérimentaux. La masse musculaire paraît exercer une "protection thermique" sur les protéines sarcoplasmiques. Ce rôle de protection ne semble pas se retrouver chez McCORMICK et al. (1987) qui pratiquent également le chauffage sur un échantillon de muscle entier (carotte de 20\*25 mm plongée dans un bain-marie à ébullition) et obtiennent une insolubilisation de 26,3% à 50°C et de 52,6% à 60°C, contre respectivement 21,4 et 51,8% pour nos résultats. Il faut noter que la technique de chauffage de McCORMICK est sensiblement différente puisqu'elle consiste à plonger l'échantillon dans un bain-marie à ébullition. Malgré un refroidissement immédiat après que la température à coeur ait atteint la température souhaitée, il est possible que la température continue d'augmenter sensiblement au sein de la masse musculaire et que la température réelle atteinte par l'échantillon soit majorée par rapport à la température théorique étudiée (PARSONS et PATTERSON, 1986).

OKAYAMA et al. (1991) qui ont étudié le chauffage de la viande en solution saline (modèle saucisse) observent une dénaturation maximale entre 50 et 60°C de 36%, à rapporter à 31% obtenu dans nos conditions expérimentales. Cependant, à 70°C, OKAYAMA et al. (1991) observent encore 14,6% de protéines en solution, soit presque cinq fois plus que nos propres résultats. La solubilisation des protéines dans une solution saline conduit à une meilleure solvataion des protéines justifiant une dénaturation moindre pour des températures de chauffage élevées.

#### 4.1.1.3. Hypothèses sur les causes de l'insolubilisation

Nous avons essayé de trouver une approche explicative des mécanismes de dénaturation qui conduisent à la diminution de solubilité des protéines sarcoplasmiques au cours du chauffage.

Une protéine est maintenue dans sa conformation native sous l'influence de diverses interactions moléculaires dont l'équilibre est complexe : interactions hydrophobes, ioniques, hydrogène ou de Van der Waals.

Quand ces interactions ne prévalent plus sur l'augmentation d'entropie générée par le chauffage, il y a déplissement de la protéine qui devient alors dénaturée (KLIBANOV et AHERN, 1987).

Cette dénaturation se traduit dans nos conditions expérimentales par une diminution de solubilité des protéines.



Les énergies libres de dénaturation des protéines globulaires de taille moyenne sont faibles, de l'ordre de 5 à 20kcal/mol de protéine pour une gamme de température de 10 à 50°C (PRIVALOV, 1979; PACE, 1975). Comparées aux énergies des liaisons intramoléculaires (liaison H : 2 à 10 - interaction hydrophobe : 3 à 5 - interaction ionique : 5 à 7- interaction de Van der Waals : 1 à 2, exprimées en kcal/mol d'après LORIENT (1984)), il apparaît que la rupture de quelques liaisons hydrophobes, par exemple, suffit à provoquer la dénaturation de ces protéines. A titre indicatif, l'énergie de dénaturation de la myoglobine à pH 9,0 et à 25°C est de 13,6 kcal/mol (TANFORD, 1970).

L'action de SDS à 10% sur le coagulat obtenu après chauffage à 75°C entraîne la dissolution complète du précipité; aussi, pouvons-nous affirmer que la chauffage des protéines sarcoplasmiques en solution aqueuse ne provoque pas de modifications de nature covalente: absence de formation de pont dissulfure.

Le déplissement de la chaîne protéique conduit à une nouvelle réorganisation moléculaire faisant appel aux différents types d'interactions déjà cités. Les protéines peuvent alors faire l'objet de diverses réactions:

- agrégation
- protéolyse
- réaction de Maillard
- interactions protéine-protéine et protéine-lipide

Il ne nous est pas possible de donner un poids à ces différentes réactions; elles concourent toutes, à des degrés divers, à expliquer la diminution de solubilité des protéines sarcoplasmiques.

#### **- l'agrégation**

Au cours du déplissement, les régions hydrophobes des protéines, qui étaient dans leur conformation native orientées vers l'intérieur, deviennent exposées au solvant. Une telle disposition est thermodynamiquement défavorable. Les protéines déplissées peuvent alors soit adopter de nouvelles conformations (formation de structures incorrectes : KLIBANOV et AHERN, 1987) soit interagir les unes aux autres de façon à masquer les groupements hydrophobes et provoquer leur agrégation.

Si les traitements thermiques exercés étaient plus sévères, des modifications de nature covalente pourraient également être envisagées.

#### **- la protéolyse**

L'existence de réactions protéolytiques au sein de l'extrait chauffé sera discutée au paragraphe 4.1.2.



#### **- les réactions de Maillard**

Ces réactions se produisent entre acides aminés et sucres réducteurs ou autres composés carbonylés. L'extrait musculaire contient notamment du glucose, produit du catabolisme du glycogène, susceptible de servir de substrat aux réactions de Maillard au cours du chauffage. Ces réactions commencent par la condensation entre un groupe aminé non ionisé ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine) d'un acide aminé et le groupement carbonylé du glucose formant un produit d'addition (N-glycoside) qui après déshydratation donne une base de Schiff. La base de Schiff est une molécule instable qui par une série de réactions, appelées réarrangement d'Amadori, va conduire à un isomère stable, le 1-amino 2-deoxy céto-glucose. La formation de ce céto-glucose est chimiquement irréversible. La réaction de Maillard se poursuit ensuite par divers mécanismes complexes aboutissant à la formation de mélanoidines. Dans nos conditions opératoires (traitement thermique maximum : 75°C - 0 min), la réaction de Maillard s'arrêterait au réarrangement d'Amadori.

#### **- les réactions protéine-protéine et protéine-lipide**

La formation de ponts covalents entre protéines n'est observée que pour des traitements thermiques sévères (supérieurs à 100°C) (FRIEDMAN, 1977; CHEFTEL et al., 1985).

Des liaisons covalentes protéine-lipide peuvent cependant se produire entre des protéines et des produits d'oxydation des lipides tels que les aldéhydes ou les cétones (réactions de type Maillard).

Les techniques à notre disposition nous ont permis de présumer de l'existence d'une protéolyse au sein de l'extrait chauffé :

- quantification des acides aminés par dosage de l'azote  $\alpha$  - aminé
- chromatographie en perméation gel.

#### 4.1.2. Quantification de la protéolyse

La chaleur activant les enzymes protéolytiques, il est possible alors que le Calcium Activated Factor, présent dans l'homogénat musculaire (GOLL et al., 1983), soit stimulé au cours du chauffage et puisse développer une activité protéolytique à l'égard des protéines sarcoplasmiques bien que cette action n'ait jamais été prouvée.

##### 4.1.2.1. Protéolyse des protéines sarcoplasmiques appréciée par chromatographie d'exclusion

Au cours d'un traitement thermique d'une viande normale dans les conditions déjà définies, la surface de la première série de pics (pics I) diminue -ce qui est en conformité avec

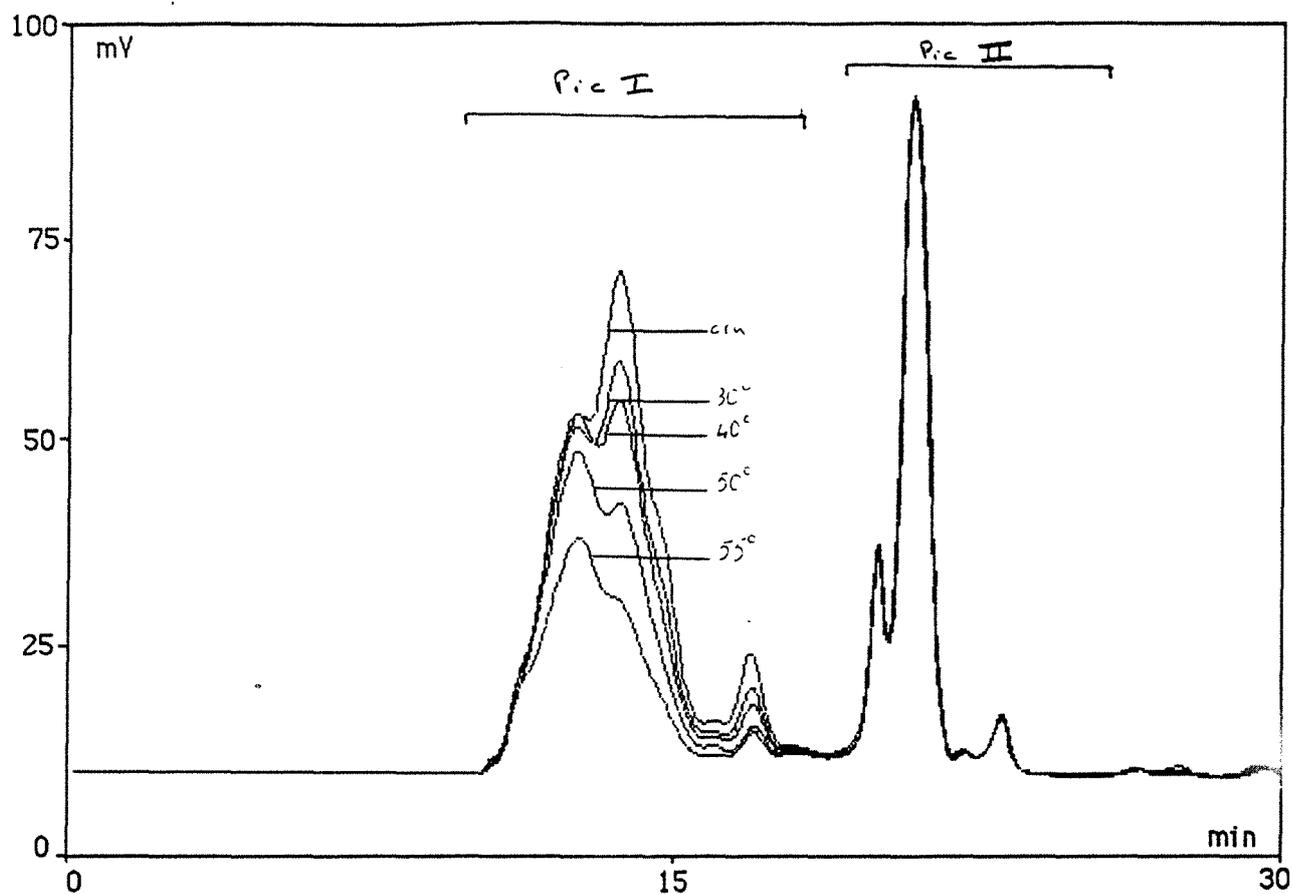


Figure 53 : Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques au cours d'équilibres thermiques successifs appréciée par perméation gel - cas des viandes normales -

TSK G2000SW  
 Tampon phosphate M/15 pH 6,8 + NaCl 0,1M + 0,03% NaN<sub>3</sub>  
 Débit 0,5 ml/min. Détection UV 280 nm

une diminution de solubilité des protéines- tandis que la surface de la deuxième série de pics (pics II) reste inchangée (figure 53).

Température °C	Pics I mV.min	Pics II mV.min	Surf. Totale mV.min
cru	195,1	107,5	294,6
30°	182,1	107,1	289,2
40°	167,8	107,1	274,9
50°	133,6	107,3	240,9
55°	92,0	107,3	199,3

Tableau 30 : Evolution de la surface des pics chromatographiques (TSK G2000SW) d'un extrait de protéines solubles soumis à équilibres thermiques successifs

La surface des pics II reste constante durant toute la durée du chauffage (tableau 30). Il apparait donc que les protéines sarcoplasmiques ne sont pas hydrolysées au cours du chauffage.

#### 4.1.2.2. Dosage des acides aminés libérés

L'absence de protéolyse est confirmée par le dosage des acides aminés libres présents dans l'ultrafiltrat des extraits musculaires -seuil de coupure 10 000D.

Les filtrats obtenus à partir des homogénats chauffés subissent une ultrafiltration. Sur l'ultrafiltrat contenant les composés musculaires solubles de poids moléculaires inférieurs à 10 000D, on dose les acides aminés libres d'après la méthode de HABEEB (1966).

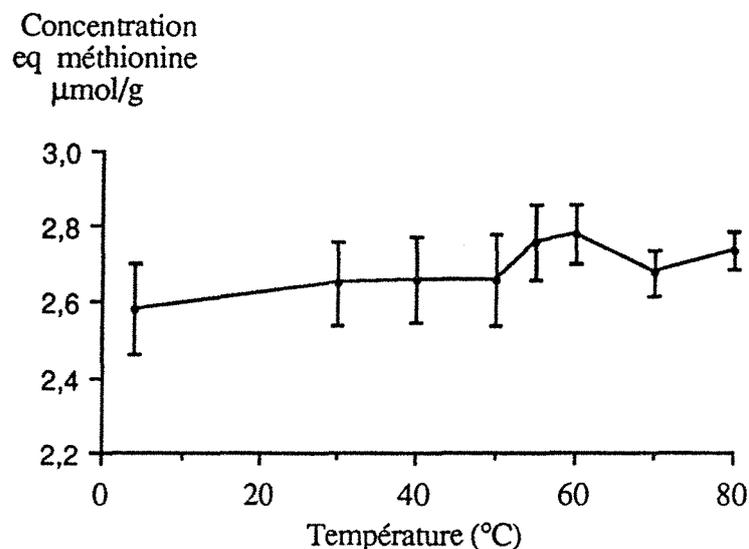


Figure 54 : Evolution de la teneur en acides aminés d'extraits musculaires au cours d'équilibres thermiques successifs

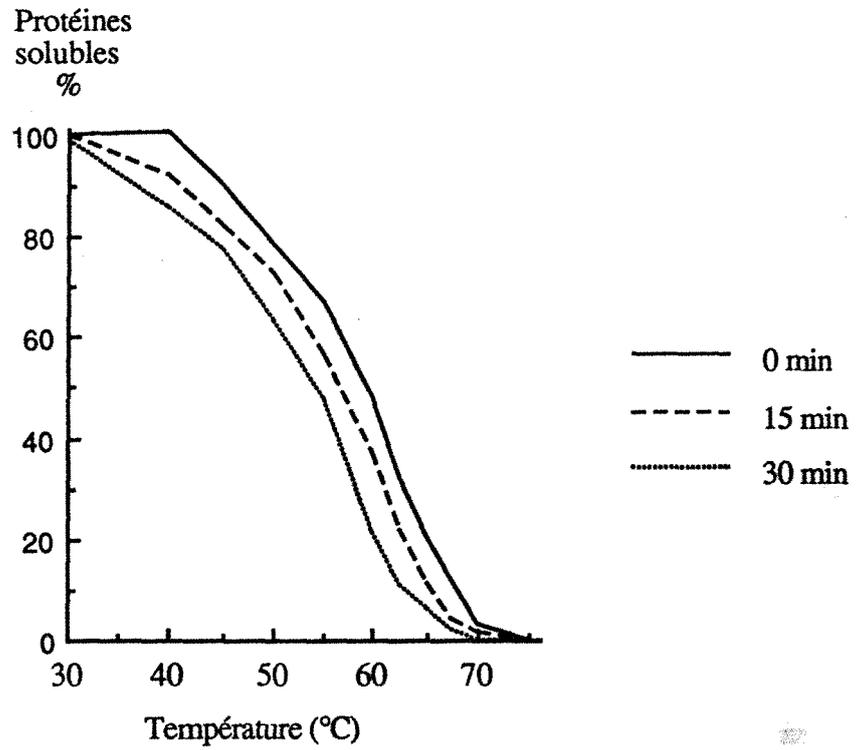


Figure 55 : Influence de la durée d'un traitement thermique 0 min sur la solubilité des protéines sarcoplasmiques

La teneur en acides aminés libres exprimée en  $\mu$ moles de méthionine / g de muscle dans l'extrait contenant les protéines solubles n'évolue que très faiblement au cours du chauffage (figure 54).

La diminution de solubilité des protéines sarcoplasmiques, au cours du chauffage, liée à leur dénaturation constitue une étape clé de la transformation des protéines sarcoplasmiques au cours des traitements thermiques.

#### 4.1.3. Influence de la durée du chauffage sur la solubilité des protéines sarcoplasmiques

Nous avons soumis un même homogénat à plusieurs traitements thermiques avec des durées de chauffage croissantes: 0 min, 15 min et 30 min.

Le maintien de la température pendant 30 min entraîne une diminution plus importante de solubilité des protéines sarcoplasmiques (tableau 31). Un traitement de 30 min à 40°C entraîne une insolubilisation de 11,5% des protéines contre 3,2% pour 0 min. Un chauffage de 30 min à 65°C provoque une insolubilisation supplémentaire de 14,1%, soit 93,9% de protéines insolubilisées.

Température °C	0 min	15 min	30 min
cru	100	100	100
30,0	100,2	100	99,0
40,0	100,6	92,2	86,0
45,0	90,2	82,0	77,4
50,0	78,6	72,7	63,4
55,0	66,8	56,4	47,6
60,0	48,2	37,1	21,7
62,5	32,0	21,8	10,9
65,0	20,2	11,6	6,1
67,5	11,9	4,2	2,0
70,0	3,1	1,6	0,0
75,0	0	0	0

Tableau 31 : Influence de la durée du chauffage sur la solubilité des protéines sarcoplasmiques (exprimée en % de protéines résiduelles) de la viande de porc

Lorsque la durée du traitement thermique est prolongée, on n'observe pas de changement de l'allure de la courbe (figure 55); en revanche, on assiste à un décalage de la courbe dans le sens d'une insolubilisation plus marquée.



Ainsi les 50% de dénaturation sont obtenus à :

- 58,9°C pour une durée de chauffage de 0 min
- 57°C pour une durée de chauffage de 15 min
- 54,5°C pour une durée de chauffage de 30 min.

Nos résultats sont en accord avec ceux de HAMM et DEATHERAGE (1960), DAVEY et GILBERT (1974), DAVIS et ANDERSON (1983), McCORMICK et al. (1987).

Le maintien de la viande à une température donnée a pour effet d'entraîner une diminution de solubilité. Cet effet apparait sensiblement dépendant de la température. En effet, l'augmentation de la durée de chauffage de 0 à 30 minutes conduit à une insolubilisation supplémentaire de l'ordre de 12-15% pour des températures de 40 et 50°C, de 20-25% à 60-65°C et beaucoup plus faible pour des températures plus élevées du fait que les protéines sont déjà presque totalement insolubilisées.

La différence de solubilité la plus marquée entre 0 et 30 min de chauffage est observée à 60°C: Cet écart est de 26,5% contre 21,4% pour OKAYAMA et al. (1991) et 26,4% pour McCORMICK et al. (1987).

A 62,5-65°C-0 min, la teneur en protéines solubles est deux fois plus élevée que dans le même échantillon maintenu pendant 30 min à ces mêmes températures.

#### 4.1.4. Insolubilisation différentielle des protéines sarcoplasmiques en fonction de la température étudiée par HPLC

L'augmentation de la température de chauffage provoque une insolubilisation progressive des protéines que nous allons analyser.

A partir de viandes de qualité standard, l'évolution des protéines peut se résumer de la façon suivante (figure 56 et tableau 32) :

- jusqu'à 50°C, on observe une diminution de surface de certains pics, notamment celui de la myokinase, de la glycéraldéhyde 3. phosphate déshydrogénase, de la myoglobine, de la phosphoglucose isomérase, et plus faiblement de la phosphoglycérate mutase et de la phosphorylase b.
- à 55°C, on relève une nette diminution de la créatine phosphate kinase, de la phosphoglucomutase et de la lactate déshydrogénase en même temps que de l'énolase, la pyruvate kinase et la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase.
- à 60°C, la GAPDH continue à s'insolubiliser et ne représente plus que 30% de la concentration initiale.
- à 65°C, l'insolubilisation de phosphorylase b est totale.



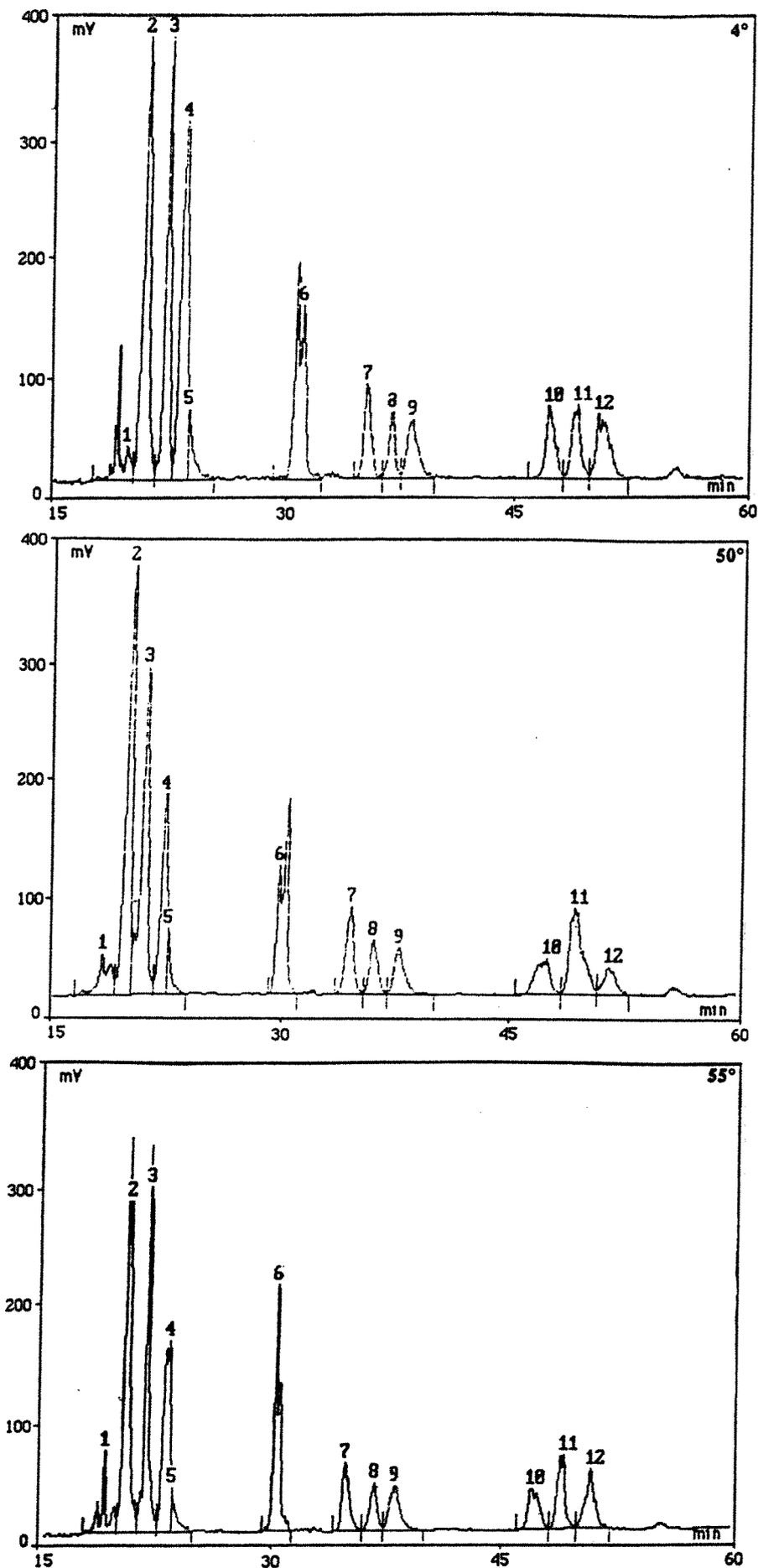


Figure 56 : Evolution des protéines sarcoplasmiques au cours du chauffage appréciée par chromatographie à polarité de phase inversée - cas des viandes normales -

VYDAC 214TP54. Débit 1,8 ml/min. Détection UV 215 nm  
 Solvant A : eau + 0,1% TFA. Solvant B : eau/acétonitrile 30/70 + 0,1% TFA  
 Gradient linéaire de 50 à 75% de solvant B sur 55 min

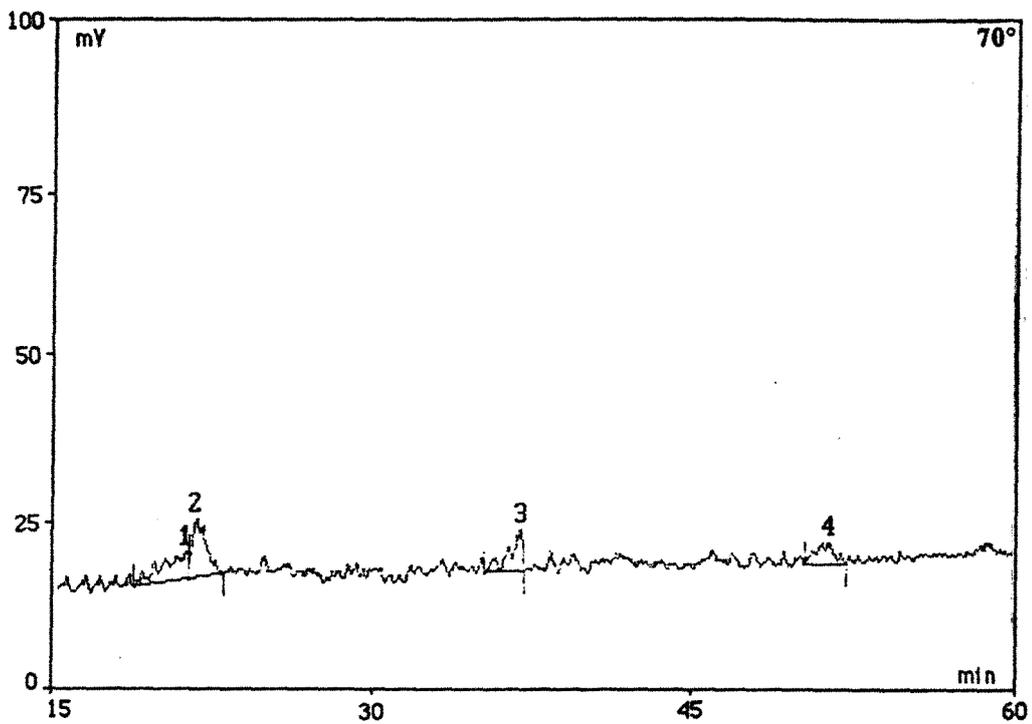
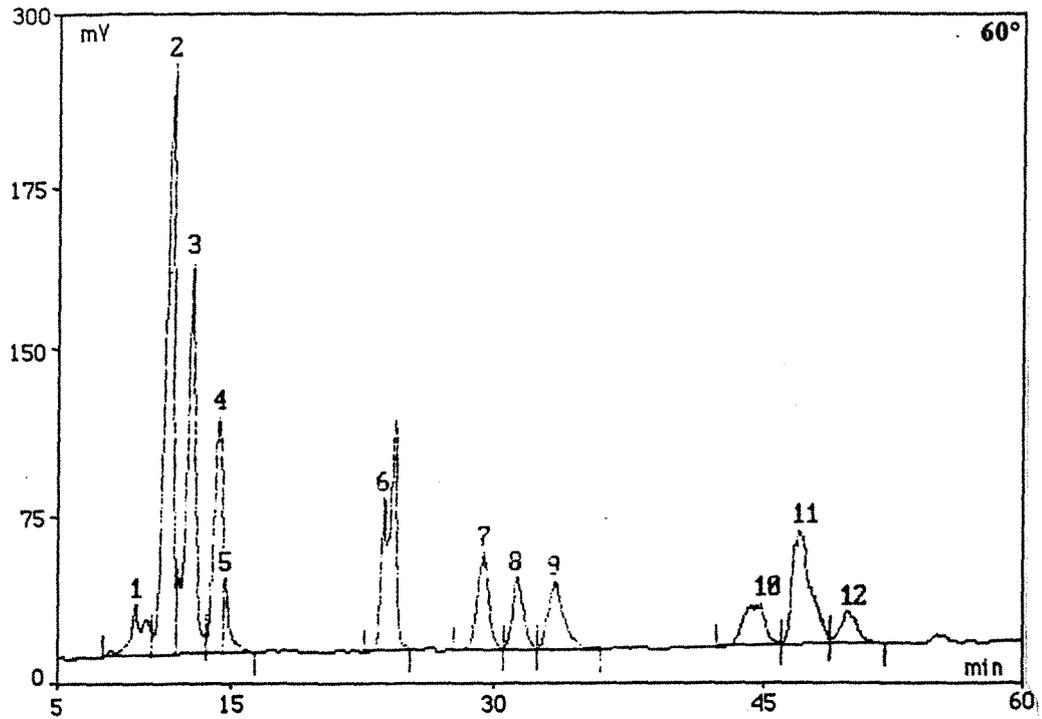


Figure 56 : Evolution des protéines sarcoplasmiques au cours du chauffage appréciée par chromatographie à polarité de phase inversée - cas des viandes normales -

VYDAC 214TP54. Débit 1,8 ml/min. Détection UV 215 nm  
 Solvant A : eau + 0,1% TFA. Solvant B : eau/acétonitrile 30/70 + 0,1% TFA  
 Gradient linéaire de 50 à 75% de solvant B sur 55 min

- à 67,5°C, la créatine phosphate kinase et la triose phosphate isomérase deviennent totalement insolubles.

- à 70°C subsistent en faibles concentrations la myokinase, l'aldolase, la pyruvate kinase et LDH-PGM, en proportion sensiblement équivalente.

Protéines	cru		50°		55°		60°		70°	
	Teneur protéines		Teneur protéines		Teneur protéines		Teneur protéines		Teneur protéines	
	mg/g	%								
MK	1,4	4,2	1,0	4,0	0,9	4,2	0,7	4,1	0,2	28,6
ALD	6,2	18,6	5,5	21,1	4,6	21,1	3,9	22,9	0,3	32,0
CPK	5,2	15,7	4,8	18,3	3,4	15,7	3,1	18,4		
GAPDH	6,0	18,2	3,2	12,3	2,8	13,1	1,7	10,2		
MB	0,8	2,4	0,5	1,8	0,5	2,1	0,4	2,1		
En	4,5	13,5	3,2	12,1	2,8	12,7	2,0	11,5		
PK	1,7	5,0	1,6	6,1	1,2	5,3	0,9	5,4	0,2	22,0
TPI	1,1	3,2	1,0	3,8	0,8	3,8	0,6	3,7		
PGAM	1,5	4,6	1,2	4,7	1,3	5,8	0,9	5,3		
PHb	1,5	4,5	1,2	4,5	1,0	4,6	0,8	4,5		
PGM-LDH	1,6	4,7	2,2	8,5	1,3	6,0	1,5	8,7	0,2	17,4
PGI	1,8	5,4	0,7	2,8	1,2	5,6	0,5	3,2		
Teneur.tot	33,3		26,2		21,7		17,0		0,9	

Tableau 32 : Evolution de la teneur en chacune des protéines d'un extrait musculaire au cours d'équilibres thermiques exprimée en surface de pics chromatographiques (VYDAC 214TP54)

Les enzymes les plus thermorésistantes sont la myokinase, la pyruvate kinase, l'aldolase et le complexe phosphoglucomutase/lactate déshydrogénase. Notons que la myokinase et la phosphoglucose isomérase sont des protéines monomériques, ce qui contribue à expliquer leur thermorésistance.

La phosphorylase b et la créatine phosphate kinase coagulent en premier. Ces enzymes sont également altérées dans les viandes PSE.

Comme nous l'avons signalé précédemment, les modes opératoires conditionnent grandement la vitesse et l'amplitude de l'insolubilisation des différentes fractions protéiques. Aussi la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature est-elle délicate.



L'insolubilisation de la phosphorylase b et la triose phosphate isomérase entre 50-55°C, de la créatine phosphate kinase et de la phosphoglucose isomérase à 60°C, est observée systématiquement par de nombreux auteurs (OKAYAMA et al., 1991; McCORMICK et al., 1987) ainsi que la persistance de la pyruvate kinase, de la lactate déshydrogénase et de la myoglobine après un chauffage à 70°C (CALDIRONI et BAZAN, 1980; McCORMICK et al., 1987; OKAYAMA et al., 1990).

L'insolubilisation de la phosphoglucomutase, de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, de l'aldolase, de la myokinase et de la phosphoglycérate mutase survient entre 60 et 70°C suivant les auteurs. Dans tous les cas, à 80°C, toutes les protéines ont coagulé.

#### 4.1.5. Evolution du pH d'un extrait musculaire au cours du chauffage

La figure 57 montre l'évolution du pH au cours du chauffage de 10 extraits aqueux de viandes dont le pHu est compris entre 5.5 et 5.8

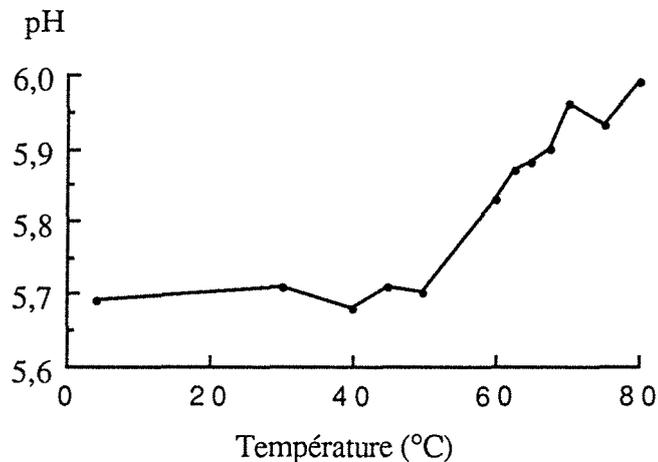


Figure 57 : Evolution du pH d'extraits musculaires de viandes normales au cours du chauffage

Le chauffage s'accompagne d'une augmentation de pH de l'extrait: élévation faible jusqu'à 50°C, importante entre 50 et 60°C (+ 0.17 unité de pH) et plus modérée de 60 à 80°C (+ 0.16 unité de pH).

Pour la gamme de pH considérée, l'élévation de pH de 0.30 unité observée entre 30 et 75°C corrobore les résultats de nombreux auteurs (HAMM et DEATHERAGE, 1960; BOUTON et al., 1971, LAROCHE, 1981). ROBERTS et LAWRIE (1974), quant à eux, notent une augmentation progressive de pH entre 45 et 80°C qui demeure faible pour un chauffage de 0 min (de 5,52 à 5,59) et qui est plus importante pour un chauffage de 10 min et 30 min (respectivement de 5,57 à 5,97 et de 5,63 à 5,95). Au delà de 80°C, on assiste à une chute caractéristique du pH.

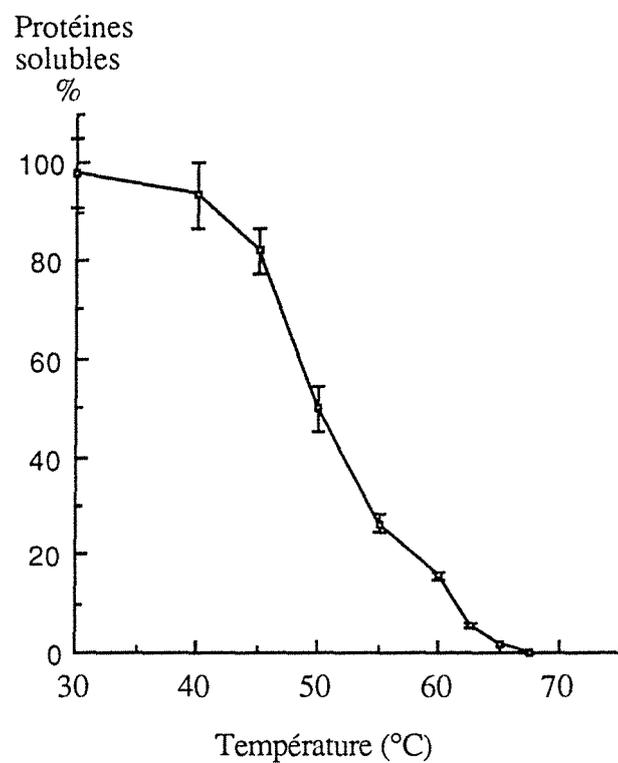


Figure 58 : Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques d'extraits musculaires au cours d'équilibres thermiques - cas des viandes exsudatives -

SHERMAN (1961) pense que l'élévation de pH observée au cours du chauffage est due à la rupture de liaisons faisant intervenir des groupements imidazoles, sulhydrides et hydroxyles. HAMM (1966) envisage également la contribution de groupements présentant des pKa anormaux à l'état cru qui retrouvent des valeurs normales du fait des changements de conformation entraînés par le chauffage.

On remarque qu'il existe de faibles variations dans l'évolution du pH au cours du chauffage de plusieurs extraits d'un même échantillon. Cette observation tend à conforter le choix de la technique de chauffage retenue.

## 4.2. Viandes exsudatives

### 4.2.1. Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques au cours du chauffage

Température °C 0 min	% protéines solubles	
	Moyenne	Ecart-Type
n	10	
cru	100	
30	98,0	7,2
40	93,5	6,9
45	82,0	4,8
50	56,0	4,6
55	26,4	2,1
60	15,6	0,8
62,5	5,5	0,4
65,0	1,8	0,1
67,5	0	

Tableau 33 : Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques d'un extrait musculaire au cours d'équilibres thermiques successifs - viandes exsudatives-

L'amélioration sensible de la solubilité à 40°C observée pour les viandes normales ne se retrouve pas pour les viandes exsudatives (tableau 33).

L'évolution de la concentration en protéines sarcoplasmique solubles (figure 58) est plus accusée que celle observée pour les viandes normales (figure 52). Ainsi, dans le cas des viandes normales, à 50°C, 21,4% de protéines sont insolubilisées tandis que pour les viandes exsudatives, les protéines insolubilisées atteignent 44%. Pour les viandes normales, 50% des



protéines sont dénaturés à 58,9°C tandis que pour les viandes exsudatives, ce résultat est atteint dès 51,4°C.

L'insolubilisation la plus accentuée entre les deux types de viande est de 40,4% pour 55°C.

Dès 67,5°C, toutes les protéines sont coagulées.

#### 4.2.2. Insolubilisation différentielle des protéines sarcoplasmiques d'un extrait musculaire au cours du chauffage étudiée par HPLC

Les protéines des viandes exsudatives sont insolubilisées à des températures de chauffage moins élevées que dans le cas des viandes normales (tableau 34 et figure 59).

Protéines	cru		50°C		55°C		60°C		65°C	
	Teneur protéines		Teneur protéines		Teneur protéines		Teneur protéines		Teneur protéines	
	mg/g	%								
MK	1,1	4,3	1,0	7,3	0,3	4,8	0,25	6,9	0,06	14,7
ALD	5,4	20,9	4,1	30,5	1,6	24,7	1,1	30,0	0,2	48,8
CPK	1,5	5,9	0,1	1,1	0,2	2,3	0,03	0,8		
GAPDH	6,3	24,1	1,9	14,0	1,0	15,7	0,1	3,1		
MB	0,4	1,6	0,2	1,6	0,2	3,4	0,1	4,0		
En	4,0	15,5	1,1	8,2	1,2	19,4	0,1	3,4		
PK	1,8	6,9	1,8	13,9	0,5	7,2	1,0	26,7	0,06	15,5
TPI	0,3	1,1								
PGAM	1,4	5,5	0,3	2,4	0,4	6,4	0,08	2,2		
PHb	0,2	0,8								
PGM-LDH	1,9	7,1	2,3	17,0	0,7	11,6	0,6	15,4	0,08	20,9
PGI	1,6	6,3	0,5	4,0	0,3	4,5	0,3	7,4		
Teneur tot	26,0		13,3		6,4		3,6		12,9	

Tableau 34 : Evolution de la teneur en chacune des protéines d'un extrait musculaire au cours d'équilibres thermiques exprimée en surface de pics chromatographiques (VYDAC 214TP54)



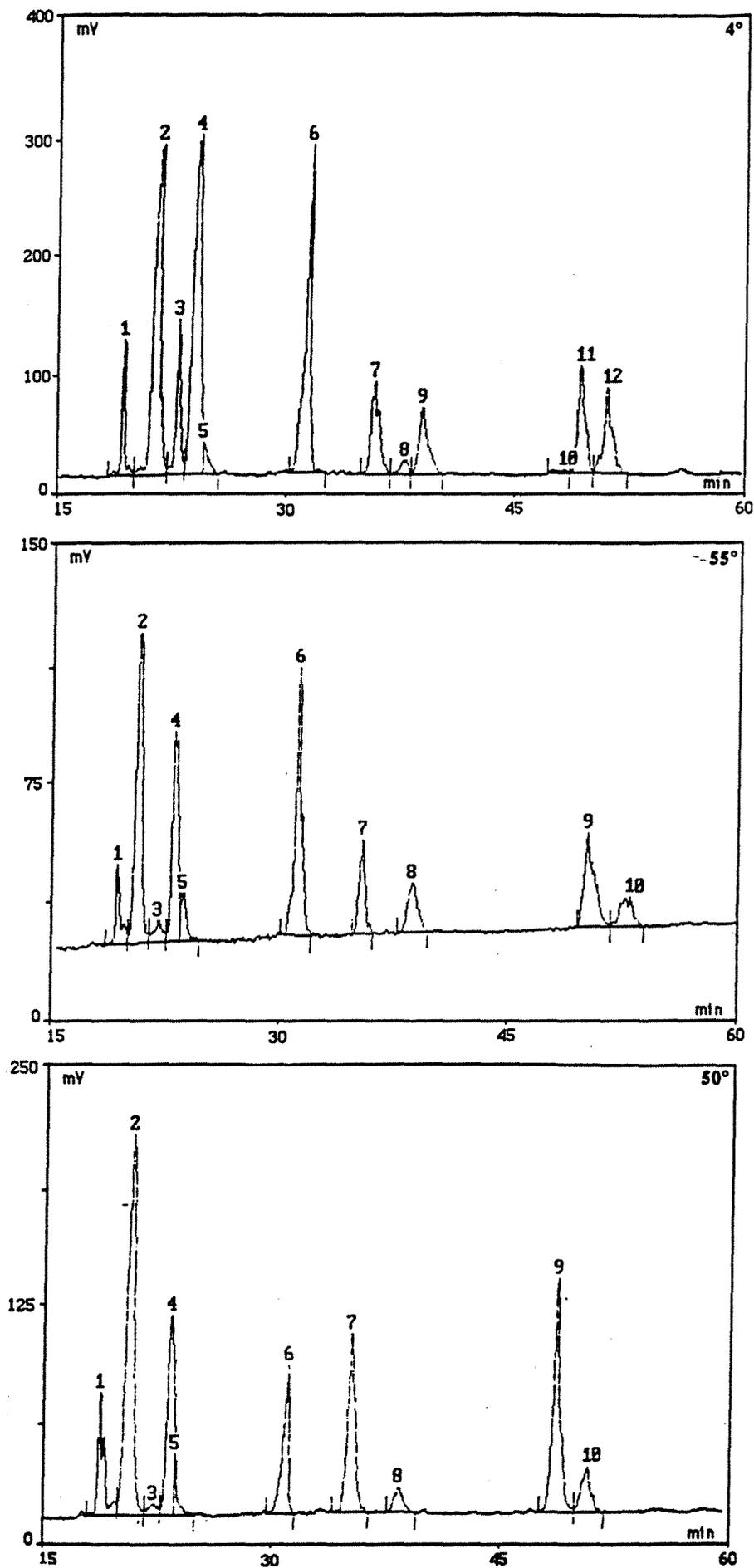


Figure 59 : Evolution des protéines sarcoplasmiques au cours du chauffage appréciée par chromatographie à polarité de phase inversée - cas des viandes exsudatives-

VYDAC 214TP54. Débit 1,8 ml/min. Détection UV 215 nm  
 Solvant A : eau + 0,1% TFA. Solvant B : eau/acétonitrile 30/70 + 0,1% TFA  
 Gradient linéaire de 50 à 75% de solvant B sur 55 min

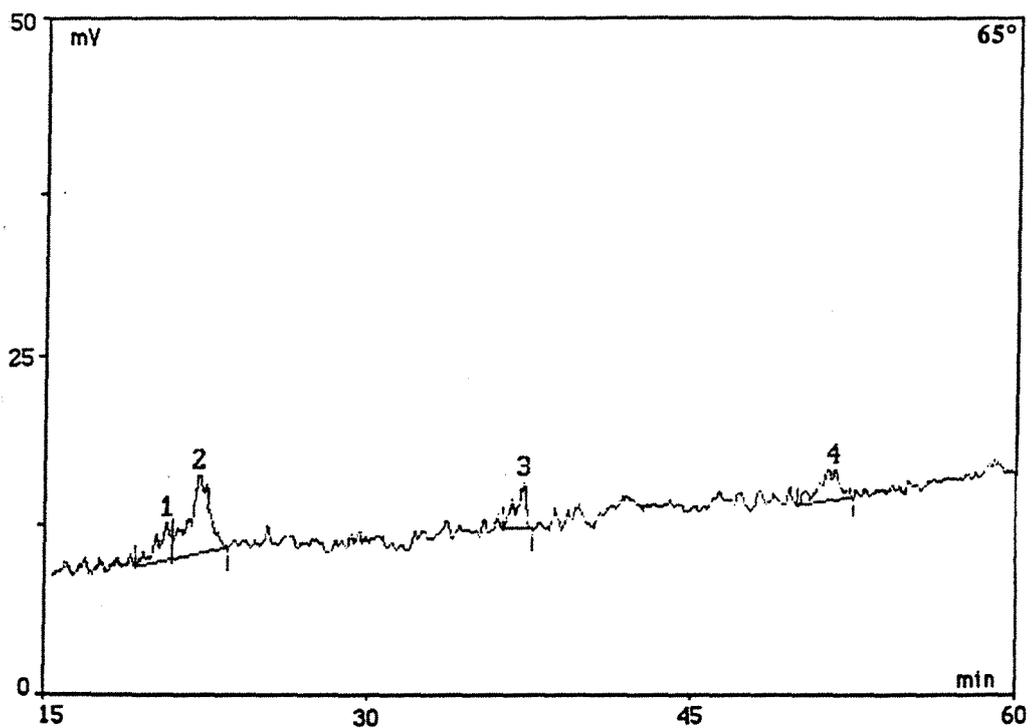
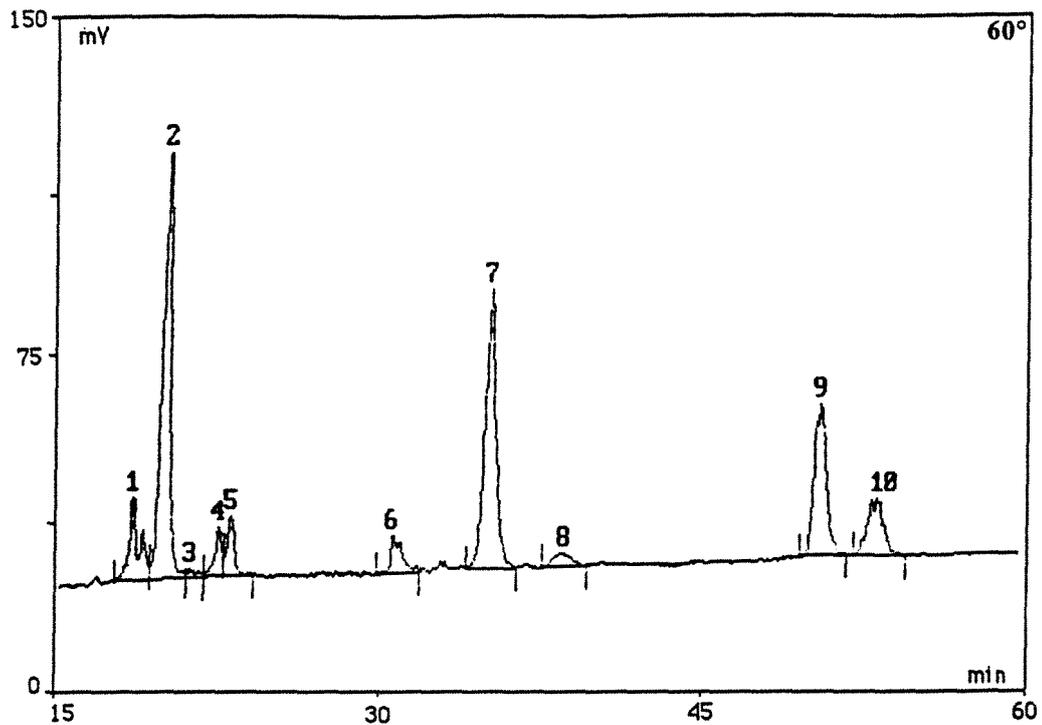


Figure 59 : Evolution des protéines sarcoplasmiques au cours du chauffage appréciée par chromatographie à polarité de phase inversée - cas des viandes exsudatives-

VYDAC 214TP54. Débit 1,8 ml/min. Détection UV 215 nm  
 Solvant A : eau + 0,1% TFA. Solvant B : eau/acétonitrile 30/70 + 0,1% TFA  
 Gradient linéaire de 50 à 75% de solvant B sur 55 min

Dès 50°C, la triose phosphate isomérase et la phosphorylase b sont totalement insolubilisées, tandis que la créatine phosphate kinase est insolubilisée à 90%. Pour les viandes normales, la triose phosphate isomérase n'avait précipité qu'à 4%, 18% pour la phosphorylase b et 5% pour la créatine phosphate kinase.

A 65°C, il ne reste plus en solution que l'aldolase, la PGM-LDH, et en faible quantité la pyruvate kinase et la myokinase. Rappelons que seule l'insolubilisation de la phosphorylase b est notable à la même température pour les viandes normales.

#### 4.2.3. Evolution du pH au cours du chauffage

La courbe d'évolution du pH d'extraits musculaires de viandes exsudatives au cours du chauffage a la même allure que celles des viandes normales (figure 60).

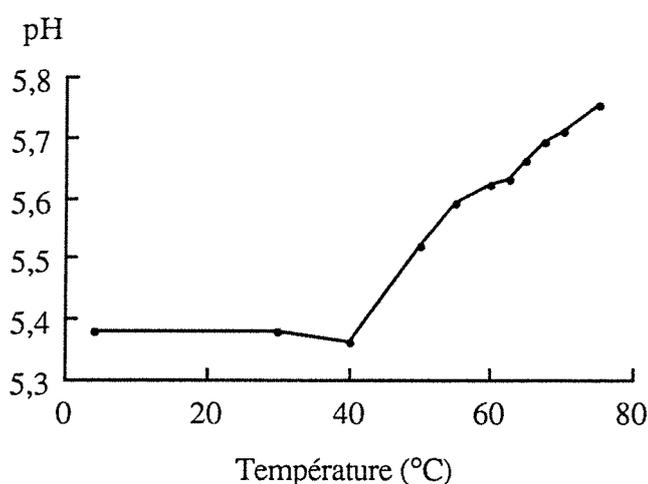


Figure 60 : Evolution du pH d'extraits musculaires de viandes exsudatives au cours du chauffage

Jusqu'à 40°C, aucune évolution du pH n'est observée. Après 40°C, le pH augmente de façon importante (+0,23 unité entre 40 et 50°C, et + 0,33 unité entre 40 et 60°C). Entre 60 et 75°C, on observe une élévation de +0,13 unité. Globalement, entre 40 et 75°C, le pH augmente de +0,29 contre +0,25 dans le cas des viandes normales.

L'amplitude de l'élévation de température est du même ordre de grandeur pour les viandes normales et les viandes exsudatives. Par contre, l'élévation est sensible pour des températures plus faibles dans le cas des viandes exsudatives (40° contre 50°C pour les viandes normales).

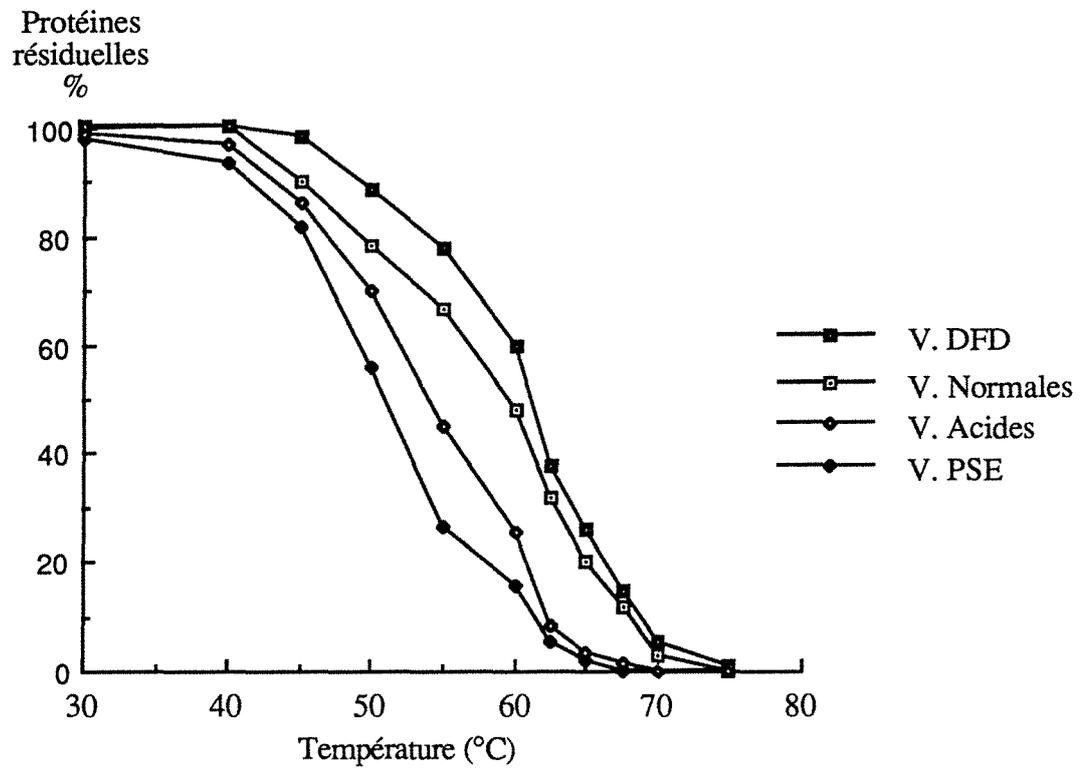


Figure 61 : Insolubilisation des protéines de différents types de viandes au cours d'équilibres thermiques successifs (T, 0 min)

### 4.3. Viandes acides et viandes DFD

#### 4.3.1. Evolution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques en fonction de la température

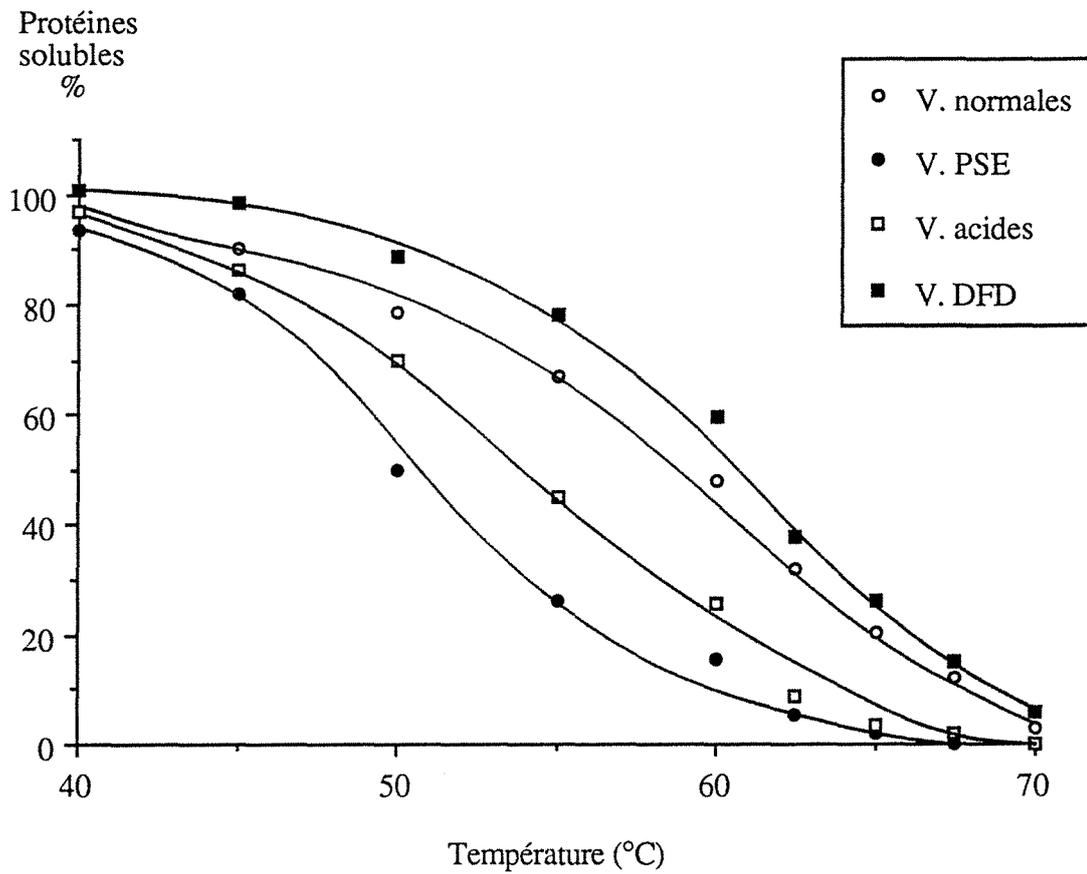
Cet essai a été pratiqué sur les échantillons étudiés dans la partie 2, conservés à -20°C décongelés en une nuit à 4°C : 5 échantillons par type de viandes. La cinétique d'insolubilisation thermique est suivie pour tous les échantillons entre 30 et 75°C, le pH de l'homogénat est relevé pour chaque traitement. Les résultats sont regroupés dans le tableau 35.

T 0 min	Viandes Acides	Ec. Type	Viandes DFD	Ec. Type
cru	100		100	
30	99,2	6,8	100,5	6,9
40	97,0	6,0	100,7	7,1
45	86,1	6,7	98,4	5,9
50	70,0	5,4	88,5	5,8
55	45,3	5,0	77,9	5,7
60	25,6	3,2	59,7	5,0
62,5	8,5	2,0	37,8	3,9
65,0	3,4	0,9	26,1	2,1
67,5	1,7	0,4	14,9	1,6
70	0		5,6	1,1
75			1	0,5

Tableau 35: Evolution de la teneur en protéines sarcoplasmiques d'extraits musculaires au cours d'équilibres thermiques

La figure 61 permet de comparer les profils d'insolubilisation thermique des quatre types de viandes : les protéines sarcoplasmiques des viandes pisseuses apparaissent comme les plus sensibles à la dénaturation thermique. En effet, à 30°C, 2% des protéines sont déjà insolubilisées. Dès 45°C, 18% des protéines ont coagulé contre 9,8% pour les viandes normales ou 1,6% pour les viandes DFD.

Une comparaison de moyennes pour chaque température de chauffage étudiée montre qu'à partir de 50°C, les taux d'insolubilisation protéique des différents types de viande présentent des différences significatives.



	$r^2$	ETR
Viandes normales	0,998	2,20
Viandes PSE	0,997	3,35
Viandes acides	0,997	2,72
Viandes DFD	0,996	3,36

Figure 62 : Modélisation de la cinétique d'insolubilisation des protéines sarcoplasmiques au cours d'équilibres thermiques successifs pour les 4 types de viande.

Les courbes moyennes d'insolubilisation par types de viandes ont été modélisées entre 40 et 70°C. Les meilleurs performances (appréciées sur la base du coefficient de détermination,  $r^2$ , et de l'écart-type résiduel, ETR) sont obtenues pour un modèle de type polynomial de degré 4 (figure 62). Ces modèles permettent de calculer la température correspondant aux 50% de dénaturation ( $T_m$ ) pour les 4 types de viandes étudiés :

51,0°C pour les viandes exsudatives  
 59,0°C pour les viandes normales  
 54,2°C pour les viandes acides  
 60,9°C pour les viandes DFD

Par ailleurs, il est possible de définir la température permettant la meilleure discrimination des viandes selon leur qualité. Il s'agit de 55°C (tableau 36).

Temp. (°C)	Viandes acides	Viandes PSE	Viandes DFD
55	+ 19,6	+ 36,2	- 11,4

Tableau 36 : % de protéines insolubilisées par rapport à la concentration protéique d'une viande normale

Ces paramètres,  $T_m$  et  $C_d$  (teneur en protéines résiduelles déterminée à  $T_d$ ) calculés pour chaque échantillon à partir des modèles polynomiaux sont significativement différents au seuil de 1% suivant le type de qualité de viande de l'échantillon.

Il faut rappeler que la concentration en protéines à l'état cru diffère selon la qualité de la viande: 33,5 mg/g pour les viandes normales opposée à 24,8 mg/g pour les viandes exsudatives.

Certaines protéines des viandes exsudatives à 48 h p.m sont partiellement dénaturées par rapport à leur état natif; le processus de dénaturation entamé fragilise les protéines alors plus sensibles à une élévation de température.

Il faut considérer cependant que, dans l'optique de la mise au point d'un test prédictif, le chauffage serait pratiqué sur des échantillons prélevés par biopsie, et par conséquent non encore maturés. L'étape de chauffage modéré ayant justement pour but d'induire les modifications (que l'on peut rapprocher de celles se produisant au cours de la maturation) révélant des différences suivant la qualité de la viande que le muscle produira au final.

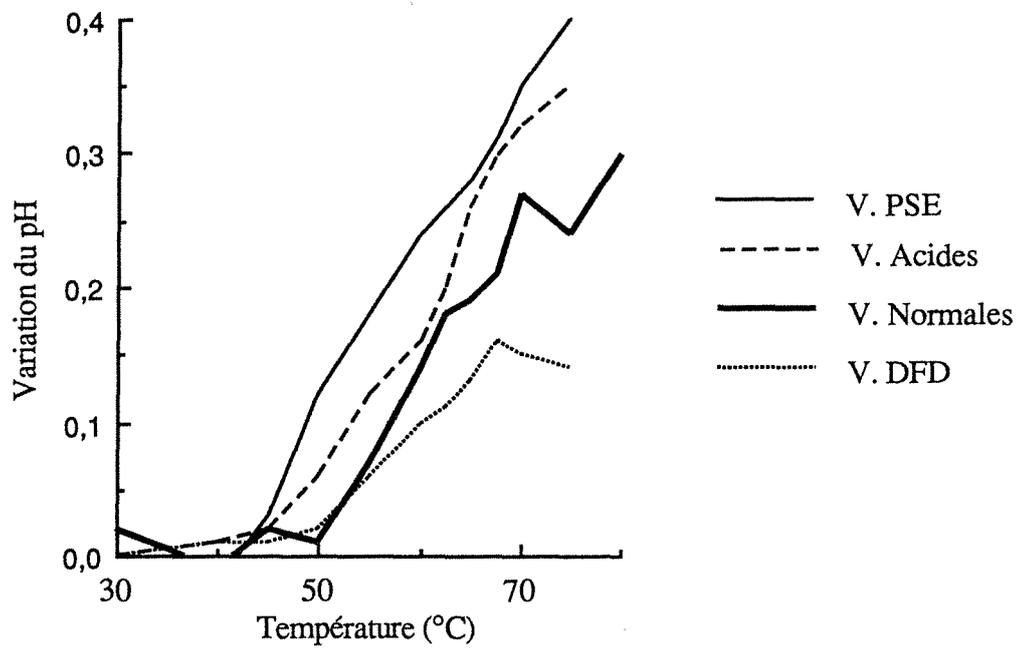


Figure 63 : Comparaison de l'évolution du pH d'extraits musculaires soumis à équilibres thermiques suivant la qualité de la viande

#### 4.3.2. Evolution du pH

L'évolution du pH au cours du chauffage des échantillons précédents est précisée figure 63.

T 0 min	Viandes Acides	Viandes DFD
cru	5,4	6,25
30	5,4	6,25
40	5,41	6,26
45	5,42	6,26
50	5,46	6,27
55	5,52	6,31
60	5,56	6,35
62,5	5,60	6,36
65	5,66	6,38
67,5	5,70	6,41
70	5,72	6,40
75	5,75	6,39

Tableau 37 : Evolution du pH au cours du chauffage d'extraits musculaires de viandes acides et DFD

Pour chaque type de viande, il existe un seuil de température à partir duquel on assiste à un accroissement rapide du pH en fonction de la température. Ce seuil est compris entre 40 et 50°C suivant les viandes. L'élévation observée par la suite est sensiblement du même ordre de grandeur pour tous les types de viandes, à l'exception des viandes DFD qui connaissent un accroissement de pH limité (+0,13 entre 50 et 70°C).

L'augmentation de pH observée corrélativement à la diminution de solubilité des protéines correspond au démasquage de résidus basiques - signe du "retournement" de la molécule protéique. Cette observation confirme qu'il y a bien dénaturation au sens physico-chimique du terme.

Par ailleurs, il est probable que les réactions de Maillard évoquées comme explication hypothétique de l'insolubilisation protéique n'interviennent pas au cours du chauffage tel qu'il a été pratiqué; ces dernières devraient en effet favoriser un abaissement de pH.

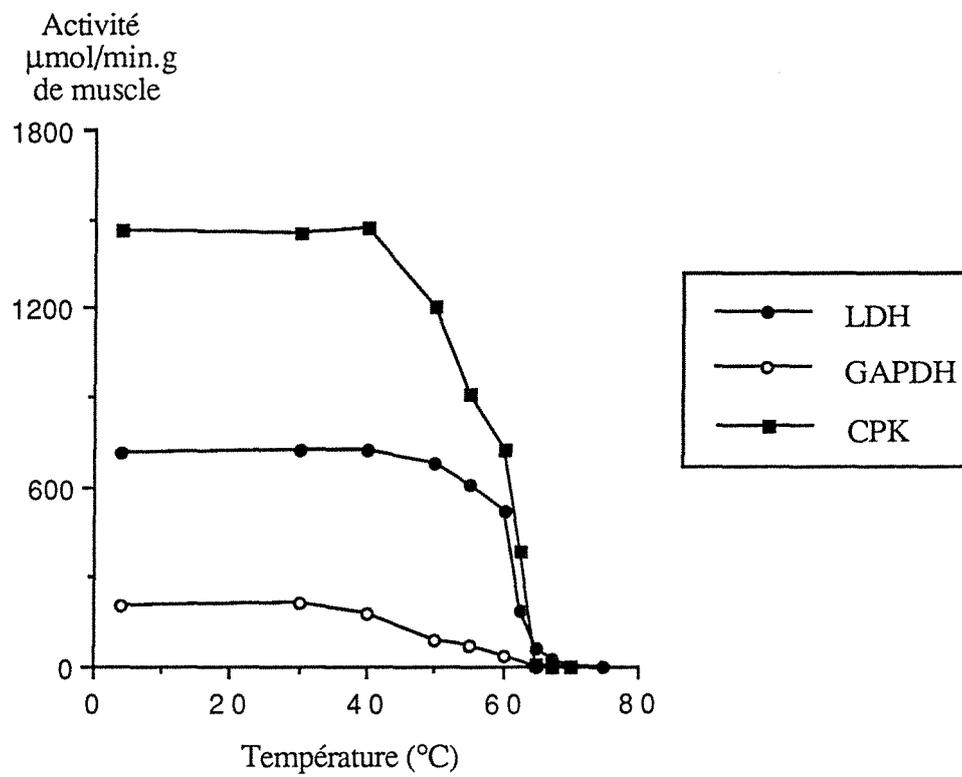


Figure 64 : Evolution des activités enzymatiques en fonction de la température

#### 4.4. Evolution des activités enzymatiques au cours du chauffage

La technique de séparation par chromatographie à polarité de phase inversée a permis de suivre l'insolubilisation des protéines sarcoplasmiques de la viande de porc en fonction de la température.

Les protéines sarcoplasmiques sont principalement constituées par des enzymes : enzymes du catabolisme du glycogène, enzymes de la glycolyse et créatine phosphate kinase. Nous avons étudié les évolutions relatives des activités enzymatiques et de la solubilité globale des protéines au cours du chauffage.

La littérature montre que l'activité de certaines enzymes peut être utilisée comme indicateur du degré de cuisson d'une viande (SPANIER et al., 1990; COLLINS et al., 1991a; STALDER et al., 1991); de la même façon, il serait possible de considérer l'activité enzymatique d'une protéine sarcoplasmique comme un traceur de l'insolubilisation protéique observée au cours du chauffage, et par conséquent comme un indicateur de la qualité de la viande.

Sur cinq homogénats de viande fraîche (48h p.m) de qualité normale, nous avons dosé l'activité de la créatine phosphate kinase, de la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase et de la lactate déshydrogénase.

L'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase est de 710,8  $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ . Jusqu'à 55°C, un chauffage de 0 min diminue faiblement son activité. A 60°C, on note une diminution d'activité de 28%. Par contre, un chauffage de 0 min à 65°C réduit significativement l'activité de l'enzyme (8,6% d'activité résiduelle). A 70°C, plus aucune activité n'est observée.

En ce qui concerne la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase, l'activité moyenne d'un extrait non chauffé est de 205,2  $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ ; la chute d'activité se situe pour des températures plus faibles que pour la LDH. A 50°C, on observe une perte d'activité de 57%; à 65°C, l'activité résiduelle est pratiquement nulle.

L'activité de la créatine phosphate kinase d'un extrait non chauffé est de 1460  $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ . Jusqu'à 50°C, cette activité ne faiblit pas. A 60°C, l'activité a diminué de moitié; l'enzyme est inactive à 70°C.

Au vu de la figure 64, la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase apparaît être l'enzyme la plus sensible au chauffage (les 50% d'inactivation sont observés pour un traitement de 50°-0min), la lactate déshydrogénase la plus thermorésistante (les 50% de dénaturation sont observés pour 61°C-0min).

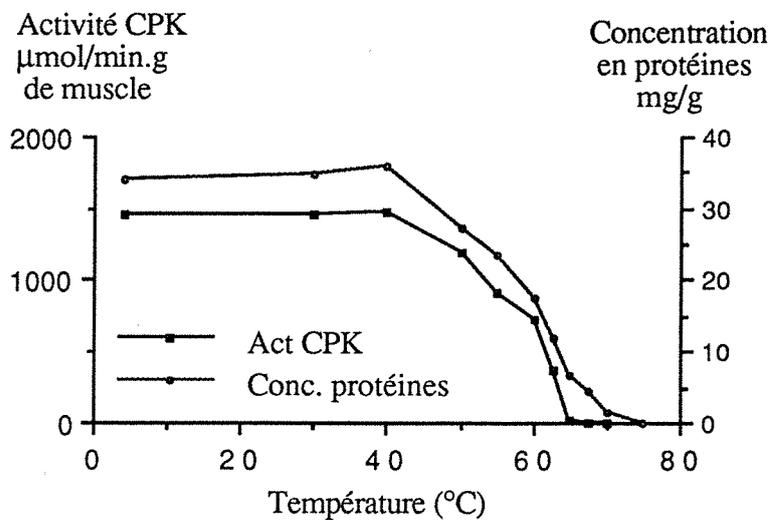
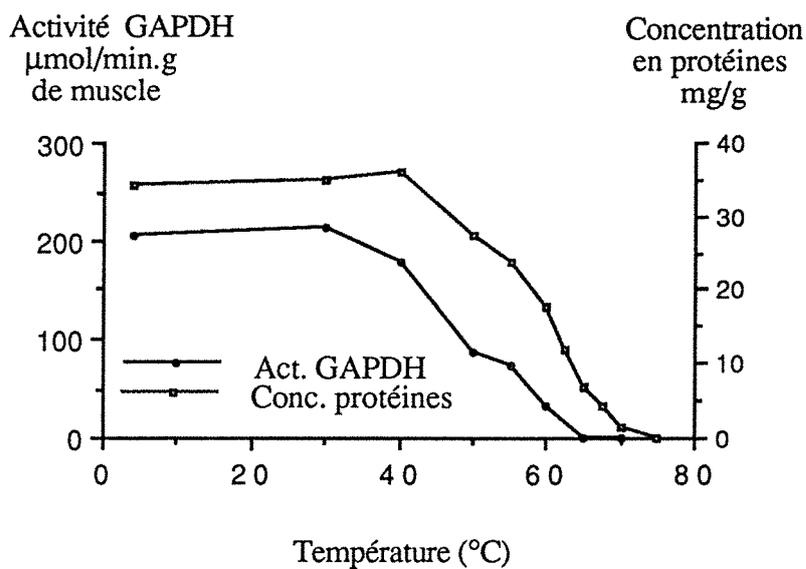
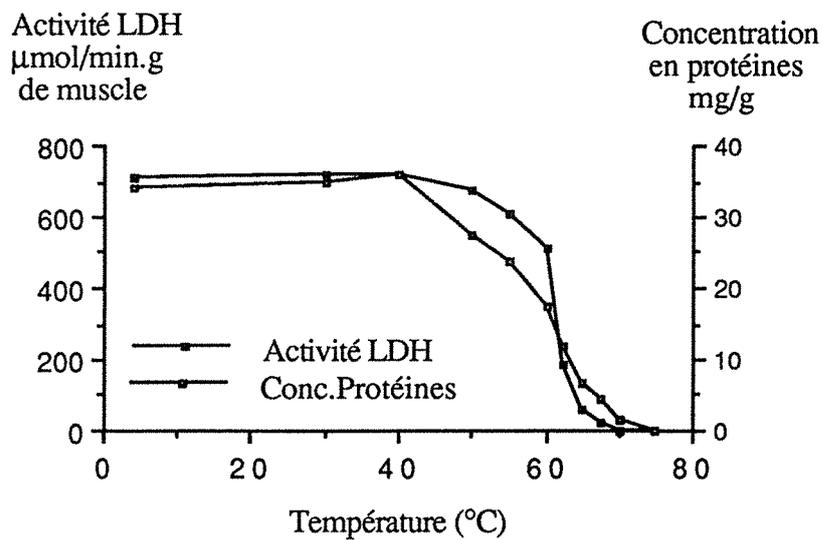


Figure 65 : Evolution des activités enzymatiques et de la concentration en protéines en fonction de la température

Il est difficile de comparer nos résultats avec les données de la littérature, les activités enzymatiques étant étroitement dépendantes du muscle considéré et de la technique de chauffage adoptée. COLLINS et al. (1991b), qui précisent que l'activité de la lactate déshydrogénase est grandement affectée par la température et faiblement par la durée de chauffage, observent une diminution de 42% de l'activité de la lactate déshydrogénase (moyenne sur plusieurs muscles) après un chauffage de 8 minutes à 63,8°C. Il est difficile de rapprocher cette valeur des 28% et 93,4% d'inactivation que nous obtenons à 60°C et 65°C. Les 50% de dénaturation de la CPK sont observés vers 58°C. SPANIER et al. (1990), qui chauffent directement le tissu musculaire, avancent une température de 65°C pour les 50% de dénaturation; ce qui tendrait à confirmer la thèse selon laquelle les protéines sont plus thermostables lorsqu'elles sont incluses dans la masse musculaire. Par ailleurs, la littérature ne comporte pas de données précises sur l'inactivation thermique de la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase.

L'élévation de température provoque le débobinage des protéines, le démasquage des groupements hydrophobes et de fait, l'agrégation des protéines. La modification de conformation des protéines, en affectant les sites catalytiques des enzymes, entraîne la perte de leur activité biologique.

La figure 65 suggère que la diminution d'activité enzymatique au cours du chauffage résulte de la diminution de solubilité des protéines.

Ce résultat présente un intérêt capital pour le développement d'un test prédictif de la qualité de la viande. En effet, apprécier le stade de dénaturation des protéines solubles d'une viande par un dosage d'activité enzymatique permettrait une caractérisation fine, précise, et également facilement automatisable, de la qualité de la viande.

La figure 66 présente l'évolution des activités enzymatiques spécifiques en fonction de la température; l'activité spécifique étant définie comme l'activité globale rapportée à la concentration totale en protéines

Dans le cas de la LDH et de la CPK, l'extrait chauffé à 40°C a l'activité la plus élevée et la concentration en protéines solubles la plus importante, mais présente cependant une activité spécifique plus faible qu'à 60°C pour la CPK et plus faible qu'à 50, 55 et 60° C pour la LDH. A ces températures, les taux d'activité restent relativement élevés alors que la quantité de protéines solubles chute de façon importante. De fait, le rapport activité enzymatique sur quantité de protéines extraites est plus élevé que pour les échantillons chauffés à 40°C.

De 40 à 65°C, l'activité spécifique de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase diminue de façon quasi linéaire (figure 66). La diminution de l'activité enzymatique en fonction de la température est parallèle à la diminution de la solubilité des protéines sarcoplasmiques.

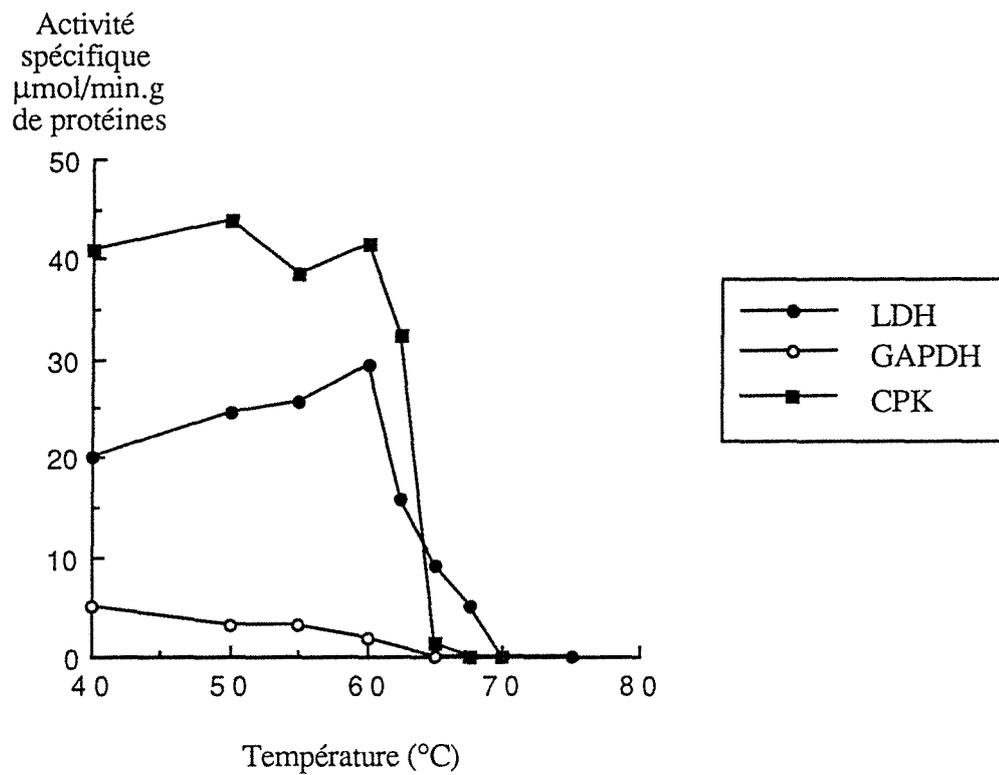


Figure 66 : Evolution des activités spécifiques en fonction de la température

Compte tenu de l'incidence observée de la qualité de la viande sur les profils de dénaturation thermique des protéines, nous sommes en mesure de penser que la température d'inactivation (température à laquelle l'activité enzymatique est réduite de moitié par rapport à l'activité observée à l'état cru), qui apparaît ici sensiblement identique pour les trois enzymes, est dépendante de la qualité de la viande. Il serait très intéressant de confirmer cette hypothèse au cours d'études futures par analyse enzymatique de viandes de qualité différentes.

Par ailleurs, la créatine phosphate kinase est une enzyme du métabolisme aérobie alors que la lactate déshydrogénase intervient dans un processus anaérobie. Il est possible que le rapport des activités de ces deux enzymes soit significatif d'un type de qualité de viande. Nous n'avons pas pu, faute de temps, approfondir cette approche; ce point mériterait également d'être précisé au cours de recherches ultérieures.



# CONCLUSION

La sélection porcine pratiquée en France ces vingt dernières années a favorisé la production d'animaux bien conformés et à faible couverture de gras. Parallèlement, la qualité de la viande s'est notablement dégradée. Pour maîtriser cette évolution, il est nécessaire de pouvoir intégrer au schéma de sélection un critère prédictif de la qualité. Dans cette optique, la société SANDERS a décidé d'investir dans la recherche d'un prédicteur de la qualité de la viande de porc.

Nos recherches se sont orientées vers l'étude des protéines sarcoplasmiques, dont la dénaturation partielle dans le cas des viandes exsudatives a été observée par plusieurs auteurs.

Notre travail a permis la mise au point d'une méthode chromatographique de séparation des protéines présentes dans un extrait aqueux de viande de porc aboutissant à l'identification de 13 protéines sarcoplasmiques.

La concentration en protéines sarcoplasmiques de la viande à 48 h post-mortem apparaît comme un indice satisfaisant de discrimination de la qualité de la viande. Les viandes normales présentent une concentration moyenne de 33,5 mg/g de muscle alors que les viandes exsudatives présentent une concentration de 24,8 mg/g, les viandes acides de 28,7 et les viandes DFD de 38,6 mg/g.

Au cours du stockage de la viande à 4°C, on observe une diminution sensible de la concentration en protéines sarcoplasmiques. Cette diminution est de 12,9% pour les viandes normales et de 25,9% pour les viandes exsudatives de 4h à 72h post-mortem. En 6 jours de conservation, elle atteint 25,7% pour les viandes normales contre 39,3% pour les viandes exsudatives.

Dès les premières heures suivant l'abattage, il existe des différences dans la concentration en protéines sarcoplasmiques entre les viandes normales et les viandes exsudatives. L'état PSE est caractérisé dès 4 h post-mortem par une teneur faible en créatine phosphate kinase, en triose phosphate isomérase, en phosphorylase b et en phosphoglucose isomérase; le degré d'insolubilisation de ces protéines s'accroissant au cours du stockage.



Par extrapolation, in vivo ces différences apparaissent faibles : estimation, au temps 0 de l'abattage, de 35,4 mg/g pour les viandes normales et de 33,1 mg/g pour les viandes exsudatives.

La chute de pH rapide dont sont le siège les viandes exsudatives conduit, dans les premières heures après l'abattage, à une conjonction pH bas / température élevée néfaste aux protéines sarcoplasmiques. Nous avons montré que le maintien d'un échantillon maturé à 37°C pendant 2 heures provoque l'insolubilisation de 66,7% de la créatine phosphate kinase, de 33,3% de la phosphorylase b, de 32,3% de la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase et de 26,7% de la myokinase à pH 5.7, et aussi de 84,6% de la glycéraldéhyde 3.phosphate déshydrogénase, de 60% de la phosphorylase b, de 58,3% de la triose phosphate isomérase, de 52,2% de la créatine phosphate kinase et de 46,2% de la myokinase à pH 5.0. Le couple pH bas/température élevée dans les premières heures après l'abattage apparaît responsable de l'insolubilisation des protéines sarcoplasmiques observée dans les viandes exsudatives maturées.

Un traitement thermique appliqué à de la viande maturée exacerbe les différences de concentration en protéines sarcoplasmiques relevées entre les différents types de viandes.

Quelle que soit la qualité de la viande, le chauffage provoque l'insolubilisation des protéines sarcoplasmiques. Les courbes d'insolubilisation ont toutes le même profil; cependant, pour les viandes exsudatives et les viandes acides, l'insolubilisation débute à des températures plus faibles et, pour une même température, l'amplitude de l'insolubilisation est plus importante.

Pour la gamme de température considérée (30-80°C), l'insolubilisation est toujours moindre pour les viandes DFD que pour les viandes normales.

En prenant comme référence l'état cru, on observe après équilibre thermique à 55°C :

- 34,1% de protéines précipitées dans le cas des viandes normales
- 70,3% de protéines précipitées dans le cas des viandes exsudatives
- 53,7% de protéines précipitées dans le cas des viandes acides
- 22,7% de protéines précipitées dans le cas des viandes DFD.

Par ailleurs, les premiers résultats obtenus sur l'évolution de l'activité de certaines enzymes au cours du chauffage montrent que l'insolubilisation des protéines induit parallèlement l'inactivation enzymatique. Il serait intéressant de préciser l'incidence de la qualité sur la température d'inactivation des enzymes et d'étudier l'évolution relative d'enzymes aérobies et d'enzymes anaérobies au cours du chauffage - autant de points que nous n'avons pas eu le temps d'approfondir.



Dans la problématique que nous avons développée, il est possible d'envisager la mise au point d'un test prédictif de la qualité de la viande. Ce test pratiqué à partir de muscle vivant nécessiterait la mise en place d'une phase de "maturation" qui permette l'évolution des protéines sarcoplasmiques, et donc le développement des différences suivant la qualité de la viande. Ce test reposerait sur les bases suivantes:

- prélèvement in vivo
- préparation de l'extrait musculaire
- chauffage de l'extrait 55°C - 0 min
- détermination de la concentration en protéines ou de l'activité enzymatique sur l'extrait cru et sur l'extrait cuit et calcul des rapports  
[ concentration protéines ]<sub>55°</sub>      ou      (activité enzymatique)<sub>55°</sub>  
[ concentration protéines]<sub>cru</sub>                      (activité enzymatique)<sub>cru</sub>
- comparaison de ces rapports à une échelle pré-établie et classification des échantillons suivant leur qualité.

La poursuite de ce travail nécessiterait notamment d'optimiser la phase de traitement thermique qui doit générer les plus grandes différences possibles entre les quatre types de viandes, de faire des essais à partir de biopsies et enfin de traiter un grand nombre d'échantillons de qualités différentes de façon à établir une échelle de référence.



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



- ACTON J.C.** (1972) Effect of heat processing on extractability of salt soluble protein tissue binding strength and cooking loss in poultry meat loaves. *J. Food Sci.*, **37**: 244-246.
- ANSAY M.** (1974) Individualité musculaire chez le bovin: étude de l'équipement enzymatique de quelques muscles. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **14**, (3): 471-486.
- ARCHIBALD A.L. and IMLAH P.** (1985) The halothane sensitivity locus and its linkage relationships. *Anim. Blood Groups and Bioch. Gen.*, **16**, (4): 253-263.
- ASGHAR A. and PEARSON A.** (1980) *Adv Food Res.*, **26**: 54-213.
- BANDMAN E. and ZDANIS D.** (1988) An immunological method to assess protein degradation. *Meat Sci.*, **22**: 1-19.
- BARRETT A.J.** (1977a) Cathepsin B and other thiol proteinases. In *Proteinases in mammalian cells and tissues* (A.J.BARRETT Ed), North-Holland Publishing Co, New-York: 181-208.
- BARRETT A.J.** (1977a) Cathepsin B and other thiol proteinases. In *Proteinases in mammalian cells and tissues* (A.J.BARRETT Ed), North-Holland Publishing Co, New-York: 209-248.
- BARTON-GADE P.** (1980) *Manuscript N°606E* Slagteriernes Forskingsinstitut. Denmark.
- BARTON-GADE P.** (1984) *Manuscript N°606E* Slagteriernes Forskingsinstitut. Denmark.
- BARTON-GADE P.** (1986) 36<sup>e</sup> Réunion FEZ, Halkidiki, Grèce.
- BECHTEL P.J. and PARRISH F.C.** (1983) Effects of post-mortem storage and temperature on muscle protein degradation: analysis by SDS-gel electrophoresis. *J. Food Sci.*, **48**: 294-297.
- BELLO J., LARALDE J. et SAENZ DE BURUAGA I.** (1974) *Anal. Bromatol.* XXVI: 195.
- BENDALL J.R. and WISMER-PEDERSEN J.** (1962) Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. *J. Food Sci.*, **27**: 144-157.
- BENDALL J.R.** (1973) Post mortem changes in muscles. In : *Structure and function of muscle* (BOURNE H. ed.), Academic Press , New York, **11**: 243-309.
- BERGMEYER H.U.** (1974) *Methods of enzymic analysis*. Academic Press, second edition, **1**: 466-467.
- BERNOFSKY CI., FOX J.B. and SCHWEIGERT B.S.** (1959) Biochemistry of myoglobin. 7. The effect of cooking on myoglobin of beef muscle. *Food Res.*, **24**: 339-343.
- BIRD J.W.C. and SCHWARTZ W.N.** (1978) Proteolytic enzymes in striated and non striated muscles. In : *Intracellular protein catabolism II.*, (V.TURK and N. MARKS Eds), Plenum Press, New York.
- BIRD J.W.C. and CARTER J.H.** (1980) In: *Degradative processes in heart and skeletal muscle* , (K. WINDDENTHAL Ed), Elsevier / North Holland Biomedical Press, New York: 51-85.
- BOCCARD R. et VALIN C.** (1984) Dans *Les viandes. Hygiène et technologie*. Informations techniques des services vétérinaires. N°88-91: 94.



- BORCHERT L.L , POWRIE W.D., BRISKEY E.J.** (1969) A study of the sarcoplasmic proteins of porcine muscle by starch gel electrophoresis. *J. Food Sci.* , **34**: 148-153.
- BOUTON P.E., HARRIS P.B. and SHORTHOSE W.R.** (1971) Effect of ultimate pH upon the water-holding capacity and tenderness of mutton. *J. Food Sci.*, **36**: 435-439.
- BOUTON P.E., HARRIS P.B. and SHORTHOSE W.R.** (1972) The effects of ultimate pH on ovine muscle water-holding capacity. *J. Food Sci.*, **37**: 351-355.
- BRISKEY E.J. and WISMER-PEDERSEN J.** (1961) Biochemistry of pork muscle structure. I. Rate of anaerobic glycolysis and temperature changes versus the apparent structure of muscle tissue. *J. Food Sci.*, **26**: 297-305.
- BROWN S.N.** (1992) A note on the use of subjective methods for assessing pig meat quality on the slaughterline. *Meat Sci.*, **32**: 195-202.
- BRONSTEIN W.R. and KNULL H.R.** (1981) *Can. J. Biochem.*, **59**: 494.
- CALDIRONI H.A. and BAZAN N.G.** (1980) Quantitative determination of low-salt soluble protein patterns of bovine muscles cooked at different temperature by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Food Sci.* , **45**: 901
- CAMOU J.P. and SEBRANEK J.G.** (1991) Gelation characteristics of muscle proteins from PSE pork. *Meat Science*, **30**: 207-220.
- CASWELL A.H. and CORBETT A.M.** (1985) Interaction of GAPDH with isolated microsomal subfractions of skeletal muscle *J. Biol. Chem.*, **260**: 6892-6898.
- CHARPENTIER J. and GOUTEFONGEA R.** (1963) Comportement électrophorétique des protéines sarcoplasmiques du muscle de porc normal et exsudatif. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **3**, (4): 381-389.
- CHARPENTIER J.** (1969) Influence de la température et du pH sur quelques caractéristiques physico-chimiques des protéines sarcoplasmiques du muscle de porc. Conséquences technologiques. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **9**, (1): 101-120.
- CHEAH K.S. and CHEAH A.M.** (1984) Membrane permeability in porcine malignant hyperthermia. *Membrane Fluidity* , **23** : 661-687.
- CHEAH K.S., CHEAH A.M. and WARING J.C.** (1986) *Meat Sci.* , **17** : 661-687.
- CHEFTEL J.C., CUQ J.L. et LORIENT D.** (1985) Dans *Protéines Alimentaires: dénaturation des protéines*. Technique et Documentation. Lavoisier, (3): 31 et 37-41.
- CHENG C. S. and PARRISH F.C.** (1977) Effect of Ca<sup>2+</sup> on changes in myofibrillar proteins of bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.*, **44**, (1): 1621-1626.
- CHENG C. S. and PARRISH F.C.** (1979) Heat-induced changes in myofibrillar proteins of bovine longissimus dorsi. *J. Food Sci.*, **42** : 22-24.
- CHEVALIER O., DARDENNE P., DEROANNE Cl. et BISTON R.** (1990) Contrôle de la qualité de la viande par spectroscopie infrarouge proche. *VPC*, **11**, (6): 311-312.
- CHRISTIAN L.L. and ROTHSCHILD M.F.** (1981) *Pig Producers Day Reports*. Iowa State Experiment Station : 3 p.



- DRABIKOWSKI W., GORECKA A. and JAKUBIEC-PUKA A. (1977)** Endogenous proteinases in vertebrate skeletal muscles. *Int. J. Biochem.*, **8**: 61.
- DRANSFIELD E. (1981)** Eating quality of DFD beef. In : *The problem of dark-cutting beef.* (HOOD D.E. and TARRANT P.V. Eds) Martinus Nijhoff. The Hague: p 344-358.
- DUTHIE G.G., ARTHUR J.R. and NICOL F. (1988)** Plasma pyruvate kinase activity vs creatine kinase activity as an indicator of the porcine stress syndrom. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, (4): 508-510.
- DUTSON T. and LAWRIE R. (1974)** Release of lysosomal enzymes during post-mortem conditioning and their relationship to tenderness. *J. Food Technol.*, **9**, (1): 43-50
- EIKELENBOOM G. and MINKEMA D. (1974)** Prediction of pale, soft and exsudative muscle with non lethal test for the halothane induced porcine malignant hyperthermia syndrome. *Tijdschr. Diergeneesk* , **99** : 421-426.
- ELGASIM E.A., KOOHMARAIE M., ANGLEMIER A.F., KENNICK W.H. and ELKHALIFA E.A. (1985)** The combined effect of the CAF and cathepsin D on skeletal muscle. *Food Microstructure*, **4**: 55-61.
- EMORI Y., KAWASAKI H., SUGIHARA H., IMAJOH S., KAWASHIMA S and SUZUKI K. (1986)** Isolation and sequence analysis of complementary DNA clones for the large subunits of two isozymes of rabbit calcium-dependant protease. *J. Biol. Chem.*, **291**, (20): 9465-9471.
- EWAN R.C., TOPEL D.G. and ONO K. (1979)** Chemical composition of chops from pale, soft, exsudative and normal pork loins. *J. Food Sci.*, **44**: 678.
- FERNANDEZ X., NAVEAU J., TALMANT A. et MONIN G. (1990)** Distribution du potentiel glycolytique dans une population porcine et relation avec le rendement napole. *J.R.P.*, **22**: 97-100.
- FERRER (1982)** L'eau dans la viande. *Euroviande*, **23**, (129): 15-23.
- FISCHER C., HOFMANN K. und HAMM R. (1978)** Electrophoretische untersuchung der proteine von sarkoplasma und myofibrillen in normalen und PSE fleisch beim schwein. *Fleischwirt.*, **2**: 303-306.
- FISCHER C., HAMM R. and HONIKEL K.O. (1979)** Changes in solubility and enzymatic activity of muscle glycogen phosphorylase in PSE muscles. *Meat Science*, **3**: 11-19.
- FRIEDMAN N.M. (1977)** Protein cross-linking. A: Biochemical and molecular aspects. Plenum Press. New-York.
- FROUIN A. et SCHECK J. (1971)** Séquestration du calcium par la viande de porc. *Ind. Alim. Agric.*, **88**, (11): 1595-1605.
- GAHNE B. and JUNEJA R.K. (1985)** Prediction of the halothane genotypes of pigs by deducing Hal, Phi, Po2 and Pgd haplotypes of parents and offsprings: result from a large-scale practice in Swedish breeds. *Anim. Blood Groups and Biochem. Gen.*: **16**, (4): 265-283.
- GOLL D.E., STROMER M.H., OLSON D.G., DAYTON W.R., SUZUKI A. and ROBSON R.M. (1974)** The role of myofibrillar proteins in meat tenderness. *Proc. Meat Ind. Res. Conf.*, American Meat Institute Foundation, Arlington, Virginia: 75-98.



- GOLL D.E., OTSUKA Y., NAGAINIS P.A., SHANNON J.D., SATHE S.K. and MUGURUMA M.** (1983a) Role of muscle proteinases in the maintenance of integrity and mass. *J. Food Biochem.*, **7**: 137.
- GOLL D.E., SHANNON J.D., EDMUNDS T.E., SATHE S.K., KLEESE W.C. and NAGAINIS P.A.** (1983b) Properties and regulation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase. (B de BERNARD et al. Eds) Elsevier North-Holland, Biomedical Press, New-York: 755-800.
- GOLL D.E., KLEESE W.C. and SZPACENKO A.** (1989) Skeletal muscle proteases and protein turnover. In : *Animal growth regulation.* (CAMPION D.R., HAUSMAN G.J., MARTIN R.J. Eds), Plenum Publishing Corporation : 141.
- GOUSSAULT B.** (1978) Pouvoir de rétention d'eau des viandes. Son rôle en technologie. *Ind. Alim. Agric.*, **95**, (4): 297-302.
- GOUSSAULT B. et GOUTEFONGEA R.** (1978) Etude du PRE des viandes de boeuf et de porc. Paris, DGRST (Décision d'aide n° 757 0409).
- GOUTEFONGEA R.** (1960) Description d'un nouvel appareil pour mesurer le pouvoir de rétention d'eau de la viande. *6<sup>e</sup> Meet. Meat Res. Institutes*, Utrecht.
- GOUTEFONGEA R.** (1963) Comparaison de différentes méthodes de mesure du PRE de la viande de porc. Liaison avec le pH. *Annal. Zootechn.*, **12**: 125-132.
- GOUTEFONGEA R.** (1969) Etude du PRE de la viande de porc. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **9**: 111-112.
- GOUTEFONGEA R.** (1971) Influence du pH et de la température sur la solubilité des protéines musculaires de porc. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, **11**: 233-244.
- GOUTEFONGEA R., GIRARD J.P. et JACQUET B.** (1978) Caractéristiques de la viande de porc, de transformation. *J. R. P.*, **10**: 235.
- GOUTEFONGEA R. et GOUSSAULT B.** (1982) Rétention d'eau de la viande de porc: évolution post-mortem. Influence du pH, du sel, des polyphosphates et des cations divalents. *Sci. Aliments*, 2 (N°hors-série II): 123-126.
- GRAU R. und HAMM R.** (1953) Eine einfache Methode zur Bestimmung des Wasserbindung im Muskel. *Naturwiss.*, **40**: 29-30.
- HABEEB A.F.S.A.** (1966) Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulfonic acid. *Anal Biochem.*, **14**: 328-336.
- HAMM R. and DEATHERAGE F.E.** (1960) Changes in hydration, solubility and charges of muscle proteins during heating of meat. *Food Res.*, **25**: 587-610.
- HAMM R.** (1960) Biochemistry of meat hydration. *Adv. Food Res.*, **10**: 355-463.
- HAMM R. und IWATA H.** (1962) Chemische und physikalische Veränderungen beim Erhitzen von Fleisch. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, **116**: 20-23.
- HAMM R.** (1966) Heating of muscle systems. In : *The physiology and biochemistry of muscle as a food*, Univ. Wisconsin Press., Madison: 363-385.
- HAMM R.** (1977) Change of muscle proteins during the heating of meat. In : *Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing.* (HOYEM T. and KVALE O. Eds), Applied Science Publishers Ltd, London : 101-134.



- HAMM R. (1986) *In : Muscle as Food*, ed by Bechtel P.J. Academic Press., New York.
- HARRIGTON M.G. and HENAHAN M.M. (1982) Studies of sarcoplasmic proteins by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. 28th European Meat Res. Workers* : 63-65.
- HAY J.D., CURRIE R.W. and WOLFE F.H. (1973) Polyacrylamide disc gel electrophoresis of fresh and aged chicken muscle proteins in sodium dodecyl sulfate. *J. Food Sci.*, **38**: 987.
- HELANDER E. (1957) On quantitative muscle protein determination. *Acta Phys. Scand.*, **41** (supplement): 141.
- HERMANSSON A.M. (1983) Protein functionality and its relationship to food microstructure. *Qual. Plant Foods Hum. Nutr.*, **32**, (3-4): 369-388.
- HERMANSSON A.M., HARBITZ O. and LANGTON M. (1986) Formation of two types of gels from bovine myosin. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, (1) : 69-84.
- HENDERSON D.W., GOLL D.E. and STROMER M.H. (1970) A comparison of shortening and Z-line degradation in post-mortem bovine, porcine and rabbit muscle. *Am. J. Anat.*, **128**: 117-136.
- HIMMEL M.E. and SQUIRE P.G. (1981) High pressure gel permeation chromatography of native proteins on TSK-SW columns. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **17**: 365-373.
- HOFMANN K. und SCHAEEL U. (1966) *Jahresber. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmbach* 50.
- HOFMANN K. (1975) Ein neues Gerät zur Bestimmung der Wasserbindung des Fleisches: der Kapillar Volumeter. *Fleischwirst.*, **55**: 25-30.
- HONIKEL K. O., KIM C. and HAMM R. (1984) Causes of the development of PSE pork. *In : Proceedings of the 30<sup>th</sup> European Meeting Meat Research Workers*, 95.
- HONIKEL K. O. und KIM C. (1986) Causes of the development of PSE pork. *Fleischwirst.*, **66**: 349-353.
- HONIKEL K.O. (1987) How to measure the WHC of meat ? In *Evaluation and control of meat quality in pig*. Martinus Nijhoff Publishers: 129-142.
- HOWARD A., LAWRIE R.A. and LEE C.A. (1960) *CSIRO. Division of food preservation and transport technical paper*, Melbourne Australia, **15**: 5.
- HWANG P.T., McGRATH C.J., ADDIS P.B., REMPEL W.E, THMPSON E.W and ANTONIKA J. (1978) Blood creatine kinase as a predictor of porcine stress syndrome. *J. Anim. Sci*, **47**, (3): 630-633.
- IKEUCHI Y., ITO T. and FUKAZAWA T. (1980) Change of regulatory activity of tropomyosin and troponin on acto-heavy-meromyosin ATPase during post-mortem storage of muscle. *J. Food Sci.*, **45**, (1): 13-20.
- ITZHAKI R.F. and GILL D.M. (1964) *Anal. Biochem.*, **9**: 401.
- JACQUET B., SELLIER P., RUNAVOT J.P., BRAULT P., HOUIX Y. PERROCHE C., GOGUE J. et BOULARD J. (1984) Prediction du rendement technologique de la fabrication du " jambon de Paris " à l'aide de mesures prises à l'abattoir. *J.R.P.*, **16**: 49-58.



- JENSEN P. and ANDRESEN E.** (1980) Testing methods for PSE syndrome: current research in Denmark. *Livest. Prod. Sci.*, **7**,(4): 325-335.
- JALANG'O J.W., SAUL G.L. and LAZWRIE R.** (1987) Observations on muscle press juice from bovine, ovine and porcine muscles. *Meat Sci.*, **21**: 73-76.
- JOCELYN P.C.** (1972) In *Biochemistry of the SH group*, Academic Press. New-York.
- JOSEPH R.L. and CONNOLY J.** (1977) The effects of suspension method, chilling rate and post-mortem aging period on beef quality. *J. Food Technol.*, **12**: 231-247.
- KARLSSON A. and LUNSTRÖM K.** (1991) Meat pigment determination by a simple and non-toxic alkaline haematin method. *Meat Sci.*, **29**: 17-24.
- KAPPRELL H.P. and GOLL D.E.** (1989) Effect of calcium on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.*, **264**, (30) : 17888-17896.
- KIEREBINSKI C.** (1969) *Roczn. Technol. Chem. Zywn.*, **15**: 171.
- KIRSCHKE H., KARGEL H.J., RIEMANN S. and BOHLEY P.** (1981) Cathepsin L. In *Proteinases and their inhibitors: Structure, Function and Applied Aspects* (V. TURK and Lj. VIALE Eds) Pergamon Press, Oxford: 93-101.
- KLEMENT J.T., CASSENS R.G., FENNEMA O.R.** (1974) The effect of bacterial fermentation on protein solubility in a sausage model system. *J. Food Sci.*, **39**, (4): 833-835.
- KLIBANOV A.M. and AHERN T.J.** (1987) Thermal stability of protein. In *Protein Engineering*. (OXENDER D.L., FOX C.F., LISS A.R. Eds), Inc, New-York, **19**: 213-218.
- KOLCZAK T., WEBER M.** (1970) A study of water solubility of protein in porcine muscle. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, **103**: 133-145.
- KOOHMARAIE M., KENNICK W.H., ELGASIM E.A., DICKSON R.L. and SANDINE W.E.** (1983) Storage and display life characteristics of beef as affected by pre-rigor pressurization. *J. Food Prot.*, **46**, (10): 878-882.
- KOOHMARAIE M., SEIDEMAN S.C., SCHOLLMAYER J.E., DUTSON T.R. and CROUSE J.D.** (1986) Effect of post-mortem storage on Ca<sup>2+</sup> - dependant proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Sci.* : 187.
- KOOHMARAIE M., BABIKAR A.S., MERKEL R.A. and DUTSON T.R.** (1988) Role of Ca<sup>2+</sup>-dependant proteases and lysosomal enzymes in post-mortem changes in bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.*, **53**: 1253.
- KOPP J.** (1976) Tendreté de la viande. Principaux facteurs liés à l'âge des animaux. *Bull. Techn. CRZV Theix INRA*, **24**: 37-46.
- KRUGGEL W.G. et al.** (1981) Near infrared reflectance determination of fat, protein and moisture in fresh meat. *J. Assoc Off. Anal. Chem.*, **68**: 3.
- KUBY S.A., NODA L. and LARDY H.A.** (1954) *J. Biol. Chem.*, **210**: 65.
- LABORDE D.** (1984) Etude de facteurs de variation du pouvoir de rétention d'eau de la viande de Porc. *Thèse Docteur Ingénieur, Université Clermont II. FRANCE.*
- LABORDE D. et MONIN G.** (1985) Pouvoir de rétention d'eau de la viande de porc: Influence du type métabolique musculaire et importance des composants du sarcoplasme *Sci. Alim.*, **5** : 353-364.



- LEWICKI P.P., BUSK G.C., PETERSON P.L. and LABUZA T.P. (1978)** Determination of factors controlling accurate measurement of Aw by the vapor pressure manometric technique. *J. Food. Sci.*, **43**, (1): 244-246.
- LANZA E. (1983)** Determination of moisture, protein, fat calories in raw pork and beef by near infrared spectroscopy. *J. Food Sci.*, **48**: 471-474
- LAROCHE M. (1981)** Libération et migration du jus pendant le chauffage de la viande *Thèse Docteur Ingénieur, Sciences et Techniques de l'Industrie Alimentaire .ENSIA Massy. FRANCE.*
- LAWRIE R.A. (1960)** Post-mortem glycolysis in normal and exsudative longissimus dorsi muscles of the pigs in relation to so-called white muscle disease. *J. Comp. Path.Therap.*, **70**: 273.
- LEDWARD D.A. (1978)** Scanning colorimetric studies of some protein-protein interactions involving myoglobin. *Meat Sci.*, **2**: 241-249.
- LEFAUCHEUR L. et VIGNERON P. (1986)** Post-natal changes in some histochemical and enzymatic characteristics of three pig muscles. *Meat Sci.*, **16**: 199.
- LEE Y.B., RICKANSMUD D.A., HAGBERG E.C. and BRISKEY E.J. (1974)** Application of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for determination of the maximum temperature to which bovine muscles have been cooked. *J. Food Sci.*, **39**: 428.
- LEVIEUX D., VENIEN A., LEVIEUX A., OUALI A. et RENERRE M. (1990)** Caractérisation immunochimique du chauffage de la viande. *VPC*, **11**, (6): 301-302.
- LEWICKI P.P., BUSK G.C., PETERSON P.L. and LABUZA T.P. (1978)** Determination of factors controlling accurate measurement of Aw by the vapor pressure manometric technique. *J. Food Sci.*, **43**, (1): 244-246.
- LEWIS R.V., FALLON A., STEIN S., GIBSON K.D. and UDENFRIEND S. (1980)** Supports for reverse-phase high performance chromatography of large proteins. *Anal. Biochem.*, **104**: 153-159.
- LOCKER R.H. (1960)** Proteolysis in the storage of beef. *J. Sci. Food Agric.*, **11**: 520-525.
- LOCKER R.H. and DAINES G.J. (1975)** Effect of shortening during cooking on the tenderness and histology of beef. *J. Sci. Food Agric.*, **26**: 1711-1720.
- LOCKER R.H., DAINES G.J., CARSE W.A. and LEET N.G. (1977)** Meat tenderness and the gap filaments. *Meat Sci.*, **1**: 87-104.
- LOPEZ-BOTE C., WARRISS P.D., and BROWN S.N. (1989)** The use of muscle proteins solubility measurements to assess pig lean meat quality. *Meat Sci.*, **26**: 167-175.
- LORIENT D. (1984)** Les propriétés fonctionnelles : une expression ou un concept. *Sci. des Aliments*, **4**, hors-série : 232-243.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951)** Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- LUNDSTRÖM K., BJÄRSTORP G. and MALMFORS G. (1984)** Comparison of different methods for evaluation of pig meat quality. *Proc. Scient. Meeting Biophysical PSE-muscle Analysis*, Vienna, Paper D5: 311.



- LUNDSTRÖM K., RUNDGREN M., EDFORS-LILJA I., ESSEN-GUSTAVSSON B., NYBERG L. and GAHNE B. (1985) Effect of halothane genotype on immune response, muscle characteristics, meat quality and performance. A within-litter comparison. *36<sup>th</sup> E.A.A.P Meeting*, Kallithea, Greece, Paper MP5: 18.
- MA R.T.I. and ADDIS P.B. (1973) The association of struggle during exsanguination to glycolysis, protein solubility and shear in turkey pectoralis muscle. *J. Food Sci.*, **38**: 995-997.
- Mc BRIDE M. and PARRISH F.Jr. (1977) The 30000-dalton component of tender bovine longissimus muscle. *J. Food Sci.*, **42**, (6): 1627-1629.
- Mc CORMICK R.J, KROPF D.H., REECK G.R., HUNT M.C. and KASTNE C.E. (1987) Effects of heating temperature and muscle type on porcine muscle extracts as determined by RP.HPLC *J. Food Sci.*, **52**, (6): 1481-1485.
- Mc CORMICK R.J, KROPF D.H. and REECK G.R. (1988) Separation and identification of porcine sarcoplasmic proteins by reversed phase HPLC and polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Agri. Food Chem.*, **36**: 1193-1196.
- Mc DOUGALL D.B. and JONES S.J. (1975) *21<sup>st</sup> European Meeting Meat Research Workers, Berne*: 113-115.
- Mc LOUGHLIN J.V. (1963) In *Proc. 9<sup>th</sup> European Meeting Meat Research Workers, Budapest*, Paper n° 33.
- MAHONEY W.C. and HERMODSON M.A. (1980) Separation of large denatured peptides by RP-HPLC. *J. Biol. Chem.*, **255**, (23): 11199-11203.
- MARQUETANT R., MANFREDI J.P. and HOLMES E.W. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**: 1986.
- MARSH B.B., RINGKOB T.P., RUSSEL R.L., SWARTZ D.R. and PAGEL L.A. (1988) Mechanisms and strategies for improving meat tenderness. Reciprocal Meat Conference Proceedings of the AMSA (USA), **41**: 113-118
- MARUAYAMA K., KIMURA S., TOYOTA N. and OHASHI K.,(1980) Connectin, an elastin protein of muscle. In *Fibrous proteins : Sci. Ind. and Med. aspects.*(D. A. D. Parry and L.K. Creamer Eds), Academic Press, London: 33-41.
- MATSUDA T. and PODOLSKY R.J. (1986) Ordering of the myofilament lattice in muscle fibers. *J. Mol. Biol.*, **189**, (2): 361-365.
- MATSUKURA U., OKITANI A. , NISHIMURO T. and KATO M. (1981) Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. *Biochem. Biophys. Acta* , **662**: 41-47.
- MATSUMOTO T., OKITANI A., KITAMURA Y. and KATO H. (1983) Mode of degradation of myofibrillar proteins by rabbit muscle cathepsin D. *Biochem. Biophys. Acta*, **755**: 76-80.
- MAUGHAN D.W. and GODT R.E. (1981) Radial forces within muscle fibers in rigor. *J. Gen. Physiol.*, **77**, (1): 49-64.
- MEJENES-QUIJANO A.R. (1986) Contribution à l'étude des relations entre sensibilité à l'halothane , potentiel glycolytique musculaire et qualité technologique de la viande chez le porc. Thèse Docteur Ingénieur , Université de Clermont II, France: 95 p.



- MIRI A., TALMANT A., LAHUCKY R., RENO J.P. et MONIN G. (1988) Prédiction des changements biochimiques post-mortem dans le muscle de porc par l'étude d'une biopsie musculaire en RMN  $^{31}\text{P}$ . Dans *Réunion Commission chimie analytique en agroalimentaire* INRA.
- MIRI A., TALMANT A., RENO J.P. and MONIN G. (1992)  $^{31}\text{P}$  NMR study of post-mortem changes in pig muscle. *Meat Sci.*, **31**: 165-173.
- MONIN G. (1981) Causes d'obtention de deux types défectueux de viande de porc, les viandes exsudatives et les viandes à pH élevé. *Viandes et produits carnés*, **2**: (8).
- MONIN G. et LABORDE D. (1985) Capacité de rétention d'eau des protéines musculaires du porc: interaction des protéines myofibrillaires et des constituants du sarcoplasme. *Science des Aliments*, **5**: 341-345.
- MONIN G. et SELLIER P. (1985) Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: the case of Hampshire breed. *Meat Sci.*, **13**: 49-63.
- MONIN G., TALMANT A., LABORDE D., ZABARI M. and SELLIER P. (1986) Compositional and enzymatic characteristics of the LD muscle from Large-White, Pietrain halothane-negative et halothane-positive and Hampshire pigs. *Meat Sci.*, **16**: 307-316.
- MONIN G. et SELLIER P. (1987) Glycolytic potential, halothane sensibility and meat quality in various pig breeds. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, **38**: 447-458.
- MONIN G. (1988) Evolution post-mortem du tissu musculaire et conséquences sur les qualités de la viande de porc. *J.R.P.*, **20**: 201-214.
- MURACHI T., TANAKA K., KATANAKA M. and MURAKAMI. (1981) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  - dependent protease and its high molecular weight endogenous inhibitor. *Adv. Enzyme Regulation*, **19** : 407-424.
- NAVEAU J. (1986) Contribution à l'étude du déterminisme génétique de la qualité de la viande porcine. Héritabilité du rendement technologique NAPOLE. *J.R.P.*, **18**: 265-276.
- NEELIN J.M. and ROSE D. (1964) Progressive changes in starch gel electrophoresis patterns of chicken muscle protein during aging post-mortem. *J. Food Sci.*, **29**: 544.
- NEELIN J.M. and ECOBICHON D.J. (1966) Enzyme activities in pre-rigor and post-rigor sarcoplasmic extracts of chicken pectoral muscle. *Can. J. Biochem.*, **44**: 735.
- OFFER G. (1974) In *Comparison to biochemistry: Selected topics for further study*. (BULL A.T, LAGNADO J.R., THOMAS J.O. and TIPTON K.F. Eds) Longman Group Limited, London, Chapter 22.
- OFFER G. and TRINICK J. (1983) On the mechanism of water holding in meat : the swelling and shrinking of myofibrils, *Meat Sci.*, **8**: 245-281.
- OFFER G. (1984) *Meat Sci.*, **10**: 155.
- OFFER G. and KNIGHT (1988) The structural basis of water-holding in meat. Part 2: drip losses. In *Developments in Meat Science*, 4, ed. R.A.Lawrie Elsevier Science Publishers London : 173-206.
- OKAYAMA J., FUJII M. and YAMANOUE M. (1991) Effect of cooking temperature on the percentage colour formation, nitrite decomposition and sarcoplasmic protein denaturation in processed meat products. *Meat Science* , **30**: 49-57.



- OKITANI A., GOLL D.E., STROMER M.H. and ROBSON R.M. (1976) Intracellular inhibitor of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated protease involved in myofibrillar protein turn-over. *Federation Proc.*, **35**: 1746.
- OLIVER M.A., GISPERT M., TIBAU J. and DIESTRE A. (1991) The measurement of light scattering and electrical conductivity for the prediction of PSE pig meat at various time post-mortem. *Meat Sci.*, **29**: 141-151.
- OLLIVIER L., SELLIER P. et MONIN G. (1978) Fréquence du syndrome d'hyperthermie maligne dans des populations porcines françaises; relations avec le développement musculaires. *Ann. Genet. Sel. Anim.*, **10**: 191-208.
- OLSON D.G., PARRISH F.C. Jr. and STROMER M.H. (1976) Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during post-mortem storage. *J. Food Sci.*, **41**: 1036-1041.
- OLSON D.G. and PARRISH F.C. Jr. (1977) Relationship of myofibril fragmentation index to measures of beef tenderness. *J. Food Sci.*, **42**: (2): 506-509.
- O'MEARA G.M. and MUNGO P.A. (1985) Hydrolysis of the sarcoplasmic, myofibrillar and connective tissue proteins of lean beef meat by Alcalase and its relationship to whole meat hydrolysis. *Meat Sci.*, **12**: 91-103.
- ONISHI E.S.T, TAYLOR S. and GRONERT G.A. (1983) *FEBS letter*, **161**: 103.
- ONO K. (1971) Lysosomal enzyme activation and proteolysis of bovine muscle. *J. Food Sci.*, **36**, (5): 838-839.
- O'SHEA J.M., ROBSON R.M., HUIATT T.W., HARTZER M.K. and STROMER M.H. (1979) Purified desmin from adult mammalian skeletal muscle : a peptide mapping comparison with desmins from adult mammalian and avian smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **89**: 972-980
- OTSUKA Y. and GOLL D.E. (1980) Purification of the  $\text{Ca}^{2+}$  activated protease-inhibitor from bovine cardiac muscle. *Federation Proc.*, **39**: 2044.
- OUALI A. and VALIN C. (1976) *Proc. 22nd Eur. Meet. Meat Res. Workers*, Malmö, Sweden, **1**, B3.
- OUALI A. and VALIN C. (1980) Effect of muscle lysosomal enzymes and calcium activated neutral proteinase on myofibrillar ATPase activity: relationship with ageing changes. *Meat Sci.*, **5**: 233-245.
- OUALI A. (1990) Meat tenderization : possible causes and mechanisms. A review. *J. Muscle Foods*, **1**: 129-165.
- OYAMA V.J. and EAGLE S.G. (1956) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **91**: 305.
- PACE C.N. (1975) The stability of globular proteins. *Crit. Rev. Biochem.*, **3**: 1-43.
- PARRISH F.C., GOLL D.E, NEWCOMB W.J., de LUMEN B.O., CHAUDRY H.M. and KLINE E.A. (1969) Molecular properties of post-mortem muscle. 7. Changes in non-protein N and free amino acids of bovine muscle. *J Food Sci.*, **34**: 196-202.
- PARRISH F.C., SELVIG C.J., CULLER R.D., ZEECE M.G. (1981) CAF activity, calcium concentration, and the 30 000D component of tough and tender bovine longissimus muscle. *J. Food Sci.*, **46**: 308-311.



- PARSONS S.E. and PATTERSON R.L.S. (1986) Assessment of heat treatment given to meat products in the temperature range 40-90°C. *J. Food Technol.*, **21**: 117-122.
- PEARSON J.D., LIN N.T. and REGNIER F.E. (1982) The importance of silica type for reverse-phase protein separations. *Anal. Biochem.*, **124**: 217-230.
- PEARSON J.D. and REGNIER F.E. (1983) The influence of reversed-phase n-alkyl chain length on protein retention, resolution and recovering: implications for preparative HPLC. *J. Liquid Chrom.*, **6**, (3): 497-510.
- PENNY I.F. (1967) The influence of pH and temperature on the properties of myosin. *Biochem. J.*, **104**: 609-615.
- PENNY I.F. (1969) Protein denaturation and water-holding capacity in pork muscle. *J. Food Technol.*, **4**: 269-273.
- PENNY I.F. (1975) Use of centrifuging method to measure the drip of pork longissimus dorsi slices before and after freezing and thawing. *J. Sci. Food Agric.*, **26**: 1593.
- PENNY I.F. (1976) *J. Sci. Food Agric.*, **27**: 1147.
- PENNY I.F. (1977) The effect of temperature on the drip, denaturation and extracellular space of pork longissimus dorsi *J. Sci. Agric.*, **28**, (4): 329.
- PENNY I.F. (1980) The enzymology conditioning. *In : Developments in Meat Science-1*, (LAWRIE R., Ed), Applied Science, Publishers Ltd., London : 115-143.
- PFEIFFER H., HENNEBACH H., LENGERKEN G. von and ALBRECHT V. (1979) Possibilities of early information on pork quality by means of muscle biopsy. *Proceedings of the Eur. Meeting Meat Res. Workers*, **25**, 3-10: 147-152.
- POWELL V. H. (1978) *In Proc. 24<sup>th</sup> Europ. Meeting Meat Res. Workers, Germany* : Vol I, Paper DI.
- PRIVALOV P.L. (1979) Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **33**: 167-241.
- REGNIER F.E. and GOODING K.M. (1980) *Anal. Biochem.*, **103**: 1-25.
- RENOU J.P., MONIN G. and SELIER P. (1985) Resonance measurements on pork various qualities. *Meat Sci.*, **15**: 225-233.
- RIVETT A.J. (1989) The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **268**: 1.
- ROBERTS P.C.B and LAWRIE R.A. (1974) Effects on bovine longissimus dorsi muscle of conventional and microwave heating. *J. Food Technol.*, **9**: 345-356.
- ROBSON R.M., YAMAGUCHI M., HUIATT T.W., RICHARDSON F.L., O'SHEA J.M., HARTZER K.M., RATHBON W.E., SHREINER P.J., KASANG L.E., STROMER M.H., PANG S., EVANS R.R. and RIDPATH J.F. (1981) Biochemistry and molecular architecture of muscle cell 10nm filaments and Z-line. *Proc. Ann. Meat Conf.* **34**: 5.
- ROSSET et ROUSSEL-GIQUARD (1984) Les Viandes- Hygiène et technologie, **88-91**,(6): 120-131.



- SAMEJIMA K., WOLFE F.H.** (1976) Degradation of myofibrillar protein components during post mortem aging of chicken muscle. *J. Food Sci.* **41**: 250-254.
- SAVAGE A.W., WARRIS P.D. and JOLLEY P.D.** (1990) The amount and composition of the proteins in drip from stored pig meat. *Meat Sci.*, **27**: 289-303.
- SAVIC I., KARAN-DJURDJIC S.** (1955) The effect of heating on pH changes in meat. *Acta Vet. Yugoslavia*, **5**, (4): 21-31.
- SAYRE R.N. and BRISKEY E.J.** (1963) Protein solubility as influenced by physiological conditions in the muscle. *J. Food Sci.*, **28**: 675.
- SCHMITTEN F., SCHEPERS K.H. and FESTERLING A.** (1987) In *Evaluation and control of meat quality in pigs*. Martinus Nijhoff Publishers : 191-200.
- SCHNEIDER A., SCHWORER D. and BLUM J.** (1980) 31<sup>e</sup> réunion annuelle de la FEZ, Munich : GP 3-9.
- SCHWARTZ M.D.** (1973) Interferences in diagnostic biochemical procedures. In : *Advances in clinical chemistry*. (BODANSKY O. and LATNER A. Eds), Van NOSTRAND REINHOLD Co. NY 155.
- SCHWARTZ W.N and BIRD J.W.C.** (1977) Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D. *Biochem. J.*, **167**: 811-820.
- SCHWARTZ W.N and BARRETT A.J.** (1980) Human cathepsin H. *Biochem. J.*, **191**: 487-497.
- SCOPES R.K. and LAWRIE R.A.** (1963) Post-mortem lability of skeletal muscle proteins. *Nature*, **197** : 1202-1203.
- SCOPES R.K.** (1964) The influence of post-mortem conditions on the solubilities of muscle proteins. *Biochem. J.*, **91**: 201.
- SCOPES R.K.** (1965) Acid denaturation of creatine kinase. *Arch. Biochem. Biophys* , **110**: 320-324.
- SCOPES R.K.** (1971) Mecanisms controlling glycolysis in muscle. The biochemistry of post-mortem glycolysis. *17<sup>ème</sup> Congrès Europ. Chercheurs Viande*, Bristol, 14.
- SCOPES R.K.** (1982) Separation by precipitation, principles and practise. In *Protein purification*: Springer Advanced Texts in Chemistry (CANTOR C.R. Eds) (3): 64-65.
- SELLIER P., MONIN G., HOUIX Y. et DANDO P.** (1984) Qualité de la viande de 4 races porcines. Relations avec la sensibilité à l'halothane et l'activité créatine phosphokinase plasmatique. *J.R.P.*, **16**: 65-74.
- SELLIER P.** (1987) In : *Evaluation and control of Meat Quality in Pigs*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague: 329.
- SELLIER P., MEJENES-QUIJANO A. MARINOVA P., TALMANT A., JACQUET B. and MONIN G.** (1988) Meat quality as influenced by halothane sensitivity and pH<sub>U</sub> in three porcine breeds. *Livest. Prod. Sci.* **18**: 171-186.
- SHARP J.G.** (1963) Aseptic autolysis in rabbit and bovine muscle during storage at 37°C. *J. Sci. Food Agric.*, **14**: 468-479.
- SHERMAN P.** (1961) The water binding capacity of fresh pork. *Food Technol.* **15**: 90-94.



- SMITH P.K., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J. and KLENK D.C. (1985) Measurement of protein assay using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**: 76-85.
- SMITHARD R.R., SMITH W.C. and ELLIS M. (1980) A note on the fatty acid composition of backfat from boars in comparison with gilts and barrows. *Anim. Prod.*, **31**: 217-219.
- SORNAY J. (1981) Viandes bovines à pH élevé. *Filière Viande*, **30**: 21-22.
- SPANIER A.M., McMILLIN K.W. and MILLER J.A. (1990) Enzyme activity levels in beef : effect of post-mortem aging and endpoint cooking temperature. *J. Food Sci.*, **55**, (2): 318-322.
- STABURSVIK E., FRETHEIM K. and FROYSTEIN T. (1984) Myosin denaturation in pale soft and exsudative porcine muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *J.Sci. Food Agric.*, **35**: 240-244.
- STALDER J.W., SMITH G.L., KEETON J.T. and SMITH B.B (1991) Lactate deshydrogenase activity in bovine muscle as a means of determining heating endpoint. *J. Food Sci.*, **56**, (4): 895-898.
- STAUBER W.T. (1981) Lysosomes and skeletal muscle atrophy. In : *mechanism of muscle adaptation to fonctionnal requirements* , (GUBA F., MARECHAL G. and TOKACS O. Eds.) Pergamon Press, Inc., Elmsford, New-York. *Adv. Physiol. Sci.*, **24**: 171-177.
- STEPHAN P., CLARKE F.M., and MORTON D.J. (1986) The indirect binding of TPI to myofibrils to form a glycolytic enzyme mini-complex. *Biochim. Biophys. Acta* **873**: 127-135.
- SUZUKI A. and GOLL D.E. (1974) Quantitative assay for CASF and effect of CASF treatment on ATPase activity of rabbit myofibrils. *Agric. Biol. Chem*, **38**: 2167-2175.
- SUZUKI A. and CASSENS F.G. (1980) A histochemical study of myofiber types in muscle of the growing pig. *J. Anim. Sci.*, **51**, (6): 1449-1461.
- SUZUKI A., MATSU MOTO V., SATO T., NONAMI Y. and SAITO M. (1982) Ca<sup>2+</sup>-activated protease in striated muscle. *Meat Sci.*: 269-278.
- SWATLAND H.J. (1984) The structure and properties of meat. In *Structure and development of meat animals*. (PRENTICE HALL Ed. ), Englewood Cliffs. New-Jersey: 153-184.
- SYBESMA W. and EIKELENBOOM G. (1978) Methods of predicting pale, soft, exsudative pork and their application in breeding programmes: a review. *Meat Sci.*, **2**: 79-90.
- TAKAHASHI K. and SAITO H. (1979) Post mortem changes in skeletal muscle connection. *J. Biochem.* **85**:1539-1542.
- TANFORD D.C. (1970) Protein denaturation. *Adv Protein Chem.*, **24**: 1-95.
- TANZER M.L. and GILVARG C. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**: 3201.
- TOSTE A.P. (1980) High performance liquid chromatography of myosin's subfragment 1 and light chains on Spherogel TSK-type columns. *J. Chromatography*, **197**: 207.
- TOWNSEND W.E., THOMSON J.E. and HUTCHIN J.R. (1984) Coagulation test for cooked meat temperature : effect of variations in filtration. *J. Food Sci.*, **49**: 853-858.



- TRAUTMAN J.C.** (1966) Effect of temperature and pH on the soluble proteins of ham. *J. Food Sci.*, **31**: 409.
- TROUT G.R.** (1988) Techniques for measuring water binding capacity in muscle foods. *Meat Sci.*, **23**: 235-252.
- TROUT G.R.** (1989) Variation in myoglobin denaturation and color of cooked beef, pork and turkey meat as influenced by pH, NaCl, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and cooking temperature. *J. Food Sci.*, **54**, (3): 536-540.
- USDA** (1981) Chemistry Laboratory Guide Book. Part 1. Food safety and quality. Division Coagulation Method 3. 012. MPI. Reg. Manual: 18-46.
- VALIN C.** (1982) Evolution post-mortem du tissu musculaire : la maturation. *Dans : Hygiène et technologie de la viande fraîche*. Ed CNRS : 93-98
- WALKER M. and TRINICK A.** (1986) Electron microscope study of the effect of temperature on the length of the tail of the myosin molecule. *J. Mol. Biol.*, **192**, (3): 661-667.
- WALLIMANN T., TURNER D.C. and EPPENBERGER H.M.** (1977) Localisation of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. I. Chicken skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, **75**, (2): 297-317.
- WALSH T.P., CLARKE F.M. and MASTERS C.J.** (1977) Modification of the kinetic parameters of aldolase on binding to the actin-containing filaments of skeletal muscle. *Biochem. J.*, **165**: 165-167.
- WALSH T.P., WINZOR D.J., CLARKE F.M., MASTERS C.J. and MORTON D.J.** (1980) Binding of aldolase to actin-containing filaments. Evidence of interaction with the regulatory proteins of the skeletal muscle. *Biochem. J.*, **186**, (1): 89-98.
- WALZTHÖNY T., EPPENBERGER H.M., HARRINGTON W.F. and WALLIMANN T.** (1986) Melting of myosin rod as revealed by electron microscopy. II. Effects of temperature and pH on length and stability of myosin rod and its fragments. *Eur. J. Cell. Biol.*, **41**, (1): 38-43.
- WANG K., Mc CLURE J. and TU A.** (1979) Titin: major myofibrillar component of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**: 2698-3702.
- WAXMAN L.** (1978) Characterization of two unique protease inhibitors and a calcium-activated neutral protease from bovine cardiac muscle. *In : Protein turnover and lysosome function*. (SEGAL H.L. and DOYLE D.J. Eds) Academic Press, Inc., New-York : 363-377.
- WHITAKER J.R., MONTGOMERY M.W., HOPPER P., LANDMANN W., MULLINS A. and TRAUTMAN J.C.** (1970) *In The physiology and biochemistry of muscle as a food*. University of Wisconsin Press, vol.2: 47-497.
- WIECHELMAN K., BRAUN R. and FITZPATRICK J.** (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, **175**: 231-237.
- WIERBICKI E. and DEATHERAGE F.F.** (1958) Determination of water-holding capacity in fresh meats. *J. Agr. Food Chem.*, **6**: 387-392.
- WINGER R. and FENNEMA O.** (1976) Tenderness and water-holding properties of beef muscle as influenced by freezing and subsequent storage at 3 or 15 °C. *J. Food Sci.*, **41**, (6): 1433-1438.



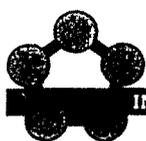
- WISMER-PEDERSEN J.** (1959) Quality of pork in relation to rate of pH change post-mortem. *Food Res.*, **24**: 711-727.
- WISMER-PEDERSEN J. and BRISKEY E.J.** (1961) Rate of anaerobic glycolysis versus structure in pork muscle. *Nature*, **189**: 318.
- WRIGHT D.J., LEACH I.B. and WILDING P.** (1977) Differential scanning calorimetric study of muscle and its constituent proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **28**: 557-564.
- XIONG Y.L. and ANGLEMIER A.F.** (1989) Gel electrophoretic analysis of protein changes in ground beef stored at 2°C. *J. Food. Sci.*, **54**, (2): 287-290.
- YOUNG O.A, GRAAFHUIS A.E. and DAVEY C.L.** (1981) Post mortem changes in cytoskeletal proteins of muscle. *Meat Sci.*, **5**: 41-55.
- ZEECE M.G., KATOH K., ROBSON R.M. and PARRISH F.C.** (1986a) Effect of cathepsin D on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *J. Food Sci.*, **51**: 769-773.
- ZEECE M.G., ROBSON R.M., LUSBY M.L. and PARRISH F.C.** (1986b) Effect of calcium activated protease (CAF) on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *J. Food Sci.*, **51**: 797-803.
- ZERT P. and POLACK D.** (1982) La qualité de la viande de porc. *Paris ITP*, série V82.











**INPLI**  
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE  
LORRAINE**

o o o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur ADRIAN Jean, Professeur, Conservatoire National Arts & Métiers Paris**

**Monsieur ASSOUMANI, Directeur de Recherches, Société Sanders Athis Mons.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Mademoiselle TOURATIER Christine**

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

**"Comportement des protéines sarcoplasmiques de la viande de porc au cours du stockage et du chauffage. Relations avec la qualité de la viande"**

en vue de l'obtention du titre de :

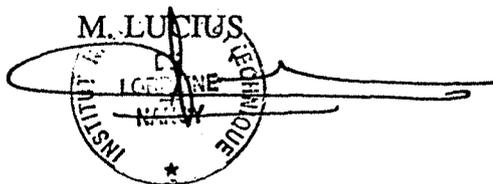
**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

**Spécialité : "BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, 1<sup>o</sup> Décembre 1992

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS





# RESUME

La sélection pratiquée en France ces vingt dernières années a favorisé la production de porcs bien conformés et à faible couverture de gras. Parallèlement, la qualité de la viande s'est notablement dégradée. Pour maîtriser cette évolution de la qualité, il est nécessaire de pouvoir intégrer au schéma de sélection un critère prédictif de la qualité de la viande. Le présent travail a pour objectif de mettre au point ce prédicteur.

Nos recherches ont porté sur les protéines sarcoplasmiques du longissimus dorsi de porc. Une technique d'étude a été mise au point : extraction des protéines à l'eau, dosage par la méthode BCA, séparation et identification par chromatographie à polarité de phase inversée.

Il existe des différences significatives de concentration en protéines sarcoplasmiques de viande maturée (48h p.m) de qualités différentes : 33,5 mg/g de muscle pour les viandes normales, 24,8 mg/g pour les viandes exsudatives, 28,7 mg/g pour les viandes acides et 38,6 mg/g pour les viandes DFD.

Sur 72 porcs, la concentration en protéines sarcoplasmiques présente des corrélations intéressantes avec certains critères de qualité de viande: + 0,71 avec le pH<sub>1</sub>; + 0,77 avec le pH<sub>u</sub> et - 0,85 avec le pouvoir de rétention d'eau.

L'évolution comparée de la teneur en protéines sarcoplasmiques de viandes normales et de viandes exsudatives entre 4h et 168h p.m de stockage à 4°C montre que:

- 1) les protéines sont insolubilisées progressivement, et de façon plus marquée pour les viandes exsudatives (39,3% d'insolubilisation pour les viandes exsudatives contre 25,7% pour les viandes normales)
- 2) par extrapolation des résultats obtenus sur 4-168h p.m, ces différences ne semblent pas exister in vivo
- 3) il apparaît que les conditions de pH et de température dans les premières heures après l'abattage conditionnent en grande partie la qualité de la viande
- 4) la CPK, la PHb et la TPI sont les protéines les plus fragilisées par la condition PSE. A 48h p.m, la CPK présente une concentration de 5,2 mg/g pour les viandes normales, la PHb 1,5 et la TPI 1,0 contre 1,4; 0,1 et 0,2 mg/g pour les viandes exsudatives.

Le chauffage provoque l'insolubilisation progressive des protéines sarcoplasmiques ainsi que l'augmentation du pH. Le chauffage accentue les différences observées au cours du stockage. Les 50% de dénaturation sont obtenus à 58,9°C pour les viandes normales, 51,4°C pour les viandes exsudatives, à 56,0°C pour les viandes acides et 62,0°C pour les viandes DFD. Quelle que soit la qualité de la viande, la CPK est la protéine la plus thermosensible suivie de la PHb et de la TPI. Il apparaît que l'insolubilisation des protéines induit parallèlement l'inactivation enzymatique.

Un test prédictif de la qualité de la viande pourrait consister à "maturer" un échantillon de viande prélevé par biopsie, en le soumettant à un traitement thermique approprié, puis à apprécier l'insolubilisation protéique ou l'inactivation thermique en résultant - l'amplitude de cette dénaturation étant liée à la qualité ultime de la viande.

**Mots Clés :** Protéines sarcoplasmiques  
Qualité de la viande  
Porc  
HPLC  
Stockage  
Chauffage