

Ions, peptides et protéolyse post mortem dans le muscle strié

Cyril Feidt

▶ **To cite this version:**

Cyril Feidt. Ions, peptides et protéolyse post mortem dans le muscle strié. Agronomie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1996. Français. NNT : 1996INPL152N . tel-01776342

HAL Id: tel-01776342
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776342

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

13600 91961

96INPL152N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

E.N.S.A.I.A.

LABORATOIRE DE SCIENCES ANIMALES

[M] 1996 FEIDT, C.

IONS, PEPTIDES ET PROTEOLYSE *POST MORTEM* DANS LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

Thèse soutenue le 12 décembre 1996 par **Cyril FEIDT**

en vue de l'obtention du Doctorat de l'I.N.P.L.

Composition du jury :

Président : **B. VIGNON**

Rapporteurs : **D. DEMEYER**

E. DRANSFIELD

Examinateur : **J. BRUN-BELLUT**

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Avant-propos

Si la thèse est amenée à être défendue par une seule personne, elle demeure un travail collectif. Je voudrais exprimer ici ma gratitude à tous ceux m'ont permis de l'élaborer.

Je tiens à remercier M. Laurent qui m'a accueilli dans son laboratoire.

Que Messieurs les professeurs Brun-Bellut, Demeyer, Dransfield et Vignon soient remerciés pour l'attention qu'ils ont portée à l'appréciation de ce travail. Ma reconnaissance s'adresse également à M. Demeyer et M. Ouali qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire et permis de réaliser des expériences que sans leur aide je n'aurais pu mener à bien.

Merci à M. Claeys et M. Dransfield de ne pas avoir étouffé mes candides théories sous le poids d'une expérience et d'un savoir didactiques. Si l'approche bibliographique m'a enrichi, la confrontation avec leurs connaissances a modelé ce savoir et lui a permis de prendre forme.

Claire, Christine, Etienne, Mme Laurent peuvent trouver ici ma reconnaissance car ils ont su s'investir dans l'avancement de mon travail, parfois au delà de ce qu'exige d'eux leur fonction, avec une bonne humeur jamais altérée.

Merci à Jean-Noël, Stefan et Yves qui m'ont fait pénétrer dans le sas très fermé de la statistique, à M. Blanchard qui a toujours su me suggérer deux questions quand je lui en soumettais une, à M. Vignon qui pendant deux années m'a encouragé à rédiger sans jamais faiblir, à toutes les autres personnes du laboratoire qui sans participer directement à ce travail m'ont permis de m'épanouir.

Merci à tous mes petits camarades d'école qui ont été si gentils avec moi.

Quant à ma grand-mère, mon regretté grand-père, ma mère et Delphine, c'est à la source de leur amour, toujours prodigué sans retenue, que j'ai puisé l'envie.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	: acide aminé
ADP	: adénosine 5 diphosphate
AMP	: adénosine 5 monophosphate
ATP	: adénosine 5 triphosphate
ALA	: alanine
ANP	: azote non protéique
ASN	: asparagine
ASP	: acide aspartique
Ca	: calcium
Cl	: chlore
CPG	: chromatographie en phase gazeuse
CYS	: cystéine
kDa	: kiloDalton
DA	: droit antérieur ou *triceps brachii caput longum*
DG	: diaphragme ou *diaphragma*
DO	: densité optique
°C	: degré Celsius
ETR	: écart type résiduel
FFPN	: française frisonne pie noire
g	: gramme
GA	: gros anconé ou *rectus femoris*
GMQ	: gain moyen quotidien
GLN	: glutamine
GLU	: acide glutamique
GLY	: glycine
h	: heure
HIS	: histidine
HPLC	: high performance liquid chromatography
HYPRO	: hydroxyproline
IFM	: indice de fragmentation mypfibrillaire
ILE	: isoleucine
Jx	: jour x après la mort, JO étant le jour de l'abattage
kg	: kilogramme
l	: litre
LD	: long dorsal ou *longissimus dorsi*
ln	: logarithme népérien
log	: logarithme décimal
LEU	: leucine
LYS	: lysine
m	: masse
μ	: force ionique
MCP	: complexe multicatalytique
MET	: méthionine

MF : matière fraîche ou muscle frais
MHC : myosin heavy chain
Mg : magnésium
min : minute
MLC : myosin light chain
µM : micromolaire
µmol : micromole
mM : millimolaire
mmol : millimole
MMP : matrix métalloprotéinase
mOs : milliosmole
Na : sodium
NS : non stimulé (lapin)
NT : non traité à l'adrénaline (chevreau)
p : probabilité
Π : pression osmotique
pCA : acide perchlorique
pH : potentiel hydrogène
PHE : phénylalanine
pHu : pH ultime
PM : poids moléculaire
PO_4 : phosphate
ppm : part par million
PRO : proline
% : pourcent
r : coefficient de corrélation
RF : *rectus femoris* ou gros anconé
σ : écart type
S : stimulé (lapin)
SDS : sodium dodécyl sulfate
SER : sérine
SM : semi-membraneux ou *semimembranosus*
T : traité à l'adrénaline (chevreau)
TB : *triceps brachii* ou droit antérieur
THR : thréonine
TYR : tyrosine
UF : ultrafiltration
v : volume
VAl : valine

SOMMAIRE

Pages

RECAPITULATIF DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES 9

INTRODUCTION 14

1-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1-1 Le muscle strié squelettique à l'origine de la viande

1-1-1 Une trame protéique apte à résister à de fortes tensions 15

1-1-2 Composition et structure protéique de la cellule musculaire striée 15
1-1-2-1 Les protéines myofibrillaires 15
1-1-2-2 Le tissu conjonctif 16
1-1-2-2-1 Composition et répartition des collagènes 17
1-1-2-2-2 Structure du collagène 17
1-1-2-2-3 Répartition des collagènes 18
1-1-2-2-4 Fonction et rôle dans la texture de la viande 18
1-1-2-3 Les protéines sarcoplasmiques 19

1-1-3 Les enzymes protéolytiques de la cellule musculaire striée : un potentiel d'autodestruction 19
1-1-3-1 Les protéases acides ou cathepsines 20
1-1-3-1-1 Les endopeptidases 21
1-1-3-1-2 Les exopeptidases 21
1-1-3-2 Les protéases neutres 21
1-1-3-2-1 Les calpaïnes 21
1-1-3-2-2 Les métalloprotéinases 21
1-1-3-2-3 Les aminopeptidases 23
1-1-3-2-4 Les dipeptidases 23
1-1-3-3 Les protéases alcalines 23
1-1-3-3-1 Le complexe multicatalytique 23
1-1-3-3-2 Les sérine protéases 23

1-1-3-4 Les protéases ATPdépendantes 23
1-1-3-5 Les inhibiteurs des enzymes protéolytiques 24

1-2 Le métabolisme énergétique *post mortem* et ses conséquences sur le milieu physico-chimique

1-2-1 Le métabolisme énergétique *post mortem* 26
1-2-1-1 L'établissement de la *rigor mortis* 26
1-2-1-2 Les facteurs affectant le déroulement de la *rigor mortis* 27
1-2-1-2-1 Le type de muscle 27
1-2-1-2-2 Facteurs *ante mortem* 27
1-2-1-2-3 Facteurs *post mortem* 27
1-2-1-2-3-1 La stimulation électrique 27
1-2-1-2-3-2 La température 28

1-2-2 Composition minérale du muscle strié et variabilité 28
1-2-2-1 Teneur totale en minéraux 28
1-2-2-2 Facteurs de variation 29
1-2-2-2-1 Alimentation 29
1-2-2-2-2 Age et sexe 29
1-2-2-2-3 Type de muscle 30
1-2-2-2-4 Animal 30
1-2-2-3 Des minéraux ionisés liés aux protéines 30

1-2-3 Libération des ions 31
1-2-3-1 Cinétique de libération des ions pendant l'installation de la *rigor mortis* 31
1-2-3-2 Méthodes d'approche 32

1-3 La protéolyse *post mortem*

1-3-1 L'action des enzymes sur les protéines musculaires à rôle structural 34
1-3-1-1 Dégradation des myofibrilles 34
1-3-1-1-1 Le complexe multicatalytique 34
1-3-1-1-2 Les calpaïnes 34
1-3-1-1-3 Les cathepsines 36

1-3-1-2 Dégradation du tissu conjonctif 37
1-3-1-2-1 Dégradation du collagène 37
1-3-1-2-2 Dégradation des protéoglycans 38

1-3-2 La libération des ions et ses conséquences 39
1-3-2-1 Effet sur la force ionique 39
1-3-2-1-1 Augmentation de la force ionique 39
1-3-2-1-2 Interactions entre force ionique et protéines 40
1-3-2-2 Activations d'enzymes 41
1-3-2-2-1 Activateurs de la glycolyse 41
1-3-2-2-2 Activateurs de la protéolyse 41
1-3-2-3 Libération des produits de la protéolyse 43
1-3-2-3-1 Acides aminés libres et pouvoir tampon 43
1-3-2-3-2 Réactions de Maillard 44

1-3-3 Les facteurs de variation de la protéolyse 44
1-3-3-1 Effets des conditions de stockage 44
1-3-3-2 La chute du pH *post mortem* 45
1-3-3-2-1 Effet de la vitesse de chute du pH 45
1-3-3-2-2 Effet du pHu 46
1-3-3-3 Effets du type de muscle 46
1-3-3-3-1 Intensité de la protéolyse 46
1-3-3-3-2 Variabilité des produits terminaux de la protéolyse 47
1-3-3-4 Effets de facteurs d'élevage 47

2-MATERIEL ET METHODES

2-1 Description des protocoles expérimentaux

2-1-1 Déclenchement précoce de la glycolyse, libération des ions et protéolyse
2-1-1-1 Objectifs 49
2-1-1-2 Animaux et procédé d'abattage 49
2-1-1-2-1 Expérience 1 : lapins 49
2-1-1-2-1-1 Animaux 49
2-1-1-2-1-2 Abattage 50
2-1-1-2-1-3 Refroidissement 50
2-1-1-2-2 Expérience 2 50
2-1-1-2-2-1 Animaux 50
2-1-1-2-2-1-1 Expérience 2a : effet de la cinétique de refroidissement sur la libération des ions 50
2-1-1-2-2-1-2 Expérience 2b : effet du pH ultime sur la libération des ions 51
2-1-1-2-2-2 Abattage 51
2-1-1-2-2-3 Refroidissement 51
2-1-1-2-2-3-1 Expérience 2a 51
2-1-1-2-2-3-2 Expérience 2b 51
2-1-1-3 Mesures effectuées 51
2-1-1-3-1 Expérience 1 : Lapins 51
2-1-1-3-2 Expérience 2 : Chevreaux 52
2-1-1-3-2-1 Expérience 2a 52
2-1-1-3-2-2 Expérience 2b 52
2-1-1-4 Analyse statistique 52
2-1-1-4-1 Expérience 1 : lapins 52
2-1-1-4-2 Expérience 2 : chevreaux 52
2-1-1-4-2-1 Expérience 2a : Effet de la cinétique de refroidissement 52
2-1-1-4-2-2 Expérience 2b : Effet du pH ultime 52

2-1-2 Evolution des acides aminés libres, mise en relation avec d'autres indicateurs biochimiques de protéolyse 53
2-1-2-1 Objectifs 53
2-1-2-2 Animaux 53
2-1-2-2-1 Expérience 3 53
2-1-2-2-2 Expérience 4 53
2-1-2-3 Mesures effectuées 53

2-1-2-3-1 Expérience 3 53
2-1-2-3-2 Expérience 4 53
2-1-2-4 Analyse statistique 54
2-1-2-4-1 Expérience 3 : effet temps 54
2-1-2-4-2 Expérience 4 : interaction temps*muscle 54

2-1-3 Evolution de la fraction peptidique 54
2-1-3-1 Objectifs 54
2-1-3-2 Animaux 54
2-1-3-3 Mesures effectuées 54
2-1-3-4 Analyse statistique 55

2-1-4 Etude de l'interaction peptides-calpaïnes 55
2-1-4-1 Objectifs 55
2-1-4-2 Protocoles 56
2-1-4-2-1 Action *in vitro* de la µcalpaïne bovine sur un isolat peptidique 56
2-1-4-2-2 Interaction entre isolat peptidique et activité protéolytique *in vitro* 56
2-1-4-2-3 Tampons utilisés 57

2-1-5 Etude de l'interaction entre le magnésium libre et le couple calcium-calpaïne 57
2-1-5-1 Objectifs 57
2-1-5-2 Protocole 57

2-2 Méthodes de dosage

2-2-1 Mise au point d'une méthode de dosage des minéraux libres 58
2-2-1-1 Mise au point de la méthode d'extraction des minéraux libres 58
2-2-1-2 Description de la méthode retenue 60
2-2-1-3 Dosage des anions 60
2-2-1-4 Dosage des cations 60

2-2-2 Mise au point d'une méthode de caractérisation du poids moléculaire de la fraction peptidique 61
2-2-2-1 Extraction 61
2-2-2-2 Analyse par Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance 61
2-2-2-3 Intégration des chromatogrammes 62

2-2-3 Autres méthodes de dosage utilisées 63
2-2-3-1 Etude de la composition biochimique et de la cinétique de chute du pH de la viande 63
2-2-3-1-1 Etude de la cinétique de chute du pH 63
2-2-3-1-2 Dosage de la teneur en azote total 63
2-2-3-1-3 Dosage de la teneur en lipides totaux 63
2-2-3-1-4 Dosage de la teneur en minéraux totaux 63
2-2-3-1-5 Dosage de la teneur en collagène total 64

2-2-3-2 Estimation de la protéolyse 64
2-2-3-2-1 Quantification de la fraction azotée non protéique 64
2-2-3-2-1-1 Extraction de l'azote non protéique 64
2-2-3-2-1-2 Dosage de l'azote de la fraction non protéique 65
2-2-3-2-2 Suivi de la dégradation des protéines myofibrillaires 65
2-2-3-2-2-1 Extraction des protéines myofibrillaires 65
2-2-3-2-2-2 Electrophorèse 65
2-2-3-2-2-3 Détermination de l'indice de fragmentation myofibrillaire 66
2-2-3-2-3 Caractérisation des acides aminés libres 66
2-2-3-2-3-1 Extraction 66
2-2-3-2-3-2 Dérivation 66
2-2-3-2-3-3 Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse 67
2-2-3-2-3-4 Intégration des chromatogrammes 68

3-RESULTATS-DISCUSSION

3-1 Evolution des teneurs en minéraux libres du muscle lors de l'établissement de la *rigor mortis*

3-1-1 Des concentrations en minéraux libres qui évoluent lors de l'installation de la *rigor mortis* et semblent liées au pH 68

3-1-1-1 Expérience 1 : lapins 68

3-1-1-2 Expérience 2 : chevreaux 70

3-1-1-2-1 Composition chimique 70

3-1-1-2-2 Evolution *post mortem* de la libération des ions 70

3-1-1-2-3 Effet de la cinétique de refroidissement sur la libération des ions 72

3-1-1-2-4 Effet du pH_u sur la libération des ions 73

3-1-1-2-5 Variations liées à l'espèce du pourcentage d'ions libérés 74

3-1-2 Lien avec la composition chimique de la viande 75

3-1-2-1 Expérience 1 : lapins 75

3-1-2-2 Expérience 2a : chevreaux 75

3-2 Etude des produits de faible poids moléculaire issus de la protéolyse

3-2-1 Acides aminés libres 76

3-2-1-1 Effet du stockage (3 et 10 jours) dans le *Longissimus dorsi* 76

3-2-1-2 Effet temps et muscle entre 3 et 14 jours sur *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* et *Semimembranosus* 78

3-2-1-3 Teneur en hydroxyproline libre chez le chevreau 82

3-2-2 Fraction peptidique 83

3-2-2-1 Evolution quantitative de la fraction peptidique 83

3-2-2-2 Evolution du profil des classes de poids moléculaire des peptides 84

3-2-2-2 Relations entre l'évolution des peptides et la dégradation des protéines myofibrillaires 87

3-2-3 Interactions entre produits de la protéolyse et enzymes protéolytiques 88

3-2-3-1 Les peptides : des substrats pour la µcalpaïne bovine 88

3-2-3-2 Les peptides : inhibiteurs de l'activité de la µcalpaïne 89

3-3 Etude des relations entre minéraux libres et protéolyse

3-3-1 Expérience 1 : lapins 91

3-3-2 Relations entre minéraux libres et protéolyse chez le chevreau 92

3-3-3 Effet du magnésium libre sur l'interaction calcium-calpaïne 94

CONCLUSION 97

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 101

RECAPITULATIF DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

Page

1-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 14

Figure 1-1-1-**1** : Schéma de l'ultrastructure musculaire 1
Figure 1-1-3-**1** : Schéma de régulation de l'activité de la µcalpaïne 25

Tableau 1-1-2-**1** : Les protéines myofibrillaires 15
Tableau 1-1-3-**1** : Les grandes familles d'enzymes protéolytiques de la viande 20
Tableau 1-1-3-**2** : Les principales cathepsines lysosomales 20
Tableau 1-1-3-**3** : Les différentes collagénases connues 22
Tableau 1-1-3-**4** : Principaux inhibiteurs des protéases du tissu musculaire 24
Tableau 1-2-1-**1** : Les différents types de fibres musculaires 27
Tableau 1-2-2-**1** : Teneurs en minéraux de 2 muscles de caprins 28
Tableau 1-2-2-**2** : Composition moyenne en minéraux obtenue sur muscles issus de 18 jeunes bovins 29
Tableau 1-2-3-**1** : Concentrations en calcium du réticulum sarcoplasmique d'un homogénat de porc Landrace 32
Tableau 1-2-3-**2** : Répartition du sodium dans le muscle *Sartorius* de grenouille 32
Tableau 1-3-1-**1** : Protéines dégradées par les enzymes présentes dans la viande 35
Tableau 1-3-2-**1** : Principaux métabolites libérés lors de l'installation de la *rigor mortis* et leurs actions respectives 42
Tableau 1-3-2-**2** : Principaux composés ioniques non métaboliques libérés lors de l'établissement de la *rigor mortis* et leurs actions respectives 43

2 MATERIEL ET METHODES

Figure 2-1-4-**1** : Profil de PM de l'extrait peptidique utilisé avec la µcalpaïne 55
Figure 2-1-4-**2** : Recherche du volume optimal d'extrait de calpaïne à utiliser 55
Figure 2-1-4-**3** : Comparaison de la répartition des PM de l'extrait de calpaïne avant et après précipitation au pCA 56
Figure 2-1-4-**4** : Comparaison des classes de PM de l'extrait de calpaïne avant et après incubation 56
Figure 2-2-1-**1** : Courbe étalon du chlore 60
Figure 2-2-1-**2** : Courbe étalon du phosphate 60
Figure 2-2-1-**3** : Courbe étalon du lactate 60

Figure 2-2-1-**4** : Courbe étalon du magnésium 61
Figure 2-2-1-**5** : Courbe étalon du potassium 61
Figure 2-2-1-**6** : Courbe étalon du sodium 61
Figure 2-2-2-**1** : Courbe d'étalonnage de la colonne : PM=f(temps d'élution) 62

Tableau 2-1-1-**1** : Caractéristique des carcasses de lapins 49
Tableau 2-1-1-**2** : Composition chimique du *Longissimus dorsi* 50
Tableau 2-1-3-**1** : Comparaison des pH ultimes de chevreaux stressés ou non 54
Tableau 2-2-1-**1** : Effets du temps et du facteur de dilution sur la quantité d'ions extraits 58
Tableau 2-2-1-**2** : Relation entre pH du muscle et pH de la solution d'extraction 59

3-RESULTATS-DISCUSSION

Figure 3-1-1-**1** : Evolution du chlore libre chez le lapin 69
Figure 3-1-1-**2** : Evolution du lactate libre chez le lapin 69
Figure 3-1-1-**3** : Evolution du phosphate libre chez le lapin 69
Figure 3-1-1-**4** : Evolution du potassium libre chez le lapin 69
Figure 3-1-1-**5** : Evolution du magnésium libre chez le lapin 69
Figure 3-1-1-**6** : Evolution des minéraux libres en fonction du pH chez le lapin 70
Figure 3-1-1-**7** : Evolution des métabolites en fonction du pH chez le lapin 70
Figure 3-1-1-**8** : Effet de la température sur l'évolution du potassium libre 71
Figure 3-1-1-**9** : Effet de la température sur l'évolution du magnésium libre 71
Figure 3-1-1-**10** : Evolution des températures des demi-carcasses de chevreaux par traitement 71
Figure 3-1-1-**11** : Effet de la température sur l'évolution du chlore libre 71
Figure 3-1-1-**12** : Effet de la température sur l'évolution du phosphate libre 71
Figure 3-1-1-**13** : Effet de la température sur l'évolution du lactate libre 71
Figure 3-1-1-**14** : Evolution de la teneur en phosphate libre chez le chevreau 73
Figure 3-1-1-**15** : Evolution de la teneur en lactate libre 73
Figure 3-1-1-**16** : Evolution de la teneur en chlore libre 73
Figure 3-1-1-**17** : Evolution de la teneur en magnésium libre 74
Figure 3-1-1-**18** : Evolution de la teneur en potassium libre 74
Figure 3-1-1-**19** : Evolution de la teneur en sodium libre 74
Figure 3-1-1-**20** : Evolution du pourcentage de magnésium et de potassium relâchés chez le lapin et chez le chevreau 75
Figure 3-2-1-**1** : Evolution de l'alanine 78
Figure 3-2-1-**2** : Evolution de la glycine 78

Figure 3-2-1-**3** : Evolution de la valine 78
Figure 3-2-1-**4** : Evolution de la leucine 78
Figure 3-2-1-**5** : Evolution de l'isoleucine 78
Figure 3-2-1-**6** : Evolution de la proline 78
Figure 3-2-1-**7** : Evolution de la thréonine 78
Figure 3-2-1-**8** : Evolution de la sérine 78
Figure 3-2-1-**9** : Evolution du glutamate 79
Figure 3-2-1-**10** : Evolution de l'asparagine 79
Figure 3-2-1-**11** : Evolution de l'aspartate 79
Figure 3-2-1-**12** : Evolution de la méthionine 79
Figure 3-2-1-**13** : Evolution de l'hydroxyproline 79
Figure 3-2-1-**14** : Evolution de la lysine 79
Figure 3-2-1-**15** : Evolution de l'histidine 79
Figure 3-2-2-**1** : Evolution quantitative de l'extrait peptidique au cours du temps en fonction du muscle et du pH 83
Figure 3-2-2-**2** : Evolution de la part relative des différentes classes de PM 84
Figure 3-2-3-**1** : Effet d'une incubation de 90 mn avec la µcalpaïne sur un isolat peptidique 88
Figure 3-2-3-**2** : Effet d'une concentration croissante de peptides sur l'activité de la µcalpaïne 89
Figure 3-2-3-**3** : Effets comparés de l'isolat peptidique, de la BSA et de l'insuline en fonction de leur concentration massique sur l'activité de la µcalpaïne 90
Figure 3-2-3-**4** : Effets comparés de l'isolat peptidique, de la BSA et de l'insuline en fonction de leur molarité sur l'activité de la µcalpaïne 90
Figure 3-2-3-**5** : Effets comparés de l'isolat peptidique ramené à sa part dégradée, de la BSA et de l'insuline en fonction de leur molarité sur l'activité de la µcalpaïne 90
Figure 3-3-3-**1** : Effet du magnésium sur l'activité de la µcalpaïne 94
Figure 3-3-3-**2** : Courbe d'activation de la µcalpaïne par le calcium 94
Figure 3-3-3-**3** : Effet d'un apport de magnésium sur l'activité de la µcalpaïne en présence d'une concentration de calcium subactrivatrice 94

Tableau 3-1-1-**1** : Evolution du pH *post mortem* des lapins utilisés 68
Tableau 3-1-1-**2** : Paramètres de vitesse de libération des ions 69
Tableau 3-1-1-**3** : Composition chimique des muscles de chevreaux utilisés 70
Tableau 3-1-1-**4** : Evolution de la teneur en ions entre 1 h et 24 h *post mortem* chez le chevreau 71

Tableau 3-1-1-**5** : Augmentation relative des minéraux libres entre 1 h et 24 h *post mortem* chez le chevreau 72
Tableau 3-1-1-**6** : Effet de la cinétique de refroidissement sur la quantité d'ions libérés à 4 et 24 h *post mortem* chez le chevreau 72
Tableau 3-1-1-**7** : Effet du traitement à l'adrénaline *ante mortem* sur la libération des ions 74
Tableau 3-1-2-**1** : Coefficients de corrélation entre concentrations en ions et composition chimique chez le lapin 75
Tableau 3-1-2-**2** : Coefficients de corrélation entre concentrations en ions et composition chimique chez le chevreau 76
Tableau 3-2-1-**1** : Effet du temps de stockage sur les concentrations en acides aminés libres dans le *Longissimus dorsi* de taurillons 76
Tableau 3-2-1-**2** : Coefficients de corrélation entre acides aminés libres et paramètres de carcasse 77
Tableau 3-2-1-**3** : Coefficients de corrélation entre concentrations en acides aminés libres, valeurs d'IFM et temps de stockage 78
Tableau 3-2-1-**4** : Effets des facteurs étudiés sur la concentration des acides aminés libres 79
Tableau 3-2-1-**5** : Teneurs en hydroxyproline libre et part relative rapportée au collagène total dans les trois muscles de bovin étudiés 80
Tableau 3-2-1-**6** : Part du collagène total dégradé 82
Tableau 3-2-1-**7** : Evolution de l'hydroxyproline libre au cours du stockage dans le LD de chevreau 82
Tableau 3-2-2-**1** : Effet des facteurs étudiés sur la quantité d'azote de l'extrait peptidique 83
Tableau 3-2-2-**2** : Effet des facteurs étudiés sur l'évolution des différentes classes de PM de l'extrait peptidique 84
Tableau 3-2-2-**3** : Comparaison des moyennes des classes de PM par temps de stockage 84
Tableau 3-2-2-**4** : Contrastes de l'interaction pH*temps 85
Tableau 3-2-2-**5** : Evolution des quantités de troponine T, I et du fragment de 30 kDa au cours du temps chez le chevreau 87
Tableau 3-2-3-**1** : Effet d'une incubation de 90 mn avec de la µcalpaïne sur un isolat peptidique 89
Tableau 3-3-1-**1** : Comparaison des quantités d'ANP produites chez le lapin entre traitements 91
Tableau 3-3-2-**1** : Quantité finale d'ions libérés en fonction du pH_u chez le chevreau 92

ANNEXES

A-1 : Modèle d'analyse de variance pour l'étude de la fraction aminée libre

A-2 : Modèle d'analyse de variance pour l'étude de la fraction peptidique

A-3 : Paramètres de la cinétique de chute du pH dans le *Longissimus dorsi* de lapin

A-4 : Concentrations en AA libres par muscle et par temps de stockage chez le bovin

A-5 : Contrastes pour le *Longissimus dorsi*

A-6 : Contrastes pour le *Triceps brachii*

A-7 : Contrastes pour le *Rectus femoris*

INTRODUCTION

Après la mort de l'animal, l'équilibre de la cellule musculaire est bouleversé. L'importance des réserves énergétiques dont dispose la cellule lui permet de maintenir son organisation fonctionnelle. Le cycle d'utilisation des réserves engendre un fort abaissement du pH par accumulation d'ions H^+ et de lactate respectivement lors de l'utilisation de l'ATP et de la glycolyse anaérobie. L'épuisement des réserves conduit à la formation d'un complexe acto-myosine responsable de la dureté de la viande qui entre alors en *rigor mortis*. La tendreté qui est l'une des principales caractéristiques organoleptiques de la viande dépend principalement de l'amplitude de la protéolyse, qui correspond à une dégradation de la structure myofibrillaire par les protéases endogènes. D'autres déterminants de la qualité dépendent d'éléments de petite taille présents dans le sarcoplasme, comme les composés aminés ou les ions libres. C'est le cas de la flaveur qui dépend en partie des composés aminés disponibles pour les réactions de Maillard (Rossi *et al.*, 1995), du pouvoir tampon et du pouvoir de rétention en eau de la viande (Offer et Knight, 1988).

L'évolution de ces composés a été peu étudiée car l'attention a été focalisée sur les indicateurs de tendreté et les mécanismes de l'attendrissage. Cependant des interactions entre ces composés de faible poids moléculaire sont actuellement pressenties (Ouali, 1990).

L'objectif de ce travail est d'étudier la composition et l'évolution des fractions azotée non protéique et ionique afin d'apprécier leur influence sur le déroulement de la protéolyse *post mortem* dans le muscle strié.

La synthèse bibliographique fait le point des mécanismes mis en cause et des interactions potentielles. Les expériences sont développées selon trois axes d'étude. La première partie concerne l'étude de la cinétique de libération des principaux cations et anions et de ses facteurs de variation. La fraction azotée non protéique, en particulier la fraction aminée libre et la fraction peptidique est étudiée dans une deuxième partie, en essayant de relier cette évolution avec des paramètres de protéolyse. Enfin dans une troisième partie nous essayerons de mettre à jour les éventuelles interactions entre les évolutions observées et le déroulement de la protéolyse *post mortem*.

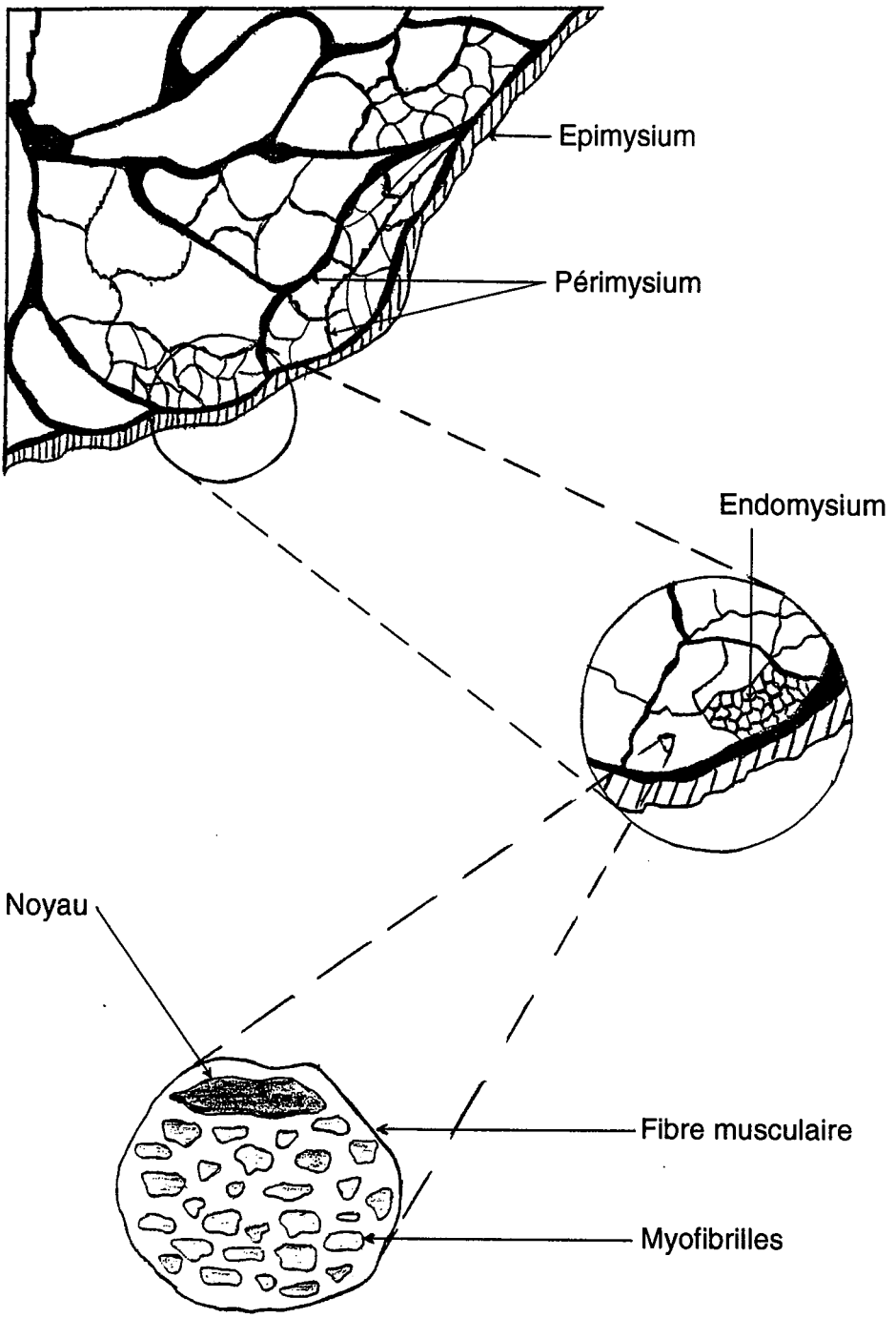


Figure 1-1-1-1 : Schéma de la structure macroscopique musculaire

1-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1-1 Le muscle strié squelettique à l'origine de la viande

1-1-1 Une structure protéique apte à résister à de fortes tensions

Le muscle est une structure hétérogène très hiérarchisée (fig. 1-1-1-1). Les protéines sont classées en trois catégories selon leur solubilité en solution aqueuse : les protéines myofibrillaires, conjonctives et sarcoplasmiques.

1-1-2 Composition protéique du muscle strié squelettique

1-1-2-1 Les protéines myofibrillaires

L'appareil contractile est constitué par les protéines myofibrillaires, solubles à une force ionique comprise entre 0,4 et 0,5. On distingue les protéines contractiles proprement dites, les protéines de régulation de la contraction et les protéines cytosquelettiques (tabl. 1-1-2-**1**).

Tableau 1-1-2-**1** :Les protéines myofibrillaires d'après : Pearson et Young (1989)

Protéine	% des myofibrilles	Localisation	Rôle principal
Myosine	43-50	Filaments épais	Contraction
Actine	20-22	Filaments fins	Contraction
Tropomyosine	3	Filaments fins	Régule la contraction
Troponines I C T	4,5	Filaments fins	 Inhibe liaison actomyosine Fixe le calcium Se lie à la tropomyosine
α-actinine	1-2	Disque Z	Liée à l'actine, attache les filaments fins à la strie Z
β-actinine	<1	Bande I	Régule la longueur des filaments fins
γ–actinine	<0,001	Filaments fins	Inhibe la dépolymérisation de l'actine
Eu-actinine	0,3	Disque et strie Z	?

Titine	5-8	De la ligne N1 à la proximité de la bande M (ligne N2)	Assure la continuité longitudinale entre sarcomères adjacents
Nébuline	3	Lignes N2	Ciment entre titine et un brin longitudinal continuant vers le disque Z
Protéine C	1,5	Milieu du filament épais	Lie la méromyosine et la queue de la myosine
Protéine H	0,18	Filaments épais	?
Protéine X	0,2	Filaments épais	?
Protéine I	<0,1	Filaments épais sauf en leur centre	Inhibe la liaison actine myosine en absence de calcium
Protéine M	0,005-0,15	Ligne M	Maintien transversal des myofibrilles
Myomesine	<0,5	Ligne M	Maintien transversal des myofibrilles
Desmine	0,18-0,2	Disque Z et périphérie de la strie Z	Lie les myofibrilles transversalement
Synemine	0,1	Disque Z	Associée à la desmine
Filamine	0,1	Disque Z	?
Vinculine	0,001	Près du sarcolemme	?
Zeugmatine	<1	Strie Z	Lierait l'actine aux filaments Z
Vimentine	-	-	Equivalent de la desmine chez l'embryon
Protéine F	0,1	Filaments épais	?

1-1-2-2 Le tissu conjonctif

Il est composé principalement de collagène, d'élastine et de glycoprotéines. Le collagène, protéine fibreuse, peut être considéré comme la protéine majeure du tissu conjonctif et représente en moyenne de 2 à 9 % du poids sec du muscle. Dans le *Longissimus dorsi*, l'élastine représente 0,07 % du poids du muscle et équivaut à 2,9% du collagène. Le ratio est similaire dans

le *Psoas major* ou le *Biceps brachii*. Mais dans le *Semitendinosus*, l'élastine représente 1,82% du poids du muscle et équivaut à 37% du collagène (Bailey et Light, 1989).

1-1-2-2-1 Composition du collagène (Bailey et Light, 1989)

Une fibre de collagène est constituée de l'assemblage de trois chaînes polypeptidiques. Ces chaînes ont des séquences de 3 résidus répétées. Ces séquences sont du type : GLY-X-Y. Les résidus X sont souvent de la proline (PRO) et les résidus Y assez souvent de l'hydroxyproline (OH-PRO). Ce qui donne globalement par rapport aux résidus aminés totaux un tiers de GLY, un quart de PRO et un septième de OH-PRO. Ce dernier est un acide aminé (AA) présent uniquement dans le collagène et l'élastine.

Trois types de chaînes (α1, α2, α3) d'environ 1040 AA chacune sont utilisées pour constituer les fibres de collagène musculaire. Elles se différencient par leur composition en AA et leur longueur. Quatre types de fibres de collagène sont présentes dans la viande (I, III, IV et V). Le I est constitué de deux chaînes α1 et d'une α2, le III de trois α1, le IV non fibreux et le V de deux α1 et d'une α2. Ces trois chaînes s'associent en triple hélice alpha. Les types I et III prédominent largement dans le muscle.

1-1-2-2-2 Structure du collagène

Cette triple hélice alpha forme un bâtonnet rigide ou fibre de collagène. Cependant les extrémités de ce bâtonnet demeurent globulaires ainsi que certaines portions internes de la molécule. Les portions globulaires des extrémités comportent entre 10 et 25 résidus et ne contiennent pas d'hydroxyproline (Bailey et Light, 1989).

Un degré d'organisation supérieur est atteint par polymérisation lorsque des liaisons s'établissent entre la partie globulaire d'une fibre et la partie hélicoïdale d'une autre fibre. Ce sont les résidus lysine et hydroxylysine qui sont impliqués dans ces liaisons intermoléculaires (cross-links). Le type III possède de surcroît des ponts disulfures intra ou intermoléculaires établis à la fin de la partie hélicoïdale entre deux résidus cystéine de deux chaînes α adjacentes (Bailey et Light, 1989). Le type IV qui se répartit dans la membrane basale ne subit pas d'ablation de peptide terminal. Sa triple hélice est flexible car elle comporte plusieurs interruptions de la structure hélicoïdale, ce qui la rend sensible aux protéases non spécifiques.

C'est la lysyl oxydase qui permet la liaison des fibres entre elles après leur formation. Elle désamine les résidus LYS du côté N et C terminal de chaque chaîne α impliquée et forme un LYS-aldéhyde. Cette même enzyme

entraîne la formation d'aldéhyde-OH-LYS. Cet aldéhyde réagit alors avec un résidu OH-LYS de la même chaîne pour former une oxo-imine (HLONL) ou un aldimine (deshydroHLNL) et donne une liaison intramoléculaire.

Deux hypothèses coexistent quant à la formation de liaisons dites matures. La condensation d'une liaison oxo-imine et d'un résidu hydroxyallysine donnerait un cycle pyridinoline possédant deux points d'ancrage sur une molécule et un sur la seconde. L'autre liaison serait issue d'une réaction impliquant OH-LYS, LYS-aldéhyde et OH-LYS-aldéhyde. Ces liaisons seraient responsables de la haute stabilité (résistance à l'acide et à la chaleur) du collagène "mature" ainsi formé (Bailey et Light, 1989).

La multiplicité des liaisons intra et intermoléculaires du collagène le rend résistant à des attaques aussi bien physiques que chimiques. Le nombre de liaisons tend à augmenter avec la maturité physiologique de l'animal puis il se stabilise, voire décroît mais les liaisons changent de nature et deviennent plus résistantes à l'hydrolyse, à la chaleur et à des tensions.

1-1-2-2-3 Répartition des collagènes

Le collagène est présent à trois niveaux dans le muscle. Une enveloppe externe ou épimysium qui constitue l'aponévrose, une enveloppe interne ou périmysium qui entoure des faisceaux de fibres musculaires et une mince couche l'endomysium qui ceint le sarcolemme des cellules musculaires.

L'épymisium est formé principalement de collagène de type I, le périmysium de type I et de très peu de type III, IV et V. L'endomysium est constitué d'une part égale de I et III (90%) plus du type IV et de traces du type V (Bailey et Light, 1989).

1-1-2-2-4 Fonction et rôle dans la texture de la viande

Le collagène qui forme l'essentiel de la trame conjonctive (2% du muscle) avec l'élastine (0,1% du muscle) et les protéoglycans, apporte une partie de la résistance du muscle aux forces de traction qu'il est amené à subir ou à exercer.

La dureté du muscle ou sa résistance à la mastication est imputable à deux principaux constituants : les myofibrilles et le collagène. Lors de la cuisson les fibres de collagène peuvent être solubilisées (collagène non mature, peu de polymérisation) mais elles subissent surtout un rétrécissement. Bailey et Light (1989) proposent le modèle suivant pour l'évolution structurale du muscle lors de la cuisson, tiré notamment des observations de Davey et Gilbert (1975).

Le sarcolemme est endommagé, il libère du liquide cellulaire qui est piégé par l'endomysium, le matériel sarcoplasmique est raccourci le liquide se retrouve entre les éléments contractiles et l'enveloppe de collagène. Lorsque la cuisson continue, l'endomysium rétrécit et chasse le fluide qui s'échappe par les extrémités sectionnées des fibres. La viande perd du volume et après cuisson pour une surface de coupe donnée, il y a plus d'éléments structuraux donc augmentation de la dureté.

La dureté de la viande a tendance à augmenter avec la quantité de collagène présente dans un muscle donné mais cette corrélation n'est pas systématique pour des muscles différents. La quantité de collagène III, plus résistant, semble être un facteur à prendre en compte tout comme le degré de maturité des liaisons intermoléculaires (Bailey et Light, 1989) bien que Lewis *et al.* (1991) n'aient pas observé de lien entre la proportion collagène I/III et la texture de la viande cuite sur 6 muscles de bovin.

1-1-2-3 Les protéines sarcoplasmiques

Les protéines sarcoplasmiques sont solubles dans des solutions de faible force ionique, de l'ordre de 0,1. Elles sont constituées principalement d'enzymes. On y trouve les enzymes de la glycolyse, quelques enzymes protéolytiques cytosoliques et un pigment de stockage de l'oxygène : la myoglobine. Nous les aborderons sous l'angle des potentiels protéolytique et glycolytique puisqu'elles n'ont aucun rôle structural.

Le muscle est donc une structure très hiérarchisée comprenant de nombreuses protéines. Certaines ont un rôle structural majeur comme la myosine, l'actine, la desmine, la titine, la nébuline ou le collagène.

1-1-3 Les enzymes protéolytiques de la cellule musculaire striée : un potentiel d'autodestruction

Quatre grandes familles d'enzymes protéolytiques classées selon leur site actif coexistent dans le muscle (tabl. 1-1-3-**1**). Nous nous sommes intéressés à celles dont l'activité a été observée dans des homogénats de muscle.

Tableau 1-1-3-1 : Les grandes familles de protéases d'après Bond et Butler (1987) et Goll *et al.* (1989)

Famille	pH optimum	Exemples
Sérine protéinase	7,5-9	Elastase, cathepsine G
Cystéine protéinase	4-8	Papaïne, calpaïnes, cathepsines B, H, L, N et S
Aspartique protéinase	2-6	Pepsine, chymosine, cathepsines D et E
Métalloprotéinase	7-9	Collagénases, gélatinases

Ces enzymes sont souvent classées selon leur pH optimum, dont l'évolution *post mortem* est un des facteurs de régulation de l'activité des protéases. On distingue les protéases acides, neutres et alcalines. La classification officielle est reprise à l'intérieur de chaque classe.

1-1-3-1 Les protéases acides ou cathepsines (tabl. 1-2-1-1)

Elles sont issues d'un compartiment cellulaire : les lysosomes. *In vivo*, elles sont impliquées dans le turn-over protéique pour la lyse des protéines dans les granules lysosomaux (Gerard *et al.*, 1988). L'activité maximale de ces protéases est obtenue pour des pH inférieurs à 6,5 (tabl. 1-1-3-**2**), condition remplie dans les lysosomes ou lors du catabolisme *post-mortem*.

Tableau 1-1-3-**2** : Les principales cathepsines lysosomales

Protéase lysosomale	Type de protéase	Site actif	PM	pH optimum	Autres propriétés
Cathepsine A (caboxypeptidase A)	Exopeptidase	-OH	35 kDa	5,0-6,0	Inactivée par 40 min à 65°C
Cathepsine B1	Endopeptidase	-SH	27 Da	3,5-6,0	/
Cathepsine B2 (carboxypeptidase B)	Exopeptidase	-SH	50 kDa	5,0-6,0	Instable au-dessus de pH 7
Cathepsine C (dipeptidyl-peptidase I)	Exopeptidase	-SH	197 kDa	5,0-6,0	Nécessite des ions halogènes
Cathepsine D	Endopeptidase	-COOH	37 Da	2,5-5,0	Glycoprotéine
Cathepsine H (cathepsine B3)	Endopeptidase	-SH	25 Da	5,5-6,5	Glycoprotéine
Cathepsine J	Endopeptidase	-SH	230 kDa	5,5-7,5	/
Cathepsine L	Endopeptidase	-SH	23,7 Da	3,0-6,5	Très sensible à l'autolyse

1-1-3-1-1 Les endopeptidases

Les cathepsines dont l'activité est la plus marquée dans le muscle *post-mortem* sont les cathepsines B, D, H et L (Goll *et al.*, 1989). Ce sont des endopeptidases de type cystéine-protéinases (EC.3.4.22), exceptée la D qui est une carbonylpeptidase (EC.3.4.23).

1-1-3-1-2 Les exopeptidases

La cathepsine C ou dipeptidyl-peptidase I (EC.3.4.14), coupe des dipeptides terminaux. Les cathepsines A et B2 sont des carboxypeptidases (EC.3.4.16), coupant l'acide aminé C-terminal. La cathepsine coupe des peptides dont le PM est compris entre 3,5 kDa et 0,5 kDa (Valin, 1985).

1-1-3-2 Les protéases neutres

1-1-3-2-1 Les calpaïnes

Ce sont des cystéine-protéinases (EC.3.4.22.17) sarcoplasmiques dont le pH optimum est proche de 7. Leur activité Ca^{2+} dépendante a fait qu'elles ont été nommées calpaïnes de calcium-dependent papain-like proteinase, ou Calcium Activated Factor (CAF), ou Ca^{2+} dependent proteinase (CDP).

Il y a deux formes de calpaïnes, dont la principale distinction est une activation pour un seuil différent de Ca sarcoplasmique. L'une est activée par le calcium en concentration micromolaire, c'est la µcalpaine ou calpaïne I ou CDP I. L'autre est activée pour une concentration millimolaire, c'est la mcalpaïne ou calpaïne II ou CDP II (Penny, 1980 ; Melloni et Pontremoli, 1991 ; Goll *et al.*, 1989). Une troisième forme a été découverte récemment.

D'après Cottin *et al.* (1991), le calcium cause une autolyse partielle des sous-unités de la µcalpaïne. Elle passe de la forme 80-30 kDa à la forme active : 76-18 kDa. L'autolyse se produit pour une concentration de 5 à 10 micromolaire. La mcalpaine nécessite 0,15 à 1 millimoles de calcium pour son activation. Elle atteint une activité maximale avec 3 mmoles (Goll *et al.*, 1989).

1-1-3-2-2 Les métalloprotéinases

Le collagène est certes une molécule stable résistant à l'attaque des protéinases au pH de la viande testée *in vitro* mais *in vivo* sa dégradation dans des tissus tels que le myomètre (Granström *et al.*, 1992) ou la glande mammaire (Werb Z., 1994) en fin de cycle est bien connue. Il existe dans le muscle des Zn^{2+} métalloendopeptidases (EC.3.4.24) ou collagénases extracellulaires spécifiques capables de tronçonner la triple hélice de collagène (Etherington, 1972 ; Bailey et Light, 1989). Les résidus de ces attaques sont ensuite hydrolysés dans les lysosomes.

Ce type d'enzymes est sous forme de procollagénase latente (zymogène). Elle peut être activée par la plasmine (présente dans le sang : Trémolières, 1969), par la cathepsine B (présente dans le muscle : Goll *et al.*, 1989), par des protéases de globules blancs ou par des agents chimiques tels que le SDS, l'acétate aminophénylmercurique (APMA) ou le N-éthylmaleimide (Woessner, 1991). Pearson et Young (1989) citent une présence de macrophages dans le tissu conjonctif. Ces enzymes réalisent l'ablation du polypeptide terminal (80 AA) de cette proenzyme. L'activation se fait par ablation d'un résidu CYS qui recouvre le site actif de la molécule et masque l'ion Zn^{2+} (Woessner, 1991). Cette collagénase a une action dépendante de la conformation spatiale de la molécule cible et coupe les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ respectivement entre les résidus 775-776 GLY-ILE et GLY-LEU (Bailey et Light, 1989). Cette coupure libère alors deux polypeptides respectivement de 80 à 85 kDa et de 28 à 30 kDa suivant que la fragment terminal a été hydrolysé ou non.

Il existe plusieurs formes de collagénases (tabl. 1-1-3-**3**) encore appelées MMP (Matrix Metalloproteinase).

Tableau 1-1-3-**3** : Les différentes collagénases connues (Woessner, 1991)

Noms de l'enzyme	Substrats
Collagénase interstitielle MMP-1	Collagènes de type I, II, III VII,X Gélatines
Collagénase neutrophile MMP-8	Collagènes I, II, III
72-kDa gélatinase MMP-2	Gélatine I, Collagènes IV, V, VII, X Fibronectine, élastine
92-kDa gélatinase MMP-2	Gélatines I, V Collagènes IV, V
Stromelysin MMP-3	Protéoglycan, fibronectine Collagènes III, IV, V, IX Active la procollagénase
Stromelysin-2 MMP-10	Gélatines I, III, IV, V Un peu les collagènes III, IV et V
Métalloprotéinase utérine MMP-7	Gélatines I, III, IV, V Protéoglycan, fibronectine

1-1-3-2-3 Les aminopeptidases

Deux aminopeptidases (EC.3.4.11) ont été décrites dans le muscle, la leucine aminopeptidase et l'alanyl-aminopeptidase (Valin, 1985 ; Flores *et al.*, 1996).

1-1-3-2-4 Les dipeptidases

Ces enzymes cytosoliques (EC.3.4.13) ont un pH optimum compris entre 8 et 7,3. Quatre types ont été identifiés dans le muscle, capables de dégrader les dipeptides suivants : glycyl-peptidase, glycyl-leucine, glycyl-glycine et les dipeptides ayant la proline comme résidu N terminal (Valin, 1985).

1-1-3-3 Les protéinases alcalines

1-1-3-3-1 Le complexe multicatalytique (EC.3.4.99.46)

C'est une structure cylindrique creuse d'environ 700 kDa (Rivett, 1989), composée de plusieurs sous-unités. Goll *et al.* (1989), citent trois sites catalytiques dont les pH optima sont compris entre 7 et 10,5.

Les pH idéaux semblent dépendre de la taille du substrat, 8 à 9 pour les protéines et 7 à 10,5 pour les peptides (Rivett, 1989). Ces pH optima élevés des sites actifs font envisager une action réduite de cette enzyme lors de la maturation car le pH descend rapidement en dessous de 6,5.

1-1-3-3-2 Les sérine protéases

Les sérine-protéases (EC.3.4.21) alcalines sont situées dans les cellules macrophagiques en périphérie du muscle, on les trouve cependant dans des homogénats de muscle. Leur rôle protéolytique pendant la maturation serait donc à négliger d'après Ouali (1990). Chez le rat, des sérines protéases ont cependant été observées par marquage immunologique dans un muscle par Kay *et al.* (1985) et des inhibiteurs de ces enzymes ont été trouvés dans des homogénats de muscle (Goll *et al.*, 1989). Mais les propriétés et l'action de ces enzymes et de leurs inhibiteurs sont peu connues.

1-1-3-4 Les protéases ATP dépendantes

Un complexe de 1500 kDa dégradant spécifiquement les protéines liées à l'ubiquitine a été identifié dans le muscle (Fagan *et al.*, 1987 ; Hershko et Ciechanover, 1992). La conjugaison protéine-ubiquitine nécessite une hydrolyse d'ATP, ainsi que la protéolyse par le complexe (Goll *et al.*, 1989).

1-1-3-5 Les inhibiteurs des enzymes

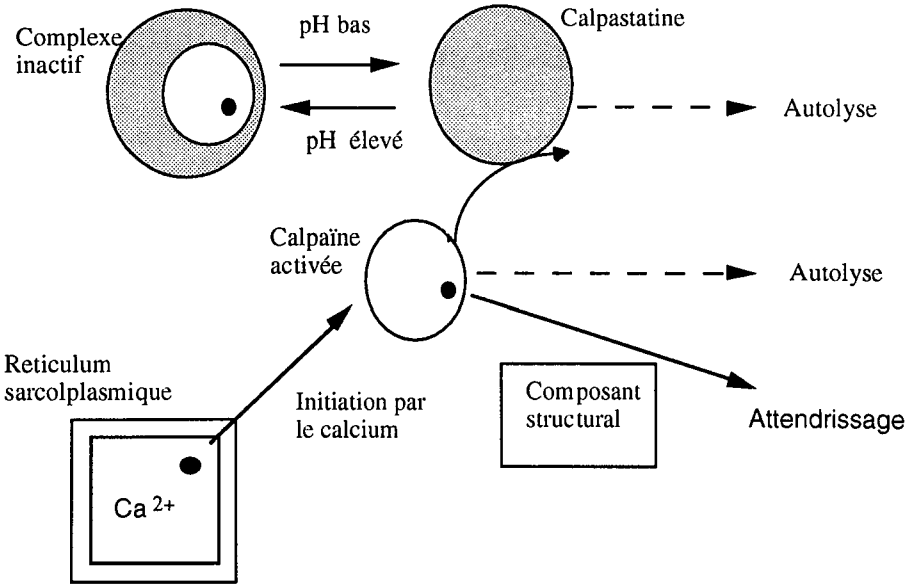
Il existe des inhibiteurs de toutes les enzymes présentes dans le muscle (tabl.1-1-3-4).

Tableau 1-1-3-4 : Principaux inhibiteurs de protéases trouvés dans le tissu musculaire d'après Goll *et al.* (1989) et Woessner (1991)

INHIBITEUR	POIDS MOLECULAIRE	PROTEASES INHIBEES
Calpastatine	110 kDa	Calpaïnes
Inhibiteur I-T de cystéine protéinase	30 kDa	Cathepsines B, H et L
Cystatines	10-14 kDa	Toutes les cystéine protéinases exceptées les calpaïnes
Inhibiteur de la sérine protéase	15 kDa	Trypsine
Tissue Inhibitor Metallo-Protease (TIMP)	28,5 kDa	Matrix Metallo-Protease (MMP)

L'inhibition de la calpaïne a été décrite en détail par Dransfield (1993) (fig. 1-1-3-1). La particularité de ce couple est l'aptitude de la calpaïne à dégrader son inhibiteur.

Figure 1-1-3-1 : Schéma de la régulation de l'activité de la µcalpaïne



Les collagénases ont également des inhibiteurs ou TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase) présents dans le muscle (Woessner, 1991). L'activité des collagénases est régulée par l'équilibre inhibiteurs-enzymes et par l'activité des enzymes activatrices du zymogène.

Ces inhibiteurs ont un rôle important. Morgan *et al.* (1993) relient la plus faible dégradation des protéines myofibrillaires *in vivo* chez le taurillon par rapport au boeuf à une activité plus importante des inhibiteurs des protéases (calpastatine et cystatines). De même Zamora *et al.* (1996) présentent la quantité d'inhibiteurs de sérine protéinases comme premier facteur explicatif de la variabilité de la tendreté de la viande bovine à 6 jours *post mortem*. Une estimation seule de la quantité d'enzymes présentes ne peut donc suffire à apprécier leur activité réelle.

Cependant les proportions relatives des différents inhibiteurs dans les muscles, les ratios enzyme/inhibiteur et leur comportement lors de la maturation sont mal définis hormis pour le couple calpastatine/calpaïnes.

Le muscle contient un arsenal protéolytique très diversifié, apte à dégrader la plupart des protéines présentes. Le déplacement du pH lors de la

mise en place de la *rigor mortis* modifie l'activité des différentes enzymes au cours du temps. La cinétique de chute de pH est donc un élément majeur dans la "régulation" de la protéolyse *post mortem,* avec l'activité des inhibiteurs. La variété des activités protéolytiques entraîne un large spectre de produits de dégradation qui peuvent aller de la sous unité protéique à l'acide aminé libre.

1-2 Métabolisme énergétique *post mortem* et évolution du milieu physico-chimique

1-2-1 Le métabolisme énergétique *post mortem*

1-2-1-1 L'établissement de la *rigor mortis*

Lorsque la circulation s'arrête après la mort de l'animal, les cellules n'ont plus d'oxygène. Elles mobilisent alors leurs réserves énergétiques. La phosphocréatine et la myokinase permettent de régénérer l'ATP. La voie aérobie est rapidement stoppée par manque d'oxygène, c'est la glycolyse anaérobie qui produit très majoritairement l'ATP. Pour chaque molécule d'ATP produite, une molécule d'acide lactique est produite. La circulation étant stoppée, l'acide lactique s'accumule. Au pH de la viande l'acide lactique est entièrement dissocié (pK_a=2,9) sous forme de lactate. La libération d'ions H^+ entraîne alors une baisse du pH. On a globalement :

$$(\text{glucose})_n + (1+3m)\,H_2O + m\,ATP^{4-} \rightarrow (\text{glucose})_{n-1} + m\,IMP^{2-} + m\,NH_4^+ + 2m\,PO_4^{2-} + 2\,CH_3COO^- + (2+m)\,H^+$$

Le processus s'arrête lorsque l'AMP fait défaut, par épuisement du glycogène ou par inhibition du fait d'un pH trop bas (Monin, 1988 ; Vignon, 1990).

Le manque d'ATP empêche les pompes ATPases dépendantes du reticulum sarcoplasmique de garder le calcium enfermé ce qui a pour conséquence une complexation de l'actine et de la myosine (le calcium se fixe sur la troponine C). Pour être dissocié ce complexe nécessite la fixation d'un ATP. Quand la glycolyse s'arrête il n'y a plus d'ATP disponible et le complexe acto-myosine ne peut plus être dissocié : c'est la rigidité cadavérique ou *rigor mortis*. La valeur de pH alors atteinte est qualifiée de pH ultime ou pH_u.

Le pH_u, l'amplitude et la vitesse de chute de pH sont trois paramètres qui permettent de caractériser la chute *post mortem* du pH. Celle-ci est sujette à de nombreux facteurs de variation.

1-2-1-2 Les facteurs affectant le déroulement de la *rigor mortis*

1-2-1-2-1 Le type de muscle

Plusieurs types de fibres ont été décrits (tabl. 1-2-1-**1**). Leur proportion dans le muscle conditionne la chute de pH *post mortem* aussi bien pour sa vitesse que pour son amplitude.

Tableau 1-2-1-1 : Les différents types de fibres musculaires et les conséquences sur la chute du pH

Type	Contraction	Couleur	Vitesse de chute du pH	Amplitude de chute du pH
βR ou I	lente	rouge	lente	faible
αR ou IIA	rapide	rouge	rapide	moyenne
αW ou IIB	rapide	blanche	rapide	rapide
indifférencié ou IIX	-	-	-	-

1-2-1-2-2 Facteurs *ante mortem*

Le principal facteur *ante mortem* est le stress. Provoqué lors du transport ou de l'abattage des animaux il entraîne via les cathécolamines, les corticoïdes et l'adrénaline une mobilisation des réserves énergétiques des cellules musculaires qui sont consommées lors des efforts (luttes, tentatives de sortie des appareils de contention...) ce qui entraîne un pH_u plus élevé (Vignon, 1990 ; Watanabe *et al.*, 1996). La vitesse de chute du pH peut être modifiée par augmentation de l'activité ATPasique par injection d'adrénaline chez le lapin (Bendall et Lawrie, 1962) et chez le mouton (Watanabe *et al.*, 1996).

1-2-1-2-3 Facteurs *post mortem*

1-2-1-2-3-1 La stimulation électrique

Différentes modalités de stimulation électrique permettent d'abaisser le pH de manière drastique. Kastner *et al.* (1993) reprenant des résultats de précédentes études ont calculé le temps nécessaire à l'obtention d'un pH égal à 6. Il peut aller de 0,56 h chez des animaux stimulés électriquement à 3,76 h pour des bovins non stimulés. La stimulation électrique déclenche des contractions musculaires qui épuisent les réserves énergétiques. Le pH_u n'est normalement pas affecté par ce traitement (Kastner *et al.*, 1993). Cependant, Gariepy *et al.* (1995) obtiennent un pH_u plus élevé chez les animaux non stimulés.

1-2-1-2-3-2 La température

Une baisse de température ralentit les réactions biochimiques ce qui est vrai pour des températures jusque 10-12°C. Pour des températures plus basses, le calcium n'est plus retenu dans le réticulum (pour un pH>6) par inhibition des pompes ATPase-dépendantes, les mécanismes de contraction et la glycolyse sont alors activés (Vignon, 1990). Il y a contracture au froid (ou cold-shortening) et une dureté supérieure est obtenue. Une maturation de 15 jours ne résorbe pas l'augmentation de dureté liée au développement de la *rigor* développée à 1°C par rapport à une *rigor* développée à 4°C (Olsson *et al.*, 1994).

1-2-2 Composition minérale du muscle strié et variabilité

La variabilité dans l'évolution des concentrations en ions après la mort de l'animal peut avoir plusieurs origines. La première est liée à la composition chimique du muscle : c'est la quantité d'ions totaux présents dans le muscle. Elle représente un maximum théorique de libération. La deuxième provient des différences de conditions imposées au muscle comme la température ou le pH. Celles-ci jouent sur la proportion d'ions relâchés et sur leur vitesse de libération.

Dans une première partie nous envisageons la variabilité de la composition minérale du muscle strié et ses origines. Dans une deuxième partie, sont développés les mécanismes de libération des ions déjà présents et des ions métabolites.

1-2-2-1 Teneur totale en minéraux

Tableau 1-2-2-**1** : Teneurs en minéraux de 2 muscles de caprins (Park, 1990)

Muscle	Phosphore			Soufre			Potassium		
	mg/100g	σ	mmol/kg	mg/100g	σ	mmol/kg	mg/100g	σ	mmol/kg
BF	201,7	5,1	65	3,15	0,64	1,0	335,5	10,4	86a
LD	181,1	5,1	58	2,70	0,45	0,8	296,3	12,4	76b
Muscle	Calcium			Magnésium			Sodium		
	mg/100g	σ	mmol/kg	mg/100g	σ	mmol/kg	mg/100g	σ	mmol/kg
BF	6,81	0,61	1,7	26,7	0,78	11	58,9	2,17	26
LD	7,20	0,77	1,8	24,6	0,80	10	65,5	3,81	28

Les valeurs de la colonne suivies par 2 lettres différentes diffèrent significativement ($p<0,01$).

Tableau 1-2-2-**2** : Composition moyenne en minéraux obtenue sur 8 muscles issus de 18 jeunes bovins normands (Dumont et Hudzik, 1990).

Elément	ppm (sur lyophilisé à 98 % de MS)	σ	mmoles/kg frais (calculé avec frais à 75% d'eau)
Fe	93,2	21,6	0,42
Cu	12,2	65,3	0,05
Zn	229,6	30,9	0,88
Na	2407	19,5	26
K	15416	9,7	99
Mg	987	9,7	10,2
Ca	211	15,0	1,3
P	6699	12,0	54

Toutes ces mesures ont été effectuées après réduction en cendres de l'échantillon, solubilisation de celles-ci dans l'acide chlorhydrique et dosage par spectrométrie de flamme.

Le potassium, le sodium, le phosphore et le magnésium sont quantitativement les ions les plus importants chez le caprin (tabl. 1-2-2-**1**) comme chez le bovin (tabl. 1-2-2-**2**). Les teneurs citées fluctuent sous l'effet d'un certain nombre de facteurs autres que l'espèce.

1-2-2-2 Facteurs de variation

1-2-2-2-1 Alimentation

La teneur en K peut être affectée par le régime alimentaire. Kotula et Lusby (1982) citent une augmentation de 5% de K chez des bovins nourris *ad libitum* par rapport à une alimentation restreinte. Fauchon *et al.* (1995) obtiennent avec des régimes très déséquilibrés pour la balance (Na + K) - Cl un effet significatif uniquement pour le Mg sanguin chez des agneaux en croissance. Les animaux semblent pouvoir compenser un déficit alimentaire en réduisant l'excrétion de l'ion déficitaire.

1-2-2-2-2 Effet âge et sexe

L'âge et le sexe entraînent d'après Kotula et Lusby (1982) des variations de teneur en K, Na, Mg et Fe. Park (1990) chez le caprin trouve un effet du sexe intrarace pour le K. Le mâle a des teneurs en soufre et potassium

supérieures à celles de la femelle et inférieures pour le phosphore, le magnésium, le fer et le sodium.

1-2-2-2-3 Type de muscle

Doornenbal et Murray (1981) chez le bovin, mesurent une concentration en Mg supérieure ($p<0,01$) pour le Diaphragme par rapport au LD et au SM. Dumont et Hudzik (1990) observent chez des taurillons (tabl. 1-2-2-**2**) un effet muscle pour Na, K, Mg, Fe et Zn ($p<0,001$).

1-2-2-2-4 Animal

Dumont et Hudzik (1990) mesurent un effet très marqué de l'animal pour P, Ca, K, Mg et Zn ($p<0,001$). De même chez le caprin Park (1990) ne trouve pas d'effet race mais principalement un effet type de muscle (tabl. 1-2-2-**1**).

Dumont et Hudzik (1990) estiment que les variations de teneurs en minéraux totaux engendrées par les différents facteurs abordés sont suffisantes pour qu'une teneur en minéraux ne soit pas citée indépendamment de ces facteurs.

Les ions sont présents dans des concentrations variables dans le muscle. La variabilité de ces teneurs provient essentiellement d'un effet muscle et d'un effet animal mais le sexe, l'âge et l'alimentation peuvent jouer un rôle. Cette variabilité est très sensible pour le potassium, ion quantitativement le plus important dans le muscle (tabl. 1-2-2-**1** et 1-2-2-**2**).

1-2-2-3 Des minéraux ionisés liés aux protéines

Deux types de minéraux coexistent dans la cellule. Certains sont intégrés à une molécule complexe et forment un site actif. C'est le cas de Fe dans le groupement prosthétique de l'hème, de P dans les bases azotées nucléotides, ou de S dans les AA soufrés. D'autres sont plus ou moins "libres".

Les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} sont fortement liés aux protéines telles que la phosphocréatine ou les parvalbumines (Alvarez-Leefmans *et al.*, 1986 ; Haiech *et al.*, 1979), ainsi que les ions Na^{+} et K^{+} (Conway, 1957). La part des ions liés et la compétition entre ions peuvent même être une voie de régulation de l'activité contractile musculaire. En effet la compétition Mg^{2+} et Ca^{2+} peut induire une relaxation si Mg^{2+} l'emporte et une contraction si Ca^{2+} réussit à se fixer sur la troponine C (Haiech *et al.*, 1979 ; Donaldson *et al.*, 1978). Leur adsorption sur des sites de charge opposée de la protéine est fortement dépendante du pH du milieu puisque celui-ci conditionne la charge des groupements des acides aminés terminaux de la protéine.

Lorsque le pH se rapproche du pI des protéines majoritaires (ici protéines myofibrillaires avec un pI moyen proche de 5,0), la solubilité de celles-ci est minimale car leur charge globale nulle nuit à leur hydratation et à leurs capacités à adsorber les cations également. Ces derniers sont alors libérés dans le sarcoplasme et jouent sur la force ionique de la solution. Cependant ils ne sont pas tous libérés, car d'après Pearson et Young (1989), il existe d'une part des liens étroits non rompus à pH 5 et d'autre part, certains ions demeurent enfermés dans des organites cellulaires comme le reticulum sarcoplasmique ou les mitochondries. Renou *et al.* (1986) obtiennent un signal hétérogène du phosphore (par ^{31}P-RMN) dans la cellule musculaire de lapin avec une accumulation importante dans le reticulum sarcoplasmique. Ils expliquent cette concentration par une forte libération de phosphate inorganique due à une forte hydrolyse d'ATP nécessaire au fonctionnement de la pompe à calcium membranaire.

Le degré de liberté des ions est principalement lié au pH, il varie donc surtout lorsque ce dernier varie ce qui est le cas lors de l'établissement de la *rigor mortis.*

1-2-3 Libération des ions

1-2-3-1 Cinétique de libération des ions pendant l'installation de la *rigor mortis*

Lors de la glycolyse anaérobie, du lactate complètement dissocié (pKa) et des acides organiques intermédiaires apparaissent et libèrent de nombreux ions H^+ (Farouk et Price, 1994 ; Moesgaard *et al.*, 1995). Pendant cette phase comme pendant l'effort les adénylphosphates disparaissent et du phosphate inorganique apparaît (Moesgaard *et al.*, 1995).

La disparition de l'AMP est liée à la transformation d'AMP en IMP (cycle des purines) avec production et accumulation de NH_3 grâce à l'adénylate déaminase (Lowenstein, 1972 ; Goodman et Lowenstein, 1977). Le pH induit un changement des charges protéiques et une libération d'ions non métaboliques. Jeacoke (1993), chez la souris, observe pendant l'effort un passage de Mg^{2+} libre de 0,5-0,6 mM à 2-3 mM en *rigor*, pour une teneur cellulaire totale de 10 mM environ. Le Mg^{2+} est lié à de nombreuses molécules : ATP, phosphocréatine, troponine (Alvarez-Leefmans *et al.*, 1986).

La cinétique de libération peut varier. Un facteur connu pour le calcium est le génotype halothane (tabl. 1-2-3-1) chez le porc.

Tableau 1-2-3-1: Concentrations en calcium présent dans le réticulum sarcoplasmique d'un homogénat de porc Landrace suivant son génotype halothane (Cheah *et al.*, 1994)

Génotype	2 heures *post mortem*	24 heures *post mortem*
H-B-	12,4	11,8
H-B+	12,6	9,0
H+B+	13,2	3,0

Ces résultats montrent que le calcium est encore en partie stocké chez les génotypes normaux en *rigor* alors que pour le génotype halothane (H+), les trois quarts ont déjà été relâchés. L'évolution des minéraux Cl^-, Na^+ et K^+ pendant cette phase est mal connue.

Un dosage global sur cendres de muscle ne renseigne pas sur la variation au cours du temps de la liaison minéraux-protéines. La connaissance de ces phénomènes nécessite d'autres méthodes d'approche.

1-2-3-2 Méthodes d'approche

Une des premières approches exhaustives des ions dans le muscle en *rigor* est due à Winger et Pope chez le bovin (1980-81). Le dosage est réalisé après broyage, centrifugation (22000g) et minéralisation du surnageant. Cependant le soufre comme le phosphore ne font pas forcément partie de molécules ioniques relâchées dans le sarcoplasme mais appartiennent à des nucléotides, des esters phosphorylés ou des acides aminés soufrés. Il est difficile d'évaluer les ions présents dans le sarcoplasme et notamment d'identifier les compartiments dans lesquels ils se trouvent : espace interstitiel, liés aux protéines ou dissous dans l'eau de solvatation des protéines, dissous dans l'eau libre du muscle. Des études ont essayé de quantifier cette répartition pour le sodium (1-2-3-**2**).

Tableau 1-2-3-**2**: Répartition du sodium dans le muscle *sartorius* de grenouille (Conway, 1957).

Localisation	mEq/kg	mEq/kg	compartiment
Liquide interstitiel	13,5	11,5	conjonctif
		2,0	sang
Fibre	10,4	7,8	externe
		2,6	interne
Non échangé	2,0		
Total	23,9		

Ces quantités sont mesurées par échange avec une solution isotonique de glucose. Ces valeurs calculées sont dépendantes de la méthode d'extraction utilisée. La méthode repose sur des différences de vitesse de diffusion, c'est à dire la résultante pour un ion donné de sa perméabilité membranaire et de la force de liaison avec les protéines musculaires.

Jeacoke (1993), Alvarez-Leefmans *et al.* (1986) utilisent et critiquent des méthodes utilisant des microélectrodes spécifiques du Mg^{2+} ou du Ca^{2+}. Le principal problème est l'interaction avec les autres ions présents et la multiplication des électrodes à utiliser si l'on veut doser les ions de manière exhaustive.

Pour les composés phosphorylés, Moesgaard *et al.* (1995), Renou *et al.* (1986), et Miri *et al.* (1991) utilisent la ^{31}P-RMN.

Ces deux dernières méthodes sont lourdes à mettre en place simultanément avec les méthodes analytiques qu'il faut leur adjoindre (lactate, et autres ions).

Après la mort l'épuisement de l'ATP et la glycolyse anaérobie conduisent à la *rigor mortis*. Cette phase est soumise à quantité de facteurs *ante* comme *post mortem* qui affectent son déroulement. L'absence de régulation centrale et les nouvelles conditions physico-chimiques entraînent alors un nouveau processus qui achève la transformation du muscle en viande : la maturation. Cette maturation repose essentiellement sur un phénomène : la protéolyse.

1-3 La protéolyse *post mortem*

1-3-1 L'action des enzymes sur les protéines musculaires à rôle structural

Les actions éventuelles des sérine-protéases et des protéases ATP dépendantes ne sont pas abordées dans ce chapitre car notre bibliographie ne nous a pas permis d'appréhender leur action lors de la maturation.

1-3-1-1 Dégradation des myofibrilles....

1-3-1-1-1 Le complexe multicatalytique

Koohmaraie (1992b) obtient après incubation de myofibrilles ovines purifiées avec le MCP une dégradation de la troponine C, des MLC2 et MLC3. Il n'observe pas de variations morphologiques des myofibrilles. Le MCP serait également capable de dégrader les protéines sarcoplasmiques (Rivett, 1989).

1-3-1-1-2 Les calpaïnes

L'action des calpaïnes la plus immédiate est une dégradation des stries Z (Etherington *et al.*, 1987 ; Olson *et al.*, 1977 ; Koohmaraie, 1992b). Leur action est cependant beaucoup plus large (tabl. 1-3-1-**1**).

Goll *et al.* (1983) situent l'action des calpaïnes comme initiatrices de la dégradation des protéines myofibrillaires. Elles ne semblent pas libérer d'acides aminés. Elles agissent dès que le calcium est libéré. La calpastatine est alors activée et inhibe l'action de la µcalpaïne. Le pH décroissant encore, la liaison calpastatine-calpaïne disparaît peu à peu, l'activité reprend. La µcalpaïne s'autolyse, la calpastatine est en partie hydrolysée. Le calcium libre ayant encore augmenté, la mcalpaïne est activée mais son activité est réduite à cause du faible pH.

Tableau 1-3-1-1 : Relations Protéines Enzymes dans le muscle

Protéines dégradées	**Enzymes** (conditions éventuelles)	**Auteurs**
Myosine MHC	MCP Cathepsines	Koohmaraie, 1992b ; Mikami *et al.*, 1987 Ouali *et al.*, 1988
Actine	Cathepsine D à pH=5,5	Zeece *et al.*, 1986a
Troponine T	Cathepsine D Calpaïnes	Zeece *et al.*, 1986a ; Olson, Parrish *et al.*, 1977 ; Heinze et Bruggemann, 1994 ; Xiong et Anglemier, 1989 Penny et Ferguson-Pryce, 1979
Troponine C	MCP	Koohmaraie *et al.*, 1992b
Protéine C	µCalpaïne Solubilisée par Ca^{2+} Calpaïnes Cathepsine L	Zeece *et al.*, 1986b ; Goll *et al.*, 1983 Taylor et Etherington, 1991 Cena *et al.*, 1992 Mikami *et al.*, 1987
Tropomyosine	Calpaïnes Cathepsine D Cathepsine L	Goll *et al.*, 1983 ; Zeece *et al.*, 1986b Zeece *et al.*, 1986a Mikami *et al.*, 1987
α-actinine	Calpaïnes Cathepsine L Cathepsine D	Hwan et Bandman, 1989 ; Penny et Ferguson-Pryce, 1979 ; Uytterhaegen *et al.*, 1992 ; Xiong et Anglemier, 1989 Mikami *et al.*, 1987 Zeece *et al.*, 1986a
Desmine	Calpaïne mCalpaïne	Goll *et al.*, 1983 Zeece *et al.*, 1986b
Nébuline	Cathepsine L	Fritz et Greaser, 1991 ; Lusby *et al.*, 1983 ; Mikami *et al.*, 1987
Titine	µCalpaïne Calpaïnes Cathepsine L Calcium	Zeece *et al.*, 1986b Koohmaraie 1988 ; Uytterhaegen *et al.*, 1992 Anderson et Parrish, 1989 ; Dransfield, 1993 ; Fritz et Greaser, 1991 ; Fritz *et al.*, 1993 ; Mikami *et al.*, 1987 Takahashi *et al.*, 1987 ; Tanabe *et al.*, 1992

1-3-1-1-3 Les cathepsines

Les cathepsines dégradent un grand nombre de molécules myofibrillaires (tabl. 3-1-1-1). Elles peuvent dégrader les protéines natives ou reprendre les polypeptides libérés par les calpaïnes. Elles demeurent actives très longtemps (Valin, 1985). Les cathepsines doivent cependant être relâchées. Le moment où les enzymes lysosomales sont actives n'est pas clairement connu. Les délais cités vont de rapidement après la mort (Moeller *et al.*, 1976 ; Wu *et al.*, 1985 ; Uytterhaegen *et al.*, 1992), à 5 jours *post mortem* (Dutson et Lawrie, 1974) ou encore faiblement après 14 jours (Chambers *et al.*, 1994).

Les cathepsines A, B2 et C, toutes trois exopeptidases, libèrent des peptides et des acides aminés dans le sarcoplasme.

La plupart des protéines myofibrillaires sont donc potentiellement dégradées par les enzymes présentes dans la viande. Cependant bon nombre de ces observations ont été réalisées *in vitro*. Peu d'informations sont disponibles sur la réalité des faits *in vivo*. les dégradations observées *in vivo* sont difficilement attribuables à l'une ou l'autre des enzymes protéolytiques.

Cependant les modifications observées notamment par électrophorèse ne justifient pas à elles seules l'altération de la cohésion myofibrillaire. La plupart des protéines dont la lyse a été clairement définie et quantifiée sont des protéines comme les troponines T (à l'origine du fragment de 30 kDa d'après Negishi *et al.*, 1996 dont l'utilisation comme indicateur d'attendrissage est proposée depuis longtemps : Penny et Dransfield, 1979) et I n'ayant pas de rôle structural (Heinze et Brüggemann, 1994) mais de régulation de la contraction. Leur dégradation est corrélée avec l'évolution de la tendreté dans de nombreuses études. Elle reflète cependant la protéolyse générale qui a lieu et n'est pas explicative de l'évolution de la tendreté. Si dans un premier temps la disparition des stries Z explique l'évolution de la tendreté (Olson *et al.*, 1976), il semble que la désolidarisation des membranes basales et de l'appareil myofibrillaire strict soit essentiellement à l'origine de la baisse de dureté observée (Dransfield *et al.*, 1995a et b ; Nishimura *et al.*, 1996).

Les calpaïnes sont considérées comme étant les principales enzymes responsables de l'attendrissage *post mortem* de la viande. (Koohmaraie, 1992a ; Uytterhaegen *et al.*, 1994). Cependant une synergie entre ce système protéolytique et les autres protéases présentes n'est pas exclue.

1-3-1-2 Dégradation du conjonctif

1-3-1-2-1 Dégradation du collagène

Il est habituellement reconnu que lors de la maturation, le collagène est faiblement dégradé et constitue la dureté de base ou résiduelle de la viande (Trevor et Bailey, 1981). A l'opposé la dureté liée à la structure myofibrillaire décroît lorsque l'appareil contractile subit la protéolyse concomitante de la maturation. Cette approche est peut-être faussée par la méthode utilisée pour estimer la dégradation du collagène. En effet l'attaque de la collagénase ne solubilise que peu de fibres de collagène. Elle les coupe mais les fibres restent liées entre elles par les ponts intermoléculaires, le collagène demeure donc en grande partie insoluble. Judge et Aberle (1982) relatent une baisse de la température de rétrécissement thermique du collagène et une augmentation de sa solubilité thermique entre la mort de l'animal et 7 jours *post mortem* tout comme Mills *et al.* (1989a et b) ou Lewis *et al.* (1991) qui de surcroît n'observent pas de modification ni de la teneur en collagène intramusculaire, ni de sa composition biochimique. Récemment Stanton et Light (1987, 1988, 1990) et Nishimura *et al.* (1995) ont observé une dégradation du collagène chez le bovin pour des temps de maturation de 14 jours *post mortem* à travers respectivement un changement de solubilité et des dégâts ultrastructuraux.

Bailey et Light (1989) proposent l'enchaînement suivant pour la dégradation du collagène. Les collagénases coupent des triples hélices rendant la pénétration des calpaïnes et surtout des cathepsines plus aisée. Celles-ci peuvent alors dégrader les parties globulaires. *In vitro,* la cathepsine B est capable d'hydrolyser le collagène de type III à un pH de 6,5 (Dufour *et al.*, 1996) alors que le pH ultime de la viande est reconnu comme un facteur limitant de son action dans la viande en post rigor. Or c'est à ce niveau que se situent les liaisons intermoléculaires (cross-links). La molécule est alors dépolymérisée. Pour la viande crue l'effet sur la force de tension est certainement difficile à mesurer tout comme sur la solubilité du collagène mais la tension engendrée par le collagène lors du chauffage est réduite. La viande rétrécit moins et les fibres périmysiales intermyofibrillaires ont une force de tension résiduelle plus faible. L'attendrissage sera observé principalement après cuisson. Cette notion de synergie mise en avant par Bailey et Light (1989) avait déjà été proposée. Harris et Krane (1972) ont observé *in vivo* dans du tissu synovial rhumatoïde une dégradation extracellulaire du tissu conjonctif, basée sur la synergie entre une collagénase et une deuxième protéase qui dégrade la gélatine polypeptidique issue de l'action de la collagénase.

De plus Light *et al.* (1985), dans une étude portant sur 6 muscles de bovin ont constaté que ce sont les fractions épi- et périmysium qui jouent un rôle majeur dans l'effet du collagène sur la texture du muscle. Or ces 2 superstructures forment un tissu dont le remodellement permanent lors de la croissance des animaux de boucherie nécessite la présence de collagénases issues des fibroblastes et où l'on retrouve des macrophages (à la fois dans la matrice conjonctive et en zone péricapillaire) impliqués eux aussi dans les phénomènes évolutifs du tissu conjonctif (Gordon *et al.*, 1986).

Il est possible que de simples coupures affectant la jonction myofibrilles-endomysium, endomysium-périmysium (Light *et al.*, 1985) ou collagène-protéoglycans (Lewis *et al.*, 1991) conduisent à un affaiblissement significatif de la structure musculaire.

1-3-1-2-2 Dégradation des protéoglycans

Nishimura *et al.* (1996) reportent la disparition quasi totale des protéoglycans de la membrane basale à 21 jours *post mortem*. Ces derniers assurent la cohésion entre les fibrilles de collagène dans l'épimysium et le périmysium. Le conjonctif qui assure la transmission de fibrilles en fibrilles de la force exercée lors d'un test mécanique en temps normal n'est plus apte à le faire dans la viande maturée.

Les enzymes protéolytiques présentes dans la viande sont donc très nombreuses. Leurs actions sur les différentes protéines constitutives sont surtout connues *in vitro*. De la multiplicité des enzymes et des substrats en présence nous pouvons déduire le grand nombre de produits de dégradation qui apparaissent au cours de la maturation et les difficultés à rapporter l'apparition d'un produit à l'action d'une enzyme particulière ou à sa protéine originelle. Ces produits peuvent être des polypeptides (action des endopeptidases), des dipeptides (action des dipeptidylpeptidases) ou des acides aminés libres (action des aminopeptidases et des dipeptidases).

1-3-2 La libération des ions et ses conséquences

1-3-2-1 Effet sur la force ionique

1-3-2-1-1 Augmentation de la force ionique

La force ionique de symbole μ vaut $1/2 . \sum (C . Z^2)$ avec C concentration molaire de chaque ion et Z leur valence respective. Elle est liée à la pression osmotique Π par la relation: $\Pi = i . R . T . C$.

i vaut un pour un non électrolyte (protéine, glucose). Pour un électrolyte dissocié est égal au nombre de charges de ce dernier : Z.

La force ionique est considérablement augmentée entre la mort de l'animal et la *rigor mortis*. Chez le bovin, Wu et Smith (1987) citent une augmentation de la force ionique physiologique de 0,15 à 0,19 en *rigor* (Dubuisson, 1950) dans le *Longissimus Dorsi*. Winger et Pope (1980-81) mesurent par abaissement du point de congélation une pression osmotique en rigor de 480 pour le ST et 540 mOs (équivalent 275 et 295 mM de NaCl) pour le LD contre environ 300 mOs en *pre-rigor*. Ils estiment que 60 à 80 % de l'augmentation de la pression osmotique (et donc de la force ionique) proviennent de métabolites (glycolyse et protéolyse) et le reste d'ions inorganiques libres non présents dans le cytoplasme avant la phase de *rigor*. Ces ions concentrés dans des organites tel que le reticulum sarcoplasmique ou les mitochondries sont libérés après la mort de l'animal lors de la dépolarisation des membranes.

Les principaux métabolites mis en cause sont le lactate pour environ 100 mM (Bendall, 1979), le phosphate inorganique : 25 mM, la créatine et ensuite les peptides et acides aminés libres issus de la protéolyse terminale. Valin *et al.* (1975) estiment que la production d'acides aminés libres est négligeable au cours des dix premiers jours *post mortem* contrairement à Okitani (1974). Ils s'appuient sur la modification du nombre de radicaux libres NH_2 pour estimer le nombre d'acides aminés libres. Mais rapportés au nombre total de radicaux NH_2 apparents d'origine protéique et à la précision de la mesure, il se peut que les nouveaux NH_2 libres d'origine aminée et peptidique soient insuffisants pour être détectés par la méthode choisie. Depuis, des auteurs ont effectivement observé une augmentation des acides aminés libres. Toldra *et al.* (1992) chez le porc, Nishimura *et al.* (1988) chez le bovin, le porcin et le poulet ont observé une augmentation pour tous les acides aminés exceptés la glutamine.

1-3-2-1-2 Interactions entre force ionique et protéines en solution

Les protéines ont des comportements différents en milieu aqueux, Weil (1987) rappelle une classification des protéines basée sur leur solubilité. Il distingue les albumines (solubles dans l'eau distillée), les globulines (solubles à faible force ionique : NaCl 5%), les protéines myofibrillaires (solubles dans les solutions à force ionique plus élevée) et les scléroprotéines insolubles. Les interactions qui conditionnent cette solubilité sont :

polaires avec le solvant aqueux

ioniques avec les sels

électrostatiques entre les agrégats protéiques voisins.

L'amplitude de la solubilité dépend de l'importance relative de ces interactions. Divers facteurs interviennent sur celles-ci.

En présence d'ions de sels neutres et ce jusqu'à une force ionique inférieure à 1, la solubilité des protéines de type globuline augmente avec μ. C'est l'effet dissolvant ou "salting-in". Les molécules d'eau sont en large excès, les ions réagissent avec les charges portées par les protéines et abaissent les interactions électrostatiques entre agrégats protéiques voisins.

Quand la force ionique dépasse un, le sel entre en compétition avec les protéines pour sa solvatation. Il présente une plus grande attraction pour l'eau que les protéines qui possèdent en surface des résidus hydrophobes tels que Phe, Leu, Ile, Val, Met, Trp. Les interactions protéines-protéines augmentent alors et des agrégats se forment pouvant entraîner une précipitation. C'est le phénomène de relargage ou "salting-out".

Scopes (1987) obtient pour une protéine pure :

log (solubilité) = A - m . (concentration en sel)

où A et m sont des constantes dépendant respectivement du couple température pH, et de la nature du sel.

La nature des sels est un important facteur de variation car la capacité des ions à précipiter les protéines varie. Les anions suivent la série de Hofmeister :

$SCN < ClO_4 < NO_3 < Br < Cl < CH_3\text{-}COO < SO_4 < \underline{PO_4}$

Quant aux cations, les monovalents sont les plus efficients d'après Arakawa et Timasheff (1982) cités par Scopes (1987), avec :

$Na < \underline{K} < \underline{NH_4}$.

Les modifications de force ionique dans le muscle au cours de la maturation peuvent donc entraîner des modifications de solubilité des protéines par affaiblissement ou par rupture des liaisons interprotéiques.

Penny (1970) et Zeece *et al.* (1986b) observent d'ailleurs une augmentation de la solubilité des protéines myofibrillaires pendant cette période.

1-3-2-2 Activations d'enzymes

1-3-2-2-1 Activateurs de la glycolyse

La phosphofructokinase (PFK) est une des enzymes clés de la régulation de la glycolyse. Elle est inhibée par l'ATP. Cependant cette inhibition est freinée par le phosphate inorganique, dont on sait qu'il est libéré pendant l'établissement de la *rigor* par hydrolyse de l'ATP (Sols, 1981 ; Kemp et Foe, 1983). Or NH_4^+ est un puissant activateur de la PFK (Beitner, 1984), K^+ également et les concentrations de ces 2 ions augmentent.

L'activité de la PFK et par la même, la vitesse de la glycolyse sont emballées peu après la mort, par l'action d'ions phosphates qui lèvent une inhibition et du couple ammoniac-potassium qui active cette enzyme.

1-3-2-2-2 Activateurs de la protéolyse

Ouali (1990) dans une revue, citant un doublement de la pression osmotique pendant l'établissement de la *rigor mortis* envisage une synergie entre le potentiel enzymatique protéolytique de la cellule musculaire et l'évolution des paramètres physico-chimiques du milieu (force ionique et pression osmotique). Geesink *et al.* (1992) relatent une corrélation négative entre osmolalité du jus de viande obtenu après centrifugation et tendreté à 8 jours *post mortem*. Yu *et al.* (1984) cités par Wu et Smith (1987) constatent qu'une force ionique élevée abaisse les interactions actine-myosine pendant le stade *rigor*. A l'opposé pour Roulet *et al.* (1993), un abaissement de la force ionique en dessous de 0,1 M entraîne une susceptibilité beaucoup plus importante des fragments LC1', LC2' et LC2" à l'action de la papaïne et de la trypsine. Ils attribuent cet effet de la force ionique à un changement de conformation de la molécule de myosine. Une modification de la force ionique peut donc sensibiliser les protéines myofibrillaires à l'action des enzymes protéolytiques.

Kerth *et al.* (1995) améliorent la tendreté d'échantillons de viande bovine par perfusion de $CaCl_2$ à 48 heures *post mortem*. Takahashi *et al.* (1987) avaient émis l'hypothèse d'une action non enzymatique du calcium, qui localement concentré (10^{-4} mole) solubiliserait l'α-actinine et affaiblirait la strie Z. Koohmaraie *et al.* (1989) ont démontré par perfusion de NaCl et de $CaCl_2$ (respectivement 0,6 et 0,3 molaires) que l'effet du Ca était bien d'origine enzymatique. En effet son action sur l'attendrissage est immédiat (1 J pm) alors

que le NaCl entraînait une intensification de la maturation mais plus tardive (6 J pm). NaCl agirait donc en augmentant la force ionique et $CaCl_2$ en activant le système enzymatique Ca dépendant (fig. 1-1-3-**1**).

Nous pouvons donc affirmer que le déroulement de la protéolyse est affecté par les facteurs qui agissent aussi bien sur la quantité d'ions relâchés que sur leur vitesse de libération.

Nous considérons comme composés métaboliques les composés issus du métabolisme *post mortem* (tabl. 1-3-2-**1**) par opposition aux composés minéraux non issus du métabolisme (tabl. 1-3-2-**2**).

Tableau 1-3-2-**1** : Principaux métabolites libérés lors de l'installation de la *rigor mortis* et leurs actions respectives

Nom	Origine	Action principale
NH_4^+	adénylate déaminase AMP ----------> IMP NH_4^+	Phosphofructokinase activée et effet tampon
PO_4	Glycolyse, Systèmes ATPasiques	Force ionique et pouvoir tampon augmentés
ANP	Protéolyse	Force ionique et pouvoir tampon augmentés
Acides 3P et 1,3diP glycériques Acide pyruvique	Métabolites intermédiaires de la glycolyse	Chute du pH
Acide lactique	Métabolite terminal de la glycolyse anaérobie	Chute du pH, augmentation de la force ionique
Nucléotides	Déphosphorylation	Force ionique augmentée
Acides aminés libres	Début de la protéolyse	Force ionique et pouvoir tampon augmentés

Tableau 1-3-2-**2** : Principaux composés ioniques non métaboliques libérés lors de l'établissement de la *rigor mortis* et leurs actions respectives

Elément	Origine	Action principale
Ca^{2+}	Réticulum sarcoplasmique, parvalbumines	Déclenche la protéolyse par activation des calpaïnes
Mg^{2+}	Idem plus composés phosphorylés dégradés	Force ionique augmentée
K^{+}	Désadsorbé des protéines par la chute du pH	Force ionique augmentée
Na^{+}, Cl^{-}	Perméabilité membranaire modifiée, désabsorption	Force ionique augmentée
H_2CO_3	Système tampon sanguin	Effet tampon

Les ions qui ne sont pas tous présents dans le sarcoplasme sous forme libre sont libérés lors de l'établissement de la *rigor mortis*. La cinétique de libération, mal connue, est elle aussi soumise à de nombreux facteurs de variation. Le principal est le déroulement de la glycolyse *post mortem* mais d'autres facteurs peuvent intervenir tel le génotype halothane pour le calcium.

La libération de ces ions induit un changement profond du milieu physico-chimique sarcoplasmique avec notamment une augmentation de la force ionique ou de la pression osmotique. Les ions peuvent agir sur les phénomènes protéolytiques par le biais de ces altérations des conditions du milieu ou directement en activant des protéases.

1-3-2-3 La libération des produits de la protéolyse

1-3-2-3-1 Acides aminés et pouvoir tampon

La protéolyse libère des dipeptides et des acides aminés au cours de la maturation. Lorsque le pH est proche de 6, hormis l'arginine, la lysine et l'histidine qui sont saturés en protons ou les acides aspartique et glutamique, sous forme d'anions tous les acides aminés libres sont sous forme amphotère. Leur point isoélectrique est proche de 6, c'est le moment où pour un proton ajouté dans la solution le pH variera le moins. Les acides aminés libres sont donc aptes à exercer un pouvoir tampon non négligeable entre les pH 6,6 et 5,6. Haddad (1995) explique le fort pouvoir tampon de la viande de lapin par rapport à la viande d'autres espèces par une teneur en ANP plus élevée. Cette

augmentation du pouvoir tampon peut avoir une incidence sur un traitement *post mortem* tel que la marinade (Gault, 1991).

1-3-2-3-2 Les acides aminés libres de la viande et les réactions de Maillard

La composition aromatique des viandes cuites dépend de nombreux facteurs incluant en particulier le type de cuisson, la nature et la quantité des précurseurs d'arôme (acides gras, AA ou peptides et sucres) présents avant cuisson.

L'oxydation des lipides produit des aldéhydes, alcanes, alcools (Rossi *et al.*, 1995) alors que les réactions de Maillard conduisent à une dégradation des sucres en furans, furanones, pyranones, carbonyls aliphatiques ou cycliques qui peuvent réagir avec des groupements amines ou subir une dégradation de Strecker pour donner des composés hétérocycliques azotés : pyrazines, pyrroles, pyridines, thiazoles et oxazoles (Baltes, 1990), indispensables à l'arôme typique de viande rôtie (Chang et Peterson, 1977 cités par Rossi *et al.*, 1995). Les acides aminés peuvent aussi donner des composés soufrés (méthionine ou cystéine). D'après Baltes (1990), les acides aminés ont des vitesses de dégradation de Strecker qui leur sont propres, avec dans l'ordre décroissant : ARG, GLY, THR, SER, LYS, PHE, LEU, GLU, ILE, ASP, ALA. La glycine a une vitesse 5 fois supérieure à celles de l'acide aspartique et de l'alanine. De plus certains acides aminés sont des précurseurs favoris de certains composés aromatiques. SER et THR donnent par décarboxylation pyrolytique des pyrazines. CYS donne des thiazoles et des résidus MET ou CYS peuvent être dégradés en diméthylsulfure. Hertz et Schallenberg (1960) cités par Baltes (1990) obtiennent un arôme spécifique pour chaque acide aminé chauffé avec un même sucre.

1-3-3 Les facteurs de variation de la protéolyse

Divers facteurs semblent modifier la protéolyse à travers une variation de la teneur en enzymes, en inhibiteurs ou ces deux paramètres étant égaux en affectant l'activité même de l'enzyme.

1-3-3-1 Effets des conditions de stockage

Un abaissement de la température (5°C) ralentit cette réaction et augmente la durée d'activité de la µcalpaïne pendant le stockage (Koohmaraie, 1992a). L'activité testée *in vitro* à cette température par Zeece *et al.* (1986b) existe mais demeure très faible. En général l'activité des enzymes

testée *in vitro* augmente avec la température. Hertzman *et al.* (1993) observent une *rigor* plus fortement développée (racourcissement des sarcomères supérieur et force de tension développée plus élevée) pour une température de 37°C que celle observée à 15°C. Paradoxalement Yu et Lee (1986) rapportent que des températures de 27 et 35°C accélèrent le processus d'attendrissage de la viande (même force de cisaillement atteinte plus tôt) par rapport à des températures de 1 et 4°C. Cependant à température élevée l'autolyse de la calpaïne prend le pas sur son activité protéolytique envers les protéines du muscle (Dransfield, 1994). Son action est très forte et rapide (attendrissage rapide) mais elle cesse rapidement (attendrissage de faible amplitude).

L'activité de la cathepsine D est plus forte après un cycle de congélation-décongélation (Valin, 1970), certainement par rupture plus totale des membranes lysosomales.

Un facteur non remis en cause est l'effet de la durée de stockage. En effet l'allongement de celle-ci a toujours un effet améliorateur sur la tendreté jusqu'à obtention d'un plateau dit de dureté résiduelle. Les animaux ont une vitesse d'attendrissage variable (ils arrivent plus ou moins vite au plateau) et ont une dureté résiduelle variable (le plateau est plus ou moins élevé).

1-3-3-2 La chute du pH *post-mortem*

Ouali (1990) dans une revue, indique qu'il existe une corrélation entre la vitesse et l'amplitude de chute du pH d'une part et l'intensité et la vitesse de maturation des viandes d'autre part.

1-3-3-2-1 Effet de la vitesse de chute du pH

Chrystall et Devine (1985) expliquent l'impact de la stimulation électrique sur les qualités organoleptiques de la viande par la modification de la vitesse de chute du pH. Marsh *et al.* (1988) proposent que le pH à trois heures *post mortem* soit utilisé comme indicateur de la tendreté de la viande. Marsh *et al.* (1987) observent une tendreté maximale pour un pH de 6,1 à trois heures *post mortem*, observation confirmée par Pike *et al.* (1993) qui rapportent une tendreté maximale pour un pH_3 de 6,0. Ces valeurs sont obtenues après stimulation électrique respectivement à basse et haute tension. A l'opposé Schackelford *et al.* (1994) réfutent l'utilisation du pH_3 comme indicateur de la tendreté.

Lorsque le pH chute et que le calcium commence à être libéré par le reticulum sarcoplasmique (Dransfield, 1992), la µcalpaïne pourrait être activée,

elle commence à agir. Puis elle est inhibée par la calpastatine. Le pH décroissant toujours l'affinité enzyme-inhibiteur décroît, l'enzyme est de nouveau activée. Puis l'enzyme est peu à peu dégradée et son activité décroît à nouveau pour atteindre 0 vers 3 jours *post mortem* (Whipple *et al.*, 1990 ; Dransfield, 1993). Lorsque le pH chute vite, l'activation est rapide, l'attendrissage aussi mais de court durée (Dransfield, 1994).

La vitesse de chute du pH peut donc devenir un facteur limitant de l'action des calpaines.

1-3-3-2-2 Effet du pH_u

Yu et Lee (1986) observent une moindre protéolyse pour des pH_u compris entre 5,8 et 6,3. Pour un pH_u inférieur à 5,8 ce sont surtout la ligne M et les HMM qui sont dégradées. Pour un pH_u supérieur à 6,3 ce sont surtout les stries Z. Chez l'agneau Devine *et al.* (1993) font une constatation identique à celle de Yu et Lee chez le bovin. Watanabe *et al.* (1996) observent une tendreté minimale pour un pH_u de 6,07 et une protéolyse minimale (MFI) pour un pH_u de 6,4. Une tendreté maximale est obtenue pour des pH_u supérieurs à 6,7 ou inférieurs à 5,9.

Dransfield (1992) indique une corrélation positive entre le pH_u et la force de cisaillement des muscles. De même chez le veau, Guignot *et al.* (1994) observent une corrélation positive entre le pH_u et la qualité organoleptique appréciée par un jury de dégustation.

Zeece *et al.* (1986a) observent une action maximale *in vitro* de la cathepsine D plus forte pour un pH de 5,5 et une température de 37°C. Un pH plus élevé diminue la protéolyse observée. Un traitement permettant de jouer sur le rapport chute de pH / chute de la température (comme la stimulation électrique) permettrait en augmentant ce rapport d'accroître l'action de la cathepsine D.

Madruga et Mottram (1995) en modifiant le pH de la viande avant cuisson à 140°C avec un apport d'HCl modifient les composés obtenus. Quand le pH décroît (pH=4), la proportion de composés soufrés augmente et quand le pH est plus élevé (5,6) la formation de thiazoles et de pyrazines augmente. L'amplitude des variations de pH utilisée est cependant assez forte et excepté sur des viandes DFD ou marinées ce facteur a peu de chance d'intervenir.

1-3-3-3 Effets du type de muscle

1-3-3-3-1 Intensité de la protéolyse

Ouali *et al.* (1988) observent une intensité de la protéolyse plus importante dans le long dorsal du porc (de type IIa) que dans le semitendineux (de type

mixte) et le trapèze (type I). Cette observation est sans doute expliquée par les deux faits suivants :

-chez le boeuf, l'agneau et le porc le ratio calpaines/calpastatine est plus élevé dans les muscles à contraction rapide (Ouali et Talmant, 1990). L'inhibition pourrait donc être plus forte pour les muscles lents.

-les teneurs en cathepsines B et L décroissent avec la vitesse de contraction du muscle (Ouali, 1990).

Ouali et Talmant (1990) observent un ratio (calpaïne II/ calpastatine) plus élevé dans les muscles blancs rapides mais le masséter (rouge lent) fait exception.

L'effet type de muscle n'est pas indépendant de l'effet pH_u et vitesse de chute de pH puisque ces deux facteurs sont conditionnés respectivement par les réserves énergétiques et l'équipement enzymatique glycolytique du muscle qui varient avec son type métabolique notamment.

1-3-3-3-2 Variabilité des produits terminaux de la protéolyse

Rossi *et al.* (1995) observent des composés issus de réactions de Maillard spécifiques selon le muscle étudié. Après cuisson à 100°C, le toluène apparaît spécifique du *Diaphragma* et le 2-3butadione ou le disulfure de méthyle spécifiques du *Psoas Major*. L'activité exopeptidasique de l'alanylaminopeptidase ou aminopeptidase B est plus faible dans le *Biceps femoris* de porc que dans le *Longissimus dorsi* ou le *Semimembranosus* d'après Flores *et al.* (1996) ce qui pourrait engendrer un pool d'acides aminés libres plus faible. Peu d'informations sont disponibles sur les facteurs qui peuvent affecter en qualité comme en quantité ces produits terminaux de la protéolyse, qui sont au coeur de la formation des arômes de la viande cuite.

1-3-3-4 Effets de facteurs d'élevage

L'âge (Whipple et Koohmaraie, 1992), le sexe (Morgan *et al.*, 1993) et l'utilisation de β-agonistes (Pringle *et al.*, 1993) peuvent affecter le ratio calpaïnes/calpastatine et ainsi affecter l'activité *post mortem* des calpaïnes.

L'espèce est le principal facteur de variation de la vitesse de maturation mais chez l'agneau, le porc, le poulet et le lapin, le potentiel protéolytique n'a pu être mis en relation avec cette vitesse d'attendrissage (Blanchard et Mantle, 1996).

Le métabolisme énergétique *post mortem* entraîne des modifications des conditions physico-chimiques de la cellule musculaire. Cette évolution cause un déséquilibre dont la conséquence majeure est un déclenchement de l'activité protéolytique qui va affaiblir la structure du muscle. Si les enzymes qui interviennent sont identifiées, leur contribution relative à l'attendrissage est peu connue même si actuellement le rôle principal est attribué aux calpaïnes. Leurs effets ont été testés *in vitro*, dans des conditions qui ne correspondent pas au milieu complexe dans lequel elles évoluent *in situ*. Hormis pour le pH, ce milieu n'est pas connu précisément alors que de nombreux travaux ont montré l'impact que pouvait avoir le milieu sur l'activité des protéases. De plus certains composés azotés peuvent être la source du développement de la flaveur de la viande. Cette étude a pour objectif de mieux connaître l'évolution *post mortem* des composantes du milieu, en particulier les ions libres (minéraux ou organiques) et la fraction azotée non protéique (peptidique ou aminée libre). Elle s'attache également à estimer l'impact que pourraient avoir ces fractions sur le déroulement de la protéolyse *post mortem*.

2-MATERIEL ET METHODES

2-1 Description des protocoles expérimentaux

2-1-1 Déclenchement précoce de la glycolyse, libération des ions et protéolyse

2-1-1-1 Objectifs

Le but est d'étudier les relations entre la chute du pH, la libération des ions et la protéolyse *post mortem*. Deux expériences ont été mises en place, l'une chez le lapin et l'autre chez le chevreau.

2-1-1-2 Animaux et procédé d'abattage

2-1-1-2-1 Expérience 1 : lapins

2-1-1-2-1-1 Animaux

Dix lapins de sexe mâle, de poids vif moyen de 2,7 kg (cv=5 %), âgés de 80 jours ont été utilisés. Tous issus de portées différentes, ils ont été sevrés à 28 jours et ont reçu la même ration alimentaire. Ces animaux de souche industrielle ZIKA (de type lourd) proviennent d'un élevage hors-sol de la région. Ils ont été transportés au laboratoire une semaine avant l'abattage afin qu'ils reconstituent leurs réserves énergétiques. En effet le transport provoque un stress susceptible d'entraîner une glycolyse intense. Ils ont été logés en cases individuelles. L'affectation à l'un où l'autre des traitements est décidée par tirage au sort juste avant la série d'abattage de manière à adopter un dispositif en randomisation totale.

Le poids moyen de carcasse à chaud de 1,45 kg (cv=7 %) correspond à un rendement moyen à chaud sans tête de 53,4 % (cv=3 %). A âge identique (entre 84 à 91 jours) les rendements calculés à partir des valeurs fournies par Perrier et Ouyahoun (1993) sur des croisés de poids vif 2,88 kg (ZIKA*INRA 1067) et sur des croisés de poids vif 2,65 kg (Néo-Zélandais*INRA 1067) sont respectivement de 47,5 % et 47,7 %.

Tableau 2-1-1-**1** : Caractéristiques des carcasses de lapins

	Témoins		Stressés		Probabilité (%)	Moyenne
	m	σ	m	σ		
Poids vif (kg)	2,71	0,17	2,68	0,09	69	2,70
Poids chaud(kg)	1,46	0,10	1,44	0,10	80	1,45
Rendement (%)	53,2	1,50	53,6	2,30	75	53,4
pH ultime	5,78	0,15	5,73	0,09	48	5,75

Le génotype ZIKA semble avoir eu un meilleur rendement. Il n'y a pas de différence significative entre animaux stressés et témoins (tabl. 2-2-1-**1**).

La composition moyenne (en p100 de matière fraîche) du muscle Long dorsal de nos animaux (tabl. 2-1-1-**2**) n'est pas différente des résultats d'Ouyahoun (1992) qui cite des teneurs en protéines totales allant de 20,8 à 23,3 % suivant les muscles et une teneur moyenne de 1% en lipides pour le Long Dorsal. Il n'y a pas de différence significative entre les deux lots.

Tableau 2-1-1-**2** : Composition chimique du *Longissimus Dorsi*

Fractions (%)	Témoins		Stressés		p (%)
	m	σ	m	σ	
Eau	75,2	0,60	74,8	0,45	19,5
Protéines	23,0	0,53	23,0	0,41	89,2
Lipides	1,12	0,12	1,17	0,09	42,8
Cendres	1,09	0,05	1,13	0,07	31,7

2-1-1-2-1-2 Abattage

Cinq lapins subissent deux décharges électriques (1,5 V à 3 s d'intervalle). Cinq minutes plus tard, ils sont étourdis mécaniquement avant la saignée : modalité stressante.

Les 5 autres sont déposés dans un carton avec 10 ml d'éther durant 90 secondes. Puis ils sont étourdis mécaniquement et saignés : modalité non stressante.

L'ablation de la tête est effectuée lors du dépeçage.

2-1-1-2-1-3 Refroidissement

Les carcasses sont pesées, suspendues par les pattes arrières et refroidies en chambre froide à 4°C immédiatement après dépeçage (15 minutes après abattage).

2-1-1-2-2 Expérience 2 : chevreaux

2-1-1-2-2-1 Animaux

Tous les animaux sont de race alpine chamoisée et ont reçu une ration à base de luzerne déshydratée et de blé concassé avec du foin à volonté.

2-1-1-2-2-1-1 Expérience 2a : effet de la cinétique de refroidissement sur la libération des ions

Six chevreaux d'âge moyen 5,6 mois (σ=1mois) ont été abattus. Leur poids vif moyen était de 26,6 kg (σ=1,4kg) avec un rendement moyen à chaud sans la tête de 40 % (σ=3).

2-1-1-2-2-1-2 Expérience 2b : effet du pH ultime sur la libération des ions

Six chevreaux d'âge moyen 3,9 mois (σ=0,4) ont été abattus. Leur poids vif moyen était de 24,3 kg (σ=1,1) avec un rendement moyen à chaud sans la tête de 42,6 % (σ=3,5). Trois d'entre eux ont été traités avant abattage. Ils ont reçu 2 injections d'adrénaline (epinephrine, Sigma) à une dose de 2 mg/kg à 24 et 16 heures *ante mortem*. Ils ont été manipulés pendant 5 minutes avant abattage.

2-1-1-2-2-2 Abattage

Tous les animaux sont abattus au laboratoire. Ils sont étourdis mécaniquement, suspendus puis saignés.

2-1-1-2-2-3 Refroidissement

2-1-1-2-2-3-1 Expérience 2a

Les carcasses sont fendues en deux 45 minutes après abattage et pesées. L'une des demi-carcasses est mise en chambre froide immédiatement (4 °C), c'est la 1/2F tandis que l'autre reste pendant 4 heures à une température de 20 °C avant d'être mise en chambre froide, c'est la 1/2C. Les demi-carcasses sont suspendues par la patte arrière.

2-1-1-2-2-3-2 Expérience 2b

Les carcasses sont mises en chambre froide (4 °C) 50 minutes après abattage.

2-1-1-3 Mesures effectuées

2-1-1-3-1 Expérience 1 : Lapins

Le pH est relevé à 0,25, 2, 3, 5, 6, 10, 12, 24 et 48 heures *post mortem*. Les mesures de pH sont toutes effectuées dans une incision située à 1,5 cm du corps vertébral, dans la partie arrière gauche de l'*erector spinae* ou *longissimus lumborum*. Des prélèvements sur les muscles *Longissimus* sont effectués à 0.25, 6, 12, 48 et 144 heures *post mortem* pour doser les ions libres, l'azote non protéique et la solubilité myofibrillaire. Sur 2 de ces prélèvements (0.25 et 48 h), sont réalisées des électrophorèses myofibrillaires.

Le prélèvement réalisé à 48 heures *post mortem* sert à la détermination des teneurs en matière sèche, azote total, minéraux totaux et lipides.

2-1-1-3-2 Expérience 2 : Chevreaux

2-1-1-3-2-1 Expérience 2a

La première mesure de pH est effectuée 40 mn après abattage, puis toutes les 30 mn pendant 4 h et toutes les heures jusqu'à 10 h *post mortem*. Les 2 dernières valeurs sont obtenues à 24 et 48 h *post mortem*. Ces données servent à établir une équation de chute du pH dont on utilise ensuite les paramètres.

Des prélèvements de LD (environ 7g) sont effectués à 2, 6, 12, 18 et 48 heures *post mortem* pour doser les ions libres.

Le prélèvement réalisé à 48 heures *post mortem* sert à la détermination des teneurs en matière sèche, azote total, minéraux totaux et lipides.

2-1-1-3-2-2 Expérience 2b

Le pH est mesuré toutes les heures entre l'abattage et 12 h *post mortem*. Il est à nouveau mesuré à 24 et 48 h.

Des prélèvements de LD sont réalisés à 1, 4, 12 et 24 h *post mortem* pour déterminer les teneurs en minéraux libres.

Les muscles de ces animaux ont également été utilisés pour étudier l'évolution des composés aminés de faible poids moléculaire (paragraphe 2-1-3-3).

2-1-1-4 Analyse statistique

2-1-1-4-1 Expérience 1 : Lapins

L'analyse des données est effectuée sous STAT-ITCF. L'analyse de variance porte sur le facteur stress comportant deux modalités stress et absence de stress, avec 5 répétitions selon un dispositif en randomisation totale. Les probabilités données dans les tableaux de résultats sont celles du test bilatéral de comparaison de moyenne sous la modalité deux échantillons indépendants.

2-1-1-4-2 Expérience 2 : Chevreaux

2-1-1-4-2-1 Expérience 2a : Effet de la cinétique de refroidissement

Deux tests de comparaison de moyennes sont réalisés sous STAT-ITCF pour comparer les teneurs en minéraux libres entre les demi-carcasses refroidies précocement et celles refroidies tardivement. Ils sont effectués pour les valeurs à 4 h et 24 h *post mortem*.

2-1-1-4-2-2 Expérience 2b : Effet du pH ultime

Une première comparaison de moyennes est réalisée sous STAT-ITCF pour tester la différence de pH ultime entre les deux traitements afin de vérifier que le traitement à l'adrénaline a bien été efficace.

Deux autres comparaisons de moyennes sont effectuées pour tester les différences de concentrations en minéraux libres entre traitements à 1 h et 24 h *post mortem*.

2-1-2 Evolution des acides aminés libres, mise en relation avec d'autres indicateurs de protéolyse

2-1-2-1 Objectifs

Il s'agit de mesurer les variations des teneurs en acides aminés libres (AA libres) au cours de la maturation, d'étudier les relations avec la dégradation de la structure myofibrillaire.

2-1-2-2 Animaux

2-1-2-2-1 Expérience 3

21 taurillons Prim'Holstein âgés de 17 à 21 mois ont été abattus en abattoir industriel (Metz, 57). Une partie du muscle *Longissimus dorsi* a été prélevée 24 h après abattage, divisée en deux parts, mise sous vide et stockée à 4 °C pendant 2 et 9 jours (J3 et J10).

2-1-2-2-2 Expérience 4

8 taurillons Prim'Holstein âgés de 17 à 22,5 mois ont été abattus en abattoir industriel (Metz, 57). 3 muscles ont été étudiés : *Longissimus dorsi* (LD), *Triceps brachii caput longum* (TB) et *Rectus femoris* (RF). Les muscles ont été prélevés 24 heures après abattage, coupés en 4 parties, emballés sous vide et stockés à 4 °C pendant 2, 4, 9 ou 13 jours.

2-1-2-3 Mesures effectuées

2-1-2-3-1 Expérience 3

L'âge, le pH ultime, le poids de carcasse ont été relevés pour tous les animaux. Les concentrations en acides aminés libres ont été déterminées à J3 et J10.

2-1-2-3-2 Expérience 4

La matière sèche, l'azote total et le collagène total ont été mesurés sur un prélèvement à J1. L'indice de fragmentation myofibrillaire et la composition de la fraction aminée ont été déterminés pour chaque muscle à J3, J5, J10 et J14.

2-1-2-4 Analyse statistique

2-1-2-4-1 Expérience 3

Une matrice de corrélation entre teneurs en AA libres, âge, temps et poids de carcasse a été calculée. Un test de comparaison de moyenne a été réalisé pour comparer les concentrations à J3 et à J10 sous STAT-ITCF.

2-1-2-4-2 Expérience 4

L'analyse statistique a été réalisée sous la procédure GLM (SAS). Le modèle utilisé (annexe **A-1**) était muscle, temps, interaction muscle*temps, animal, et interactions animal*muscle et animal*temps. Les trois derniers ont été randomisés. Afin de déterminer le jour pour lequel l'augmentation des acides aminés libres était significative, nous avons utilisé la méthode des contrastes.

2-1-3 Evolution de la fraction peptidique

2-1-3-1 Objectifs

Etudier l'évolution de la fraction peptidique lors de l'installation de la *rigor mortis* et lors de la maturation dans trois muscles striés de chevreaux ainsi que l'impact du pH_u sur ces évolutions.

2-1-3-2 Animaux

Les animaux sont les chevreaux utilisés pour l'expérience 2b (paragraphe 2-1-1-2-2-1-2). Le traitement à l'adrénaline donne bien deux groupes d'animaux dont le pH ultime diffère significativement (tabl. 2-1-3-**1**).

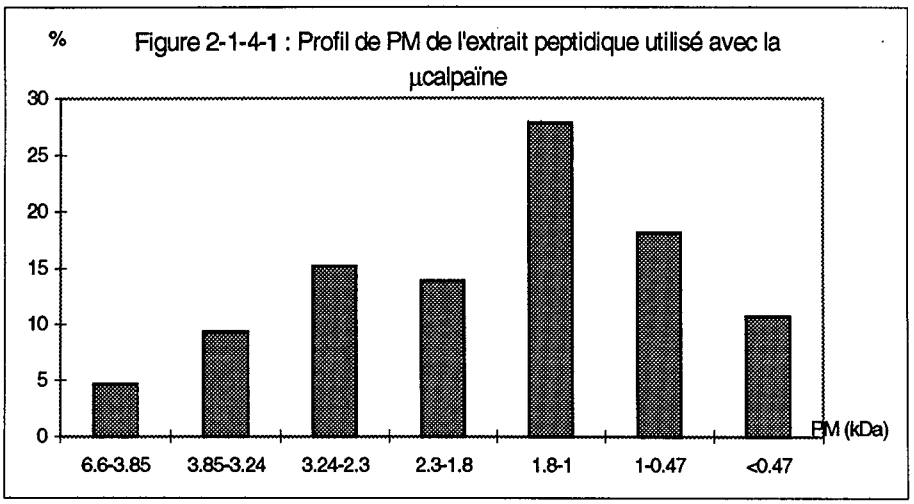
Tableau 2-1-3-**1** : Comparaison des pH ultimes des chevreaux

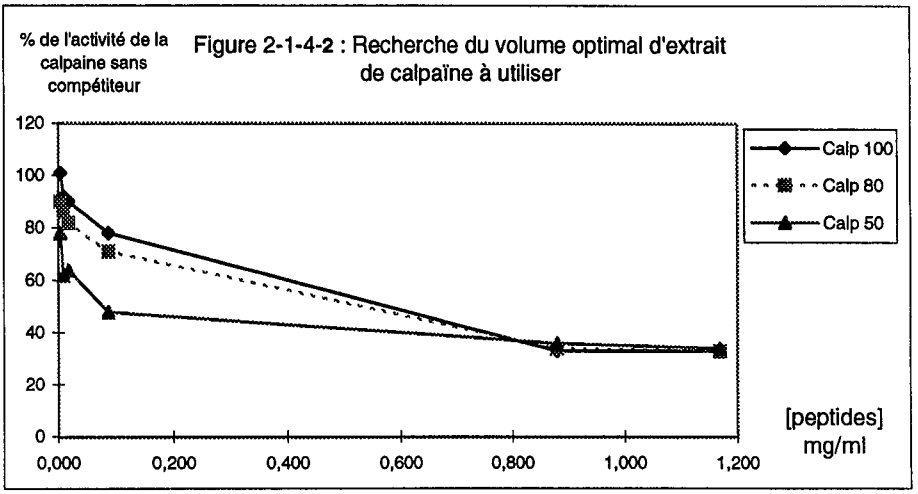
	Témoins pH<6		Traités pH>6		
Muscle	m	σ	m	σ	p
Longissimus dorsi	5,55	0,07	6,32	0,30	*
Semimembranosus	5,54	0,04	6,36	0,27	**
Triceps brachii	5,85	0,08	6,49	0,28	*

* , p<0,05 ; **, p<0,01.

2-1-3-3 Mesures effectuées

La première mesure de pH est effectuée 40 mn après abattage, puis toutes les 30 mn pendant 4 h et toutes les heures jusqu'à 10 h *post mortem*. Les 2 dernières valeurs sont obtenues à 24 et 48 h *post mortem*. Ces données servent à établir l'équation de la courbe de chute du pH dont on utilise ensuite les paramètres.


%
Figure 2-1-4-1 : Profil de PM de l'extrait peptidique utilisé avec la µcalpaïne
30
25
20
15
10
5
0
PM (kDa)
6.6-3.85
3.85-3.24
3.24-2.3
2.3-1.8
1.8-1
1-0.47
<0.47


% de l'activité de la calpaine sans compétiteur
Figure 2-1-4-2 : Recherche du volume optimal d'extrait de calpaïne à utiliser
120
100
80
60
40
20
0
0,000
0,200
0,400
0,600
0,800
1,000
1,200
Calp 100
Calp 80
Calp 50
[peptides] mg/ml

L'étude porte sur trois muscles : le *Longissimus dorsi* (LD), le *Semimembranosus* (SM) et le *Triceps brachii* (TB).

Les prélèvements de LD (environ 7g) sont effectués depuis la 6ème vertèbre lombaire vers la partie thoracique du LD. Après ablation de l'adducteur, le SM est prélevé depuis son attache inférieure vers l'os pubien. Le TB est prélevé du bas de la patte vers l'épaule. Tous les prélèvements se font par ablation d'une portion du muscle qui est découpé perpendiculairement au sens de ses fibres. Les portions prélevées sont trempées dans un bain d'azide de sodium à 0,2 pour mille afin d'éviter les développements bactériens et ensachées sous plastique puis stockées à 2 °C jusqu'à analyse.

Le prélèvement réalisé à 48 heures *post mortem* sert à la détermination des teneurs en matière sèche, azote total et minéraux totaux. L'azote total présent dans l'extrait peptidique a été déterminé par la méthode de Kjeldahl.

Sur les 3 muscles, un extrait peptidique est réalisé à J0 (4 h *post mortem*), J1, J3, J10, et J17 et J24.

La dégradation des protéines myofibrillaires est suivie dans le muscle LD par électrophorèse SDS-PAGE à J1, J10 et J15.

Pour compléter les résultats sur bovin le collagène total et l'hydroxyproline libre à J0, J10 et J24 ont été déterminés dans le muscle LD de 3 chevreaux. La méthode utilisée est une méthode colorimétrique de détermination de l'hydroxyproline (paragraphe 2-2-3-1-5). L'hydroxyproline libre est assimilée à l'hydroxyproline dosée dans l'extrait peptidique après neutralisation.

2-1-3-4 Analyse statistique

Une analyse de variance a été réalisée sous STAT-ITCF pour étudier les effets temps, pH et muscle sur la quantité totale d'azote présente dans l'extrait peptidique.

L'évolution de la fraction peptidique a été analysée par analyses de variance sous la procédure GLM de SAS. Elle a porté sur 6 animaux, hiérarchises par le pH, 3 muscles (LD, SM, TB), 6 temps (J0, J1, J3, J10, J17, J24) et 2 classes de pH (<6 et >6). Le modèle complet est donné en annexe (**A-2**).

2-1-4 Etude de l'interaction peptides-calpaïnes

2-1-4-1 Objectifs

La protéolyse *post mortem* libère des fragments protéiques. Ceux-ci pourraient interagir avec les protéases présentes dans la viande. La majorité de ces protéases ne requièrent pas une conformation ou une longue séquence spécifique

Figure 2-1-4-3 : Comparaison de la répartition des PM de l'extrait de calpaïne avant et après précipitation au pCA

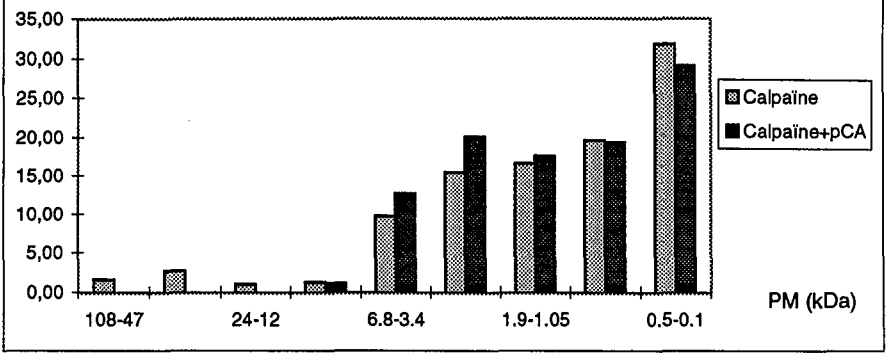
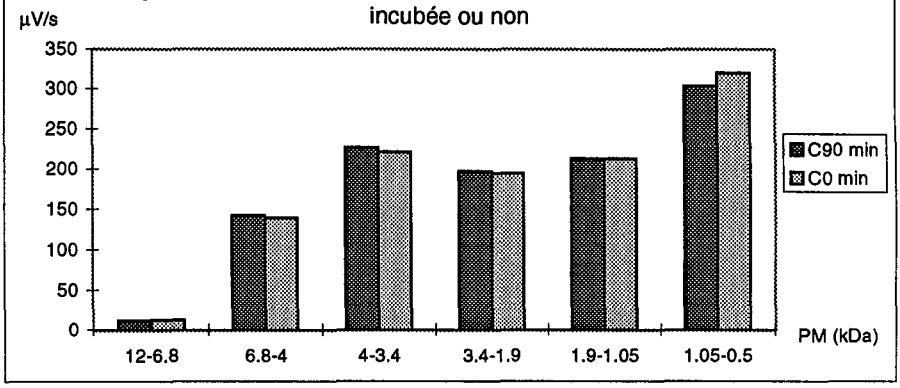


Figure 2-1-4-4 : Comparaison des classes de PM de la calpaïne incubée ou non



du substrat pour le couper. Nous avons étudié l'effet de la présence de ces peptides sur l'activité des calpaïnes.

2-1-4-2 Protocoles

2-1-4-2-1 Action *in vitro* de la µcalpaïne bovine sur un isolat peptidique

L'isolat peptidique est obtenu à partir de muscle LD de chevreau ayant maturé 7 jours (profil de poids moléculaire : fig. 2-1-4-**1**) après précipitation des protéines à l'acide perchlorique (pCA) et neutralisation au carbonate de potassium (méthode décrite au paragraphe 2-3). Les incubations sont réalisées pendant 90 mn à 25 °C avec 200 µl de µcalpaïne bovine, auxquels on ajoute 200 µl de peptides dissous dans du tampon d'incubation puis 100 µl de tampon calcium. La réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µl de pCA 25% suivi d'une centrifugation à 6000 tr/mn à 4°C pendant 10 mn. La solution est neutralisée avec 110 µl de K_2CO_3 2M et à nouveau centrifugée dans les mêmes conditions. Le surnageant est alors injecté sur HPLC.

2-1-4-2-2 Interaction entre isolat peptidique et activité protéolytique *in vitro*

Le substrat synthétique fluorogénique (Succinyl-leucyl-tyrosyl-7méthyl,4amino-coumarine ou SLT, 250 µm final) est incubé avec de la calpaïne pendant 15 mn à 25 °C. Le volume d'incubation est de 300 µl, dont 100 µl d'enzyme, 150 µl de substrat et 50 µl de tampon d'incubation seul ou de tampon d'incubation plus peptides à pH 7,5. La quantité de substrat dégradée est lue par fluorimétrie (fluorimètre Perkin-Elmer), émission 360, lecture 440 nm. Elle est exprimée en pourcentage de l'activité de la calpaïne seule rapportée à un blanc dans lequel les 100 µl d'enzyme sont remplacés par 100 µl de tampon d'incubation. Une des premières expériences a consisté à tester la concentration en enzyme utilisée, 3 volumes de solution enzymatique ont été testés : 50, 80 et 100 µl (fig. 2-1-4-**2**) avec différentes concentrations de peptides. La solution avec 100 µl permet d'obtenir une activité de 100% avec les faibles concentrations de peptides, c'est elle qui a été retenue.

La calpaïne utilisée est un extrait non purifié (fig. 2-1-4-**3**). La préparation contient donc aussi des peptides. Un traitement avec précipitation à l'acide élimine les protéines (absence des pics entre 19 et 25 minutes) comme le montre la figure 2-1-4-**3**. Ces protéines sont en trop faible quantité pour interférer avec les composés de faible poids moléculaire si elles étaient hydrolysées lors de l'incubation. Cependant les peptides contenus dans la solution enzymatique pourraient être dégradés par la calpaïne et polluer l'effet observé sur les peptides. Deux incubations de 90 minutes ont donc été réalisées avec de la préparation de

calpaïne "seule", c'est-à-dire sans peptides qui étaient remplacés par du tampon d'incubation. Il n'y a pas eu de modifications apparentes dans les aires relatives des différentes classes de peptides (fig. 2-1-4-**4**).

Une incubation de la solution enzymatique n'engendre pas de produits de dégradation visibles avec la méthode employée, il est donc probable qu'il n'y aura pas d'interférences parasitaires de l'action de la calpaïne sur l'isolat peptidique introduit.

2-1-4-2-3 Tampons utilisés

Tampon incubation : pH = 7,5, Tris 20 mM, EDTA , β–mercaptoéthanol 0,02 %.

Tampon calcium : pH = 7,5, Tris 20 mM, $CaCl_2$ 25 mM.

Les calpaïnes (extraites selon Dransfield, 1996) ont été fournies par E. Dransfield (avec la coopération du laboratoire de biochimie des viandes du professeur Ouali). L'activité des différentes calpaïnes utilisées a été testée systématiquement par un essai caséinolytique avant chaque série de mesure. 1 ml d'azocaséine (Sigma) + 1 ml d'enzyme et 0,5 ml de tampon calcium ont été incubés à 25 °C pendant une heure. Les protéines sont précipitées par ajout de TCA 3% final. La DO est ensuite lue à 360 nm. Elle est comparée à la DO obtenue pour un blanc réalisé avec 1 ml d'azocaséine (Sigma) + 1 ml de tampon d'incubation et 0,5 ml de tampon calcium incubés à 25 °C pendant une heure et déprotéinisés de la façon précédente.

2-1-5 Etude de l'interaction entre le magnésium libre et le couple calcium-calpaïnes

2-1-5-1 Objectifs

Il s'agit d'étudier l'effet des concentrations de magnésium libre observées dans le muscle sur l'activité de la µcalpaïne.

2-1-5-2 Protocole

L'activité de la µcalpaïne a été testée *in vitro* par hydrolyse de SLT dans un tampon Tris 20 mM (préparé avec de l'eau ultra-pure et sans EDTA) à pH 7,5 suivie par fluorimétrie. Une courbe d'activation de la calpaïne a été établie en fonction d'une gamme de calcium en incubant 200 µl d'enzyme, 200 µl de substrat plus 50 µl d'une solution contenant le calcium pendant 15 minutes à 25 °C. La courbe d'activation par le magnésium a été établie de la même manière mais avec une durée d'incubation de 30 mn.

L'interaction entre calcium et magnésium a été testée en incubant dans le même tampon, pendant 30 mn, 200 µl d'enzyme, 200 µl de substrat, 25 µl de la

gamme de magnésium et 25 µl de tampon ou d'une solution de calcium à 1,31 et 2,61 mM (soit 0,073 et 0,145 mM final).

2-2 Méthodes de dosage

2-2-1 Mise au point d'une méthode de dosage des minéraux libres

La méthode est basée sur la libération des composés dans de l'eau ultra-pure, à une dilution donnée pendant un temps donné. Elle est suivie par une séparation des ions par ultrafiltration et par un dosage simultané soit des cations soit des anions par électrophorèse capillaire.

2-2-1-1 Mise au point de la méthode d'extraction des minéraux "libres"

Les anions minéraux suivants ont été testés : nitrates, sulfates, carbonates, chlorures et phosphates. Les nitrates ne sont apparus que lors de contaminations après un rinçage à l'eau ultra-pure insuffisant après le lavage à l'acide nitrique 52,5 %. De très faibles quantités de sulfate ont été détectées, de l'ordre 0,5 mmol/kg mais ces quantités sont négligeables par rapport aux autres ions et le sulfate n'a pas été étudié. Le carbonate ne donne pas un pic net et provient essentiellement de la contamination par le CO_2 de l'air lors de l'ultrafiltration et du stockage des échantillons, H_2CO_3 n'est pas présent dans le muscle d'après Honikel et Hamm (1974) cités par Winger et Pope (1980-81). Cet anion n'a donc pas été mesuré dans la solution. S'il est présent en faible concentration il ne sera pas libéré de toute façon puisque si le pH décroît, le carbonate est sous forme non ionisée : H_2CO_3. Le calcium n'a pu être dosé avec succès par cette méthode du fait de sa très faible concentration dans les échantillons et de l'impossibilité de laver les filtres en cellulose et la tuyauterie du système Minitan à l'HNO_3 à 52,5%. La dilution et le temps pendant lequel la viande reste en contact avec l'eau ont été testés avec les anions. 3 dilutions (1/80, 1/40, 1/20) et 2 temps (10 et 30 mn) ont été testés pour le chlore, le phosphate et le lactate. Les résultats de l'analyse de variance montrent (tabl. 2-2-1-**1**) que la dilution a un effet sur les quantités d'ions extraites.

Tableau 2-2-1-**1** : Effets du temps et du facteur de dilution sur la quantité d'ions extraits (3 répétitions par unité expérimentale)

	Temps	Dilution	Temps*dilution	80	40	20
Chlore	NS	*	NS	15,9 a^{α}	15,5 a	14,8 b
Phosphate	NS	**	NS	30,6 a	23,6 b	15,1 c
Lactate	NS	*	NS	110,3 a	107,6 a	99,4 b

*, $p<0,05$; **, $p<0,01$; NS, non significatif. α : les valeurs d'une même ligne suivies d'une lettre identique ne diffèrent pas au seuil de 5%.

Excepté pour le phosphate, les dilutions 1/40 et 1/80 ne donnent pas de variation significative de la quantité extraite alors que la dilution 1/20 est systématiquement inférieure. La dilution 1/80 entraîne une concentration trop faible pour les cations lors de l'analyse en électrophorèse capillaire, la dilution 1/40 lui est donc préférée. L'effet temps n'étant pas significatif, c'est la combinaison 1/40 et 10 mn qui a été retenue.

L'effet de la dilution de l'échantillon haché dans 40 fois son volume d'eau ultra-pure sur le pH de la solution d'extraction a été testé. Un lapin a été abattu, maintenu à 20°C et des pièces de Long dorsal ont été prélevées régulièrement depuis la mort de l'animal jusqu'à l'établissement de la *rigor mortis*. Sur ces pièces ont été mesurés le pH dans la viande, le pH de la solution d'extraction immédiatement après dilution (4 g de viande dans 160 ml d'eau, à 20°C) et 10 minutes plus tard. L'évolution de ces pH (tabl. 2-2-1-**2**) montre un décalage du pH d'extraction à 10 mn, systématiquement supérieur à celui mesuré *in situ*. L'écart est quasiment nul pour des pH proches de 7, augmente jusqu'à environ 0,25 unité et se stabilise à 0,2 unité lorsque le muscle a atteint sa capacité tampon maximale après établissement de la *rigor mortis*. Ce pH supérieur provient de la dilution de l'échantillon.

Tableau 2-2-1-**2** : Relation entre pH du muscle et pH de la solution d'extraction

Temps *post mortem* (h)	pH du muscle	pH de la solution d'extraction immédiatement après dilution	pH de la solution d'extraction 10 minutes après dilution
0,25	6,96	6,95	6,96
3	6,67	6,78	6,61
4	6,31	6,73	6,44
5	6,06	6,48	6,34
6	5,78	6,20	6,01
9	5,59	5,97	5,90
10,5	5,58	5,90	5,81
24	5,60	5,91	5,81

Dans notre expérimentation, ont été considérés comme minéraux libres les minéraux solubilisés par dilution (m/v de 1/40) du muscle frais haché dans de l'eau ultra-pure.

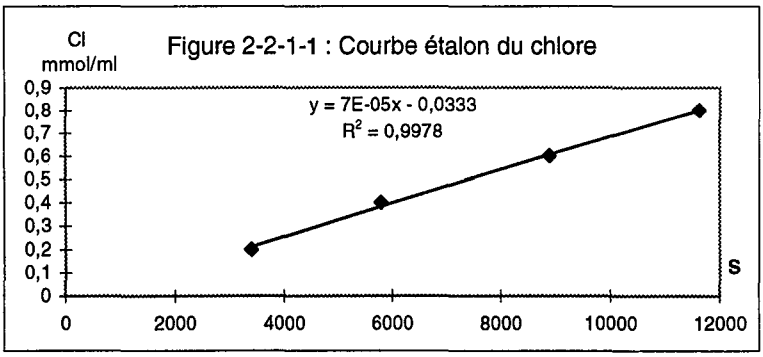


Figure 2-2-1-1 : Courbe étalon du chlore

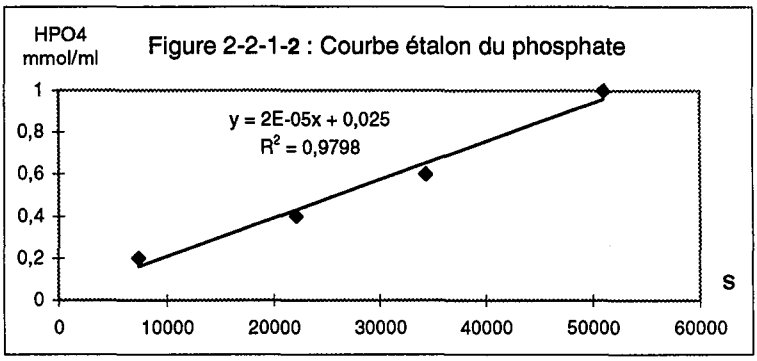


Figure 2-2-1-2 : Courbe étalon du phosphate

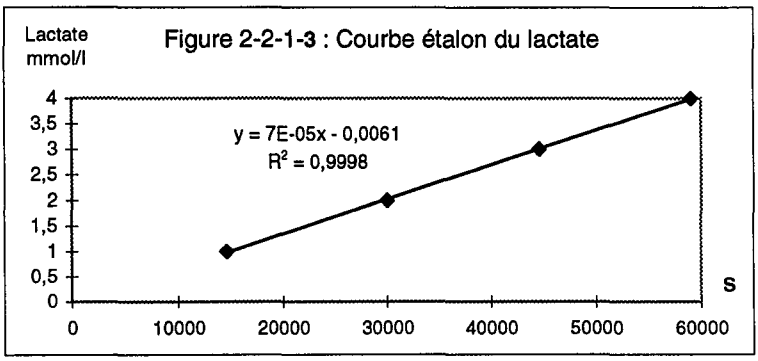


Figure 2-2-1-3 : Courbe étalon du lactate

2-2-1-2 Description de la méthode d'extraction des minéraux libres retenue

Toute la verrerie est au préalable rincée à l'acide nitrique à 50% et 3 fois à l'eau ultra-pure. La viande broyée est homogénéisée à l'aide d'un agitateur en verre dans de l'eau ultra-pure (S>18 Ω/cm^2) dans un rapport masse/volume de 1/40. Après 10 minutes, l'homogénat est filtré sur papier Whatman puis ultrafiltré. L'ultrafiltration est réalisée avec un appareil Millipore (Minitan) avec une membrane de seuil de coupure de 10 kDa. Le volume initial utilisé est de 200 ml, le volume d'ultrafiltrat récupéré est d'environ 160 ml. L'ultrafiltration est réalisée à une pression de 170 kPa.

L'ultrafiltrat est ensuite analysé par électrophorèse capillaire (Waters). Deux analyses sont réalisées, l'une pour les cations, l'autre pour les anions. Dans les deux cas, la colonne capillaire utilisée est une colonne Waters de 75 µm de diamètre et de 60 cm de longueur. Chaque échantillon est passé 2 fois sur la colonne. Les analyses sont réalisées à 25 °C.

2-2-1-3 Dosage des anions

L'éluant est du chromate de potassium préparé comme suit : 5 ml de chromate 0,1 M, 2,5 ml d'OFM-BT (Waters), volume complété à 100 ml avec de l'eau ultra-pure. La constante de temps est réglée à 0,1. Avant le début de la série de mesure, le capillaire est rincé à la soude, à l'eau ultra-pure puis purgé manuellement. Le zéro est réglé lors de la purge avec l'éluant. La longueur d'onde utilisée est de 254 nm, la tension est fixée à 20 kV. Entre chaque échantillon le capillaire est purgé pendant deux minutes avec l'éluant.

La gamme étalon est réalisée en deux étapes. Il faut en effet réaliser deux gammes l'une avec le lactate et l'autre avec les minéraux ; sinon il y a précipitation de sels car le lactate (Sigma) est sous forme de sel de zinc qui réagit avec le phosphate et le sulfate lorsqu'ils sont mélangés. La solution mère de lactate est faite à 40mM ($C_3H_5O_{3.1/2}Zn$). La solution mère de minéraux est préparée avec du phosphate 20 mM ($NaH_2PO_4.2H_2O$), du chlore 20mM (NaCl) et du sulfate ($MgSO_4.7H_2O$). La courbe étalon est établie avec 4 dilutions de chacune de ces solutions mères (fig. 2-2-1-**1** à **3**).

2-2-1-4 Dosage des cations

L'éluant est composé avec 30 mg d'UV-CAT2 (Waters), 60 mg de tropolone (Sigma) et 52 mg de 18crown6-éther (Sigma) dissous dans de l'eau ultra-pure pour un volume final de 100 ml. L'éluant est alors filtré à 0,22 µm (Sartorius). Avant passage de l'échantillon, la colonne est rincée à l'eau ultra-pure puis purgée manuellement avec l'éluant. Lors de la purge, on règle le zéro lorsque l'absorbance est stabilisée. La longueur d'onde utilisée pour la détection est 185 nm. La

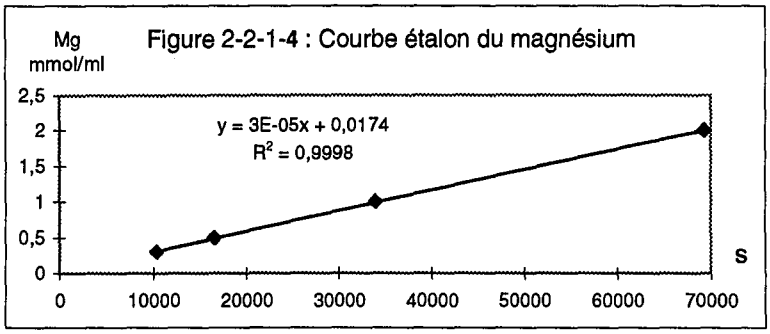


Figure 2-2-1-4 : Courbe étalon du magnésium

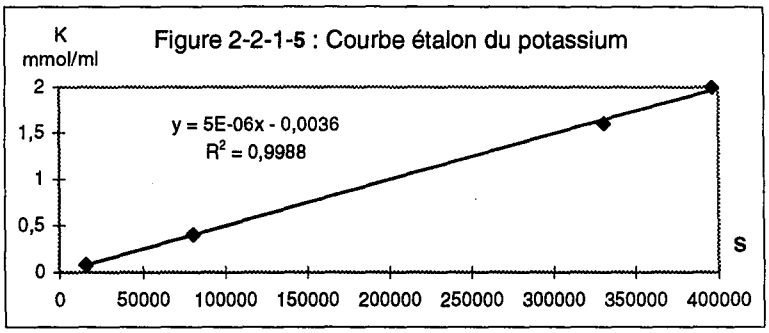


Figure 2-2-1-5 : Courbe étalon du potassium

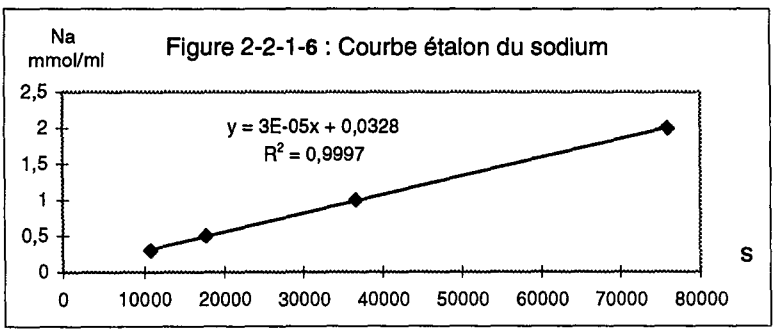


Figure 2-2-1-6 : Courbe étalon du sodium

constante de temps est réglée à 0,3. Le courant est fixé à la valeur stable lue (environ 7 µA) lors de la purge manuelle en début de manipulation.

La gamme étalon est faite dans 250 ml. Sodium 40mM (NaCl), potassium 150mM (KCl), magnésium 20mM ($MgCl_2.6H_2O$), ammoniac 10mM (NH_4Cl) et calcium 1mM ($CaCl_2.2H_2O$). 5 dilutions (de 1/25 à 1/500) sont alors réalisées avec de l'eau ultra-pure pour établir la courbe étalon (fig. 2-2-1-**4** à **6**). Celle-ci est établie à chaque série de mesures.

La méthode d'extraction choisie diffère des méthodes précédemment utilisées dans la bibliographie pour l'approche des minéraux libres (Winger et Pope, 1980-81 ; Jeacoke, 1993). Elle a l'avantage d'extraire tous les ions présents dans la viande et de permettre de les doser y compris les ions organiques. Les résultats pour le calcium n'ont cependant pas été concluants car à sa faible concentration les contaminations notamment lors de l'ultrafiltration sont difficiles à éviter.

Remarque: tous les résultats sont exprimés en millimoles par g (ou par kg) de viande fraîche. En effet la molarité rend mieux compte qu'une masse de l'action quantitative respective exercée par les différents ions sur la force ionique ou sur la pression osmotique.

2-2-2 Mise au point d'une méthode de caractérisation du profil de poids moléculaire de la fraction peptidique

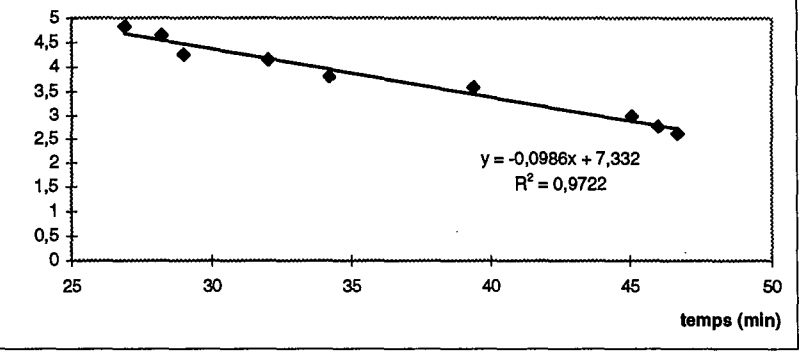
2-2-2-1 Extraction

L'extraction est réalisée avec de l'acide perchlorique (pCA). Le muscle frais est homogénéisé avec un Ultra-Turrax dans du pCA 3% final. L'homogénat est centrifugé à 6000 g pendant 20 mn. Le surnageant est conservé et l'acide est neutralisé par du carbonate de potassium 2 M de telle façon que le nombre de moles de potassium soit égal à 1,5 fois le nombre de moles de pCA. Une centrifugation à 28000 g pendant 20 mn permet d'éliminer le précipité blanc. Le surnageant est alors conservé à -18 °C pour analyse sur HPLC.

2-2-2-2 Analyse

Elle est réalisée sur un chromatographe Waters Action Analyzer (Millipore) couplé à un Waters 486 tunable absorbance detector (Millipore). La colonne utilisée est une colonne à tamisage moléculaire BioSEP-SEC-S de porosité 15 nm (Phenomenex, Interchim) longue de 300 mm pour un diamètre interne de 7,8 mm. L'élution se fait avec un tampon phosphate de pH 6,8 (KH_2PO_4 100 mM) avec un débit de 0,3 ml/mn

Figure 2-2-2-1 : Courbe d'étalonnage de la colonne
log PM=f(temps d'élution)



qui est le débit minimum de séparation sur la colonne. Le volume injecté est de 10 µl. Cependant pour chaque échantillon environ 0,5 ml est passé dans la boucle d'injection afin de la rincer, l'injection est déclenchée après le passage d'environ 400 µl. Le tampon est dégazé régulièrement à l'hélium et après analyse la colonne est lavée à l'eau distillée (0,2 ml/mn).

2-2-2-3 Intégration des chromatogrammes

Comme toutes les injections se font au même débit constant (mode isocratique), le temps d'élution peut être relié directement au poids moléculaire (PM) sans passer par des volumes de rétention.

L'acquisition des données se fait sous le logiciel Maxima (Waters). Une courbe étalon a été réalisée pour établir la relation entre le PM et le temps d'élution (fig. 2-2-2-**1**) avec des composés de poids moléculaire connu (BSA 67 kDa, ovalbumine 45 kDa, inhibiteur de trypsine 21,5 kDa, βlactoglobuline A 18,4 kDa, αlactalbumine 14,2 kDa, aprotinine 6,5 kDa, insuline 3,9 kDa, ocytocine 1 kDa et leupeptine K 0,6 kDa).

La césure entre les surfaces d'intégration se fait en fonction du PM c'est à dire en fonction du temps de rétention pour les parties où les pics sont accolés. En effet les peptides suivis ont une distribution continue de PM. La variation des poids molaires des différents acides aminés présents dans la viande, qui s'étalent de 89 g/mol pour l'alanine à 181 g/mol pour la tyrosine, fait qu'une mole d'un peptide de 10 AA peut peser de 900 à 1800 g. Comme les endoprotéases de la viande n'ont pas de site de coupure spécifique (hormis les métalloprotéases), toutes les longueurs de peptides peuvent être représentées et à l'intérieur d'une classe de peptides constitués d'un même nombre d'acides aminés, une large gamme de poids est possible. Pour pouvoir comparer les différents muscles entre eux et suivre l'évolution au cours du temps d'un même muscle, les chromatogrammes ont été systématiquement coupés aux mêmes temps qui figurent ici sous leur équivalence en PM. La surface de chaque pic ainsi créé a été intégrée et rapportée à la somme des aires de tous les pics pour obtenir une aire relative. Celle-ci exprime la part des peptides de la classe de PM correspondant au sein du pool de peptides.

Les seuils de césure ont été choisis pour plusieurs raisons. Le seuil minimal de séparation de la colonne est en théorie de 1 kDa. Elle a cependant donné des résultats satisfaisants jusqu'au quadripeptide Gly-Phe-Gly-Phe (PM=426) lors de l'établissement de la courbe étalon. Mais le test avec un dipeptide s'est révélé négatif. Nous avons donc considéré que la séparation était correcte jusqu'à un PM de 500 Da. Par conséquent l'aire de la classe 500-81 Da a été prise en compte pour le calcul de l'aire totale car elle correspond bien à une quantité de peptides et

d'acides aminés mais elle n'a pas été utilisée pour étudier l'évolution des classes de PM des peptides car elle n'est pas fiable de ce point de vue.

2-2-3 Autres méthodes de dosage utilisées

2-2-3-1 Etude de la composition biochimique et de la cinétique de chute de pH

2-2-3-1-1 Etude de la cinétique de chute de pH

Le pH est mesuré à la hauteur de la première vertèbre lombaire à la jonction du *Longissimus thoracis* et du *Longissimus lumborum*. La température est systématiquement prise au niveau du point de mesure afin de procéder à une correction manuelle de la température. Le pH-mètre utilisé est un pH-mètre portatif Knick Portamess 751. Il est couplé à une électrode Xerolyt Ingold (363-DXK-S8/120). Pour le bovin cette électrode est enchâssée dans un couteau de perforation Ingold (DXK-S7/125). Chez les autres animaux, une incision est pratiquée au couteau. La vitesse de chute du pH est déterminée à partir de l'équation pH=a + b.log (t+1) (Feidt et Brun-Bellut, non publié).

2-2-3-1-2 Dosage de la teneur en azote total

Elle est réalisée sur 1 g de muscle frais. L'échantillon est minéralisé avec 15 ml d'acide sulfurique concentré avec une pastille de catalyseur (5 g de sulfate de potassium : K_2SO_4, 0,15 g de sulfate de cuivre : $CuSO_4.5H_2O$ et 0,15 g de dioxyde de titane : TiO_2). Il est ensuite dilué à 100 ml. Le dosage par Kjeldahl sur Vapodest automatique (Gerhardt) est appliqué à 10 ml de cette solution diluée.

2-2-3-1-3 Dosage de la teneur en lipides totaux

Elle est réalisée sur 5 g d'échantillon selon la méthode de Folch *et al.* (1957) modifiée. 5 g de muscle sont homogénéisés avec 75 ml d'une solution de chloroforme-méthanol (2:1 en volume). On filtre sur papier puis on ajoute 75 ml de solution de NaCl à 0,88% et on laisse décanter une nuit. La phase supérieure est éliminée et on ajoute 75 ml de solution méthanol-eau-chloroforme (47:48:3) en agitant. Le tout est décanté une nuit. Le lendemain, la phase supérieure est éliminée et la phase organique est évaporée sous vide à 39°C. Le résidu est pesé et représente les lipides totaux.

2-2-3-1-4 Dosage de la teneur en minéraux totaux

3 g de viande broyée (hachoir ménager Moulinex) sont déposés dans une capsule de porcelaine, étuvés à 104 °C pendant 48 heures (détermination de la

matière sèche) et mis au four à moufle (détermination de la teneur en cendres). Une température de 550°C est programmée pendant 7 heures. Après refroidissement les cendres sont dissoutes dans 15 ml d'acide chlorhydrique 1N préparé avec de l'eau ultra-pure. L'échantillon est alors stocké à température ambiante jusqu'à analyse. L'analyse est effectuée sur un spectrophotomètre d'absorption atomique (Perkin Elmer). Sont dosés le magnésium, le potassium et le sodium.

2-2-3-1-5 Dosage de la teneur en collagène total

Il est réalisé selon la méthode de Bonnet et Kopp (1986) basée sur la méthode colorimétrique de Bergman et Loxley (1963). 3 g de muscle frais sont mis à l'étuve pendant 4 h à 100°C dans 15 ml d'acide perchlorique (pCA) concentré. Les tubes sont agités après 15 à 20 mn de chauffage. Après refroidissement on transvase dans une fiole de 100 ml qu'on complète avec de l'eau distillée. On filtre une partie aliquote sur papier Whatman. La fraction est alors diluée avec du pCA 1,8 N afin d'obtenir une concentration finale en hydroxyproline de l'échantillon comprise entre 2 et 20 µg/l.

A température ambiante, on ajoute 0,5 ml de l'échantillon dilué puis 0,5 ml de soude 1,8 N et on agite. On ajoute 1 ml de tampon A en agitant de nouveau. La solution oxydante ajoutée ensuite doit agir 4 mn exactement après agitation, à ce moment le réactif de Ehrlich est ajouté. Les tubes fermés sont incubés à 60 °C pendant 25 mn. Après refroidissement, la DO est lue à 550 nm sur un spectrophotomètre (Beckman DU70) au maximum 1 heure après l'arrêt du chauffage.La gamme étalon est réalisée avec 6 dilutions d'hydroxyproline allant de 2 à 20 µg/l.

2-2-3-2 Estimation de la protéolyse

2-2-3-2-1 Quantification de la fraction d'azote non protéique

Comme la plus petite protéine présente dans la viande est la myoglobine de PM 18 kDa, l'ultrafiltrat ne contient donc pas de protéines (pas de molécules dont le PM excède 10 kDa). L'azote qu'il contient représente bien la fraction ANP.

2-2-3-2-1-1 Extraction à l'acide trichloroacétique (TCA)

5 g de muscle frais sont homogénéisés dans 10 ml de TCA à 10% (100g/l) à l'aide d'un Ultra-Turrax pendant environ 20 s à 10000 tr/mn. L'homogénat est centrifugé à 4000 g pendant 20 mn à 4°C. Le surnageant est conservé et le culot redissous dans 10 ml de TCA 10%. Les deux surnageants sont rassemblés et filtrés dans une fiole jaugée. Le volume est complété à 25 ml.

2-2-3-2-1-2 Dosage de l'azote de la fraction non protéique

La fraction d'azote non protéique (ANP) utilisée peut être de l'ultrafiltrat ou l'ANP-TCA. 10 ml de l'échantillon sont minéralisés avec 10 ml d'acide sulfurique concentré et une demi-pastille de catalyseur. L'azote est alors dosé par Kjeldahl sur Vapodest automatique (Gerhardt).

2-2-3-2-2 Suivi de la dégradation des protéines myofibrillaires

Elle est réalisée selon la méthode de Uytterhaegen *et al.* (1994) par électrophorèse SDS-PAGE dans le laboratoire du professeur Demeyer (Melle, Belgique).

2-2-3-2-2-1 Extraction des protéines myofibrillaires

2,5 g de viande hachée sont homogénéisés dans 25 ml de tampon 1 à 4,5 °C à l'Ultra-Turrax. L'homogénat est centrifugé à 1000 g pendant 10 mn et le surnageant jeté. Le culot est remis en suspension dans 25 ml de tampon 2, centrifugé à 1000 g pendant 10 mn et le surnageant est écarté. Le culot est à nouveau dissous dans 25 ml de KCl 0,15 M et centrifugé à 1000 g pendant 10 mn. 2 g du culot final sont dissous dans 25 ml de tampon échantillon et laissés à température ambiante pendant une nuit. La solution est filtrée sur papier Whatman afin d'éliminer le collagène. L'échantillon est alors congelé à -18°C jusqu'à l'électrophorèse.

Tampon1 : pH 7,6 à 4°C contenant du saccharose 0,25 M, du Tris 0,05 M et de l'EDTA 1 mM.

Tampon 2 : pH 7,6 à 4°C contenant du Tris 0,05 M et de l'EDTA 1 mM.

Tampon échantillon : pH 7,6 à 4°C contenant de l'imidazole 0,01 M, du SDS à 2% et du βmercaptoéthanol à 2%.

2-2-3-2-2-2 Electrophorèse

Les échantillons sont dilués après dosage d'azote (Kjeldahl) jusqu'à une concentration de 4 mg de protéines totales par ml. Sont ajoutés de la sérum albumine bovine (BSA) à 2 mg/ml comme standard interne, 15% de saccharose et environ 0,3 mg/ml de bleu de bromophénol.

Les protéines dont le poids moléculaire est compris entre 10 et 200 kDa sont séparées sur un gel à 8% avec un système de plaques verticales (SE 600, Hoefer). 5 µl sont déposés dans le puits et l'électrophorèse se déroule à une tension constante de 140 V. Les protéines de poids moléculaire allant de 50 à 1000 kDa sont séparées sur un gel à 4,6%, après un dépôt de 10 µl. Le gel a un ratio

acrylamide/bisacrylamide de 31:1. Les protéines sont marquées par immersion du gel dans une solution de bleu de Coomassie à 0,1% pendant 2 heures à 40 °C. Chaque gel est réalisé en double.

La surface des pics est lue sur un densitomètre (GS-670, Bio-Rad). L'aire de chaque pic est divisée par l'aire du pic de BSA et multipliée par 50 pour obtenir une quantité en µg de BSA équivalent/mg de protéine myofibrillaire.

2-2-3-2-2-3 Détermination de l'indice de fragmentation myofibrillaire

L'indice de fragmentation myofibrillaire (IFM) a été estimé par la méthode de Olson *et al.* (1976). 1 g de muscle haché est homogénéisé avec un Ultra-Turrax dans 10 ml de tampon phosphate (KCl 100 mM, phosphate 20 mM, EDTA 1 mM et NaN_3 1 mM). L'homogénat est centrifugé à 4°C. Le surnageant est récupéré, le culot est redissous dans 5 ml de tampon puis recentrifugé à 4°C, l'opération est répétée 3 fois. La teneur en protéines de la solution finale est ajustée à 0,5 mg/ml à 10% près. La densité optique est ensuite lue à 540 nm sur un spectrophotomètre Spectronic 20 (Bausch et Lomb). La valeur d'IFM est la densité optique lue multipliée par 200.

2-2-3-2-3 Caractérisation des acides aminés libres

2-2-3-2-3-1 Extraction

La fraction azotée non protéique est obtenue par la méthode de Rao et Gault (1989) : ANP-TCA (10%). 10 ml de cette solution sont ajoutés à 3 g de résine Amberlite IR 120 avec 100 µl de norleucine (à 1 mg/ml dans de l'HCl 0,1 N) et agités pendant 60 minutes. On procède à 3 rinçages successifs sans agitation avec 20 ml d'eau distillée. Les acides aminés sont ensuite élués avec de l'ammoniaque à 33% avec agitation pendant 10 mn. L'élution est répétée 2 fois et la solution d'ammoniaque récupérée dans un ballon puis évaporée sous vide à 40°C. Les acides aminés sont alors récupérés dans 200 µl d'HCl 0,1 N.

2-2-3-2-3-2 Dérivation

Elle est réalisée selon la méthode de Husek (1991). 200 µl de l'échantillon précédent sont placés dans un eppendorf. On y ajoute 200 µl d'éthanol-pyridine (4:1) qu'on agite au vortex, puis 25 ml d'éthylchloroformiate (ECF), on agite à nouveau. Les acides aminés dérivés sont alors récupérés dans une phase organique en ajoutant 500 µl de chloroforme à 1% d'ECF. La phase supérieure aqueuse est éliminée et la phase organique évaporée avec de l'air comprimé. Le résidu d'évaporation est alors dissous dans 100 µl de chloroforme à 1% d'ECF (v/v).

2-2-3-2-3-3 Analyse

L'analyse est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse Delsi Nermag DN 200 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne utilisée est une colonne OV1701 (Spiral) greffée longue de 25 m et de 0,32 mm de diamètre interne. Le volume injecté est de 5 µl. Le détecteur et l'injecteur sont à une température de 250°C. Le gradient de température utilisé est de 12,5°C/mn de 145 à 205°C, puis de 5°C/mn de 205 à 260°C et enfin une attente de 1,1 mn à 260°C pour nettoyer la colonne. La redescente de température est faite à la vitesse maximale de 39°C/mn. Le débit du gaz vecteur (hélium) est de 0,5 ml/mn. Une solution standard d'acides aminés (AAS18, Sigma) est utilisée pour établir la courbe étalon de chaque acide aminé. Les solutions d'hydroxyproline, d'asparagine et de glutamine sont préparées à part.

2-2-3-2-3-4 Intégration des chromatogrammes

L'intégration des pics est réalisée sous le logiciel Maxima (Waters). C'est la surface des pics qui est prise en compte. Celle-ci est corrigée par le rendement d'extraction. Il est calculé en rapportant l'aire de norleucine de l'échantillon à l'aire de norleucine injectée pure à la concentration théorique en considérant qu'il n'y avait pas eu de pertes de norleucine lors de l'extraction.

3-RESULTATS-DISCUSSION

3-1 Evolution des teneurs en minéraux libres lors de l'établissement de la *rigor mortis*

3-1-1 Des concentrations en minéraux libres qui évoluent lors du passage en *rigor mortis* et semblent liées à l'évolution du pH

3-1-1-1 Expérience 1 : lapins

La température des viandes est inférieure à 5°C dès 3 heures *post mortem*.

Pour chaque animal les paramètres A, B et C de l'équation $pH = A + B.e^{-C.t}$ ont été calculés. A partir de ces modèles, les pH à 12 minutes et 24 heures *post mortem* ainsi qu'une estimation de la vitesse de chute du pH (B.C) (tabl. 3-1-1-**1**) ont été estimés. Les valeurs pour chaque lapin sont données en annexe (ann. **A-3**).

Les animaux stressés n'ont pas un pH_U significativement différent des témoins (tabl. 3-1-1-**1**). Le léger stress provoqué juste avant l'abattage n'a pas entraîné une disparition des réserves énergétiques musculaires *ante mortem*. L'adrénaline libérée relayée dans la cellule musculaire par l'AMPc et le calcium, libéré par stimulation des récepteurs β1β2, stimulent la formation du glucose1-P à partir du glycogène par des phosphorylations en cascade, et inactivent la glycogène synthétase (Bendall, 1979 ; Weil, 1987). Le faible laps de temps laissé entre le stimulus et l'abattage (5 mn) limite l'action hormonale et nerveuse du stress. La glycolyse débute avant la mort chez les animaux stressés mais globalement elle n'est pas plus rapide (différence NS sur B.C) ni plus intense (différence NS sur pH_{48} et pH_{144}) (tabl. 3-1-1-**1**). En revanche, elle est plus avancée pour un faible temps *post mortem* donné : $pH_{0,2}$ significativement inférieur au seuil de 10% chez les stressés (tabl. 3-1-1-**1**).

Tableau 3-1-1-**1** : Evolution des pH

	Témoins		Stressés		p (%)
	m	σ	m	σ	
$pH_{0,2}$	6,76	0,15	6,54	0,15	9,6
pH_U	5,78	0,15	5,73	0,09	48,0
pH_{144}	5,89	0,13	5,82	0,12	40,6
B.C	0,22	0,04	0,18	0,05	21,6

Bendall (1979) obtient sur du long dorsal de lapin (2 kg vif) décapité après une injection intraveineuse de myanesine un pH 10 mn après abattage de 7,04 (σ=0,13). Nos valeurs deux minutes plus tard sont plus faibles. Notre traitement

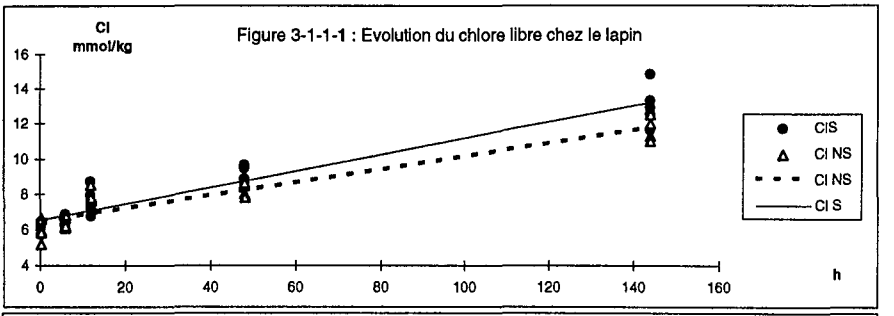


Figure 3-1-1-1 : Evolution du chlore libre chez le lapin

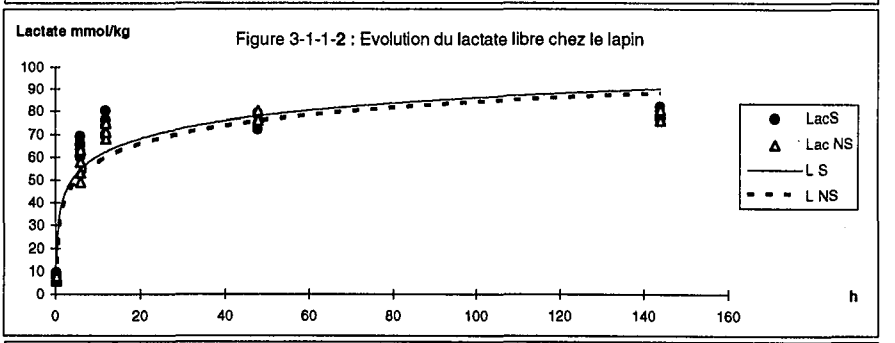


Figure 3-1-1-2 : Evolution du lactate libre chez le lapin

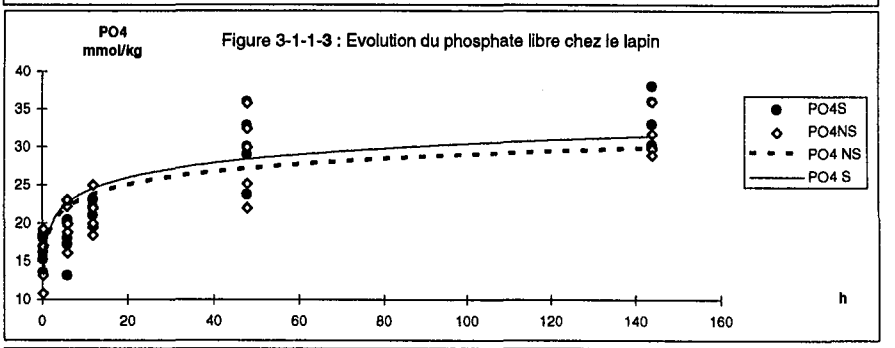


Figure 3-1-1-3 : Evolution du phosphate libre chez le lapin

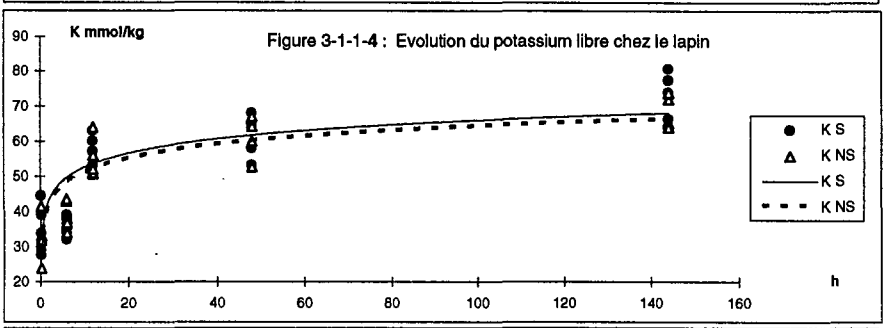


Figure 3-1-1-4 : Evolution du potassium libre chez le lapin

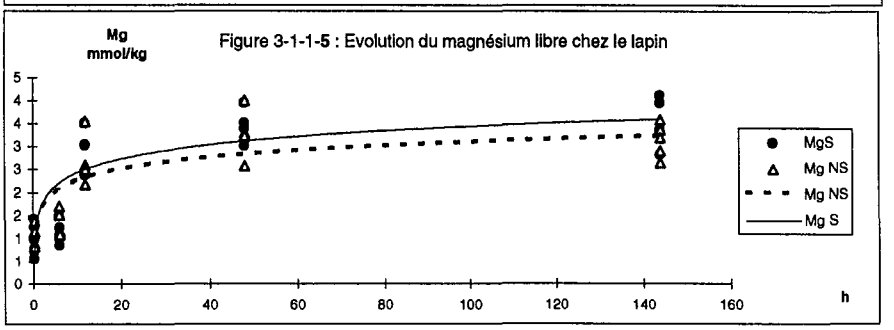


Figure 3-1-1-5 : Evolution du magnésium libre chez le lapin

à l'éther n'a pas été suffisant pour éviter le stress à l'abattage de nos témoins (pH=6,76). Par contre la modalité stress a bien fonctionné (pH=6,54).

Les teneurs des ions suivis augmentent avec le temps (fig. 3-1-1-**1** à **5**). Une régression linéaire a été appliquée pour chaque lapin et pour chaque ion suivi par une équation de la forme : ion = a + b.log (temps+1), le temps étant exprimé en heures et la concentration de l'ion en millimoles extraites par kg de viande fraîche. Le paramètre b (tabl. 3-1-1-**2**) exprime la rapidité avec laquelle les ions sont libérés et donc l'affaiblissement des liaisons protéines-ions.

Tableau 3-1-1-**2** : Paramètres de vitesse de libération des ions

Vitesse de libération	Témoins		Stressés		p (%)
	m	σ	m	σ	
bK	7,64	2,82	9,34	1,49	25,8
bMg	0,625	0,16	0,790	0,21	10,0
bCl	0,553	0,19	0,752	0,12	6,1
bH_2PO_4	3,14	1,61	3,52	1,04	71,0

Les vitesses de libération sont toutes supérieures chez les lapins stressés mais la différence est significative au seuil de 10% uniquement pour le magnésium et pour le chlore. L'écart type assez fort dans le cas du potassium, nuit à la fiabilité du test. Les ions ont donc tendance à être plus vite libérés chez les stressés, ce qu'il faut rapprocher d'une vitesse de chute de pH supérieure chez ces animaux. Les vitesses de libération sont en effet corrélées négativement avec le $pH_{0,2}$. Si l'on considère que le $pH_{0,2}$ est une estimation de la vitesse de chute du pH dans les minutes qui suivent l'abattage, plus la chute de pH est précoce ($pH_{0,2}$ faible), plus les ions sont libérés rapidement.

L'extraction des différents ions par broyage de la viande augmente avec la chute du pH (fig. 3-1-1-**6** et **7**). Nous pouvons penser que lorsque le pH décroît et se rapproche du point isoélectrique des protéines myofibrillaires (voisin de 5 d'après Pearson et Young, 1989), celles-ci deviennent amphotères. Les particules protéiques s'attirent donc entre elles, tendent à s'agréger et perdent peu à peu leur aptitude à fixer des ions par force électrostatique.

Le pH semble être le principal facteur qui affecte la libération des ions. Cependant la cinétique de libération semble différer avec la nature de l'ion. Le chlore semble être libéré de manière régulière et peu intense (fig. 3-1-1-**1**) alors que le potassium et surtout le magnésium sont libérés brusquement et fortement (fig. 3-1-1-**4** et **5**). Cette différence peut être attribuée à la diffusion passive du chlore au travers de la membrane plasmique de la cellule musculaire (Berkaloff *et al.*, 1987), il est logique qu'il soit libéré régulièrement dès la mort. Le sodium est principalement présent dans le milieu extra cellulaire (Conway, 1957 ; Berkaloff *et al.*, 1987), il peut

Figure 3-1-1-6 : Evolution de Cl, Mg et K libres en fonction du pH chez le lapin

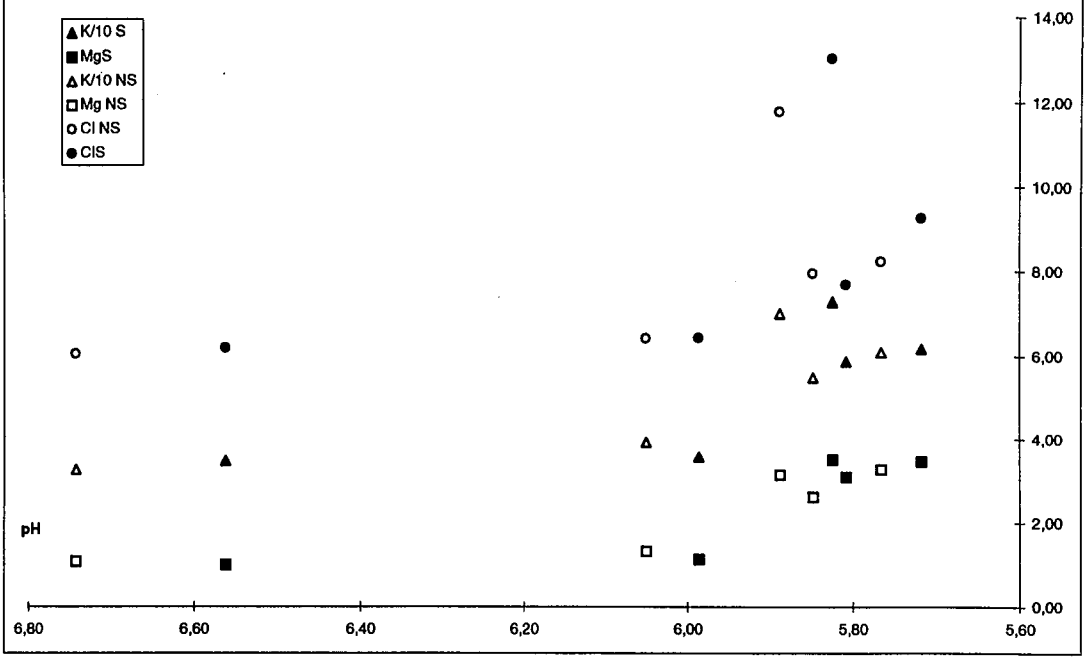
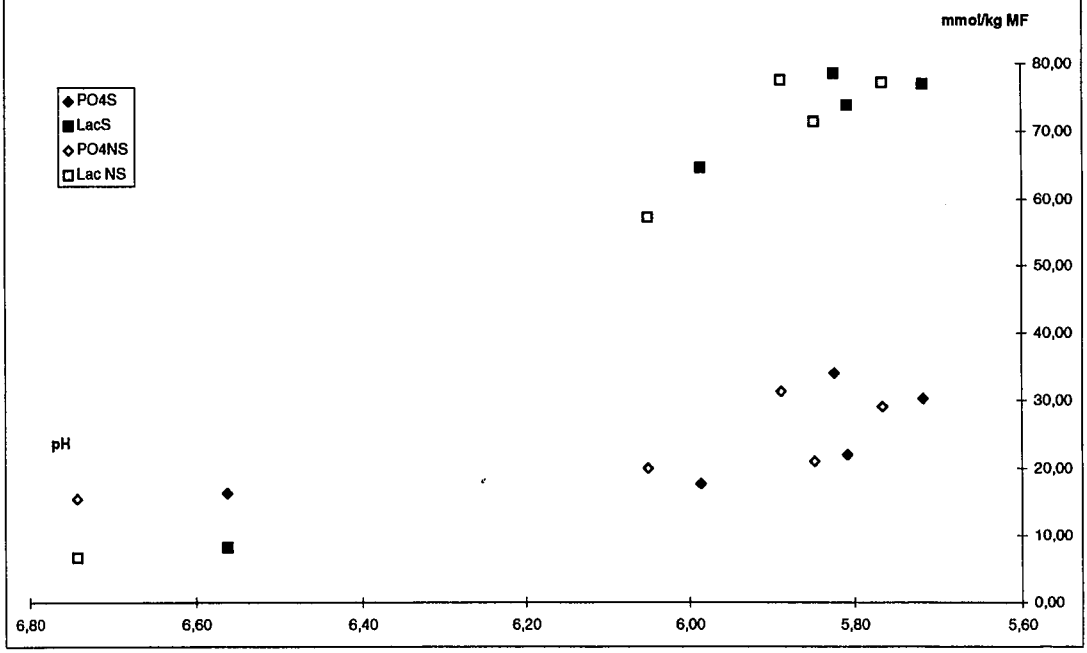


Figure 3-1-1-7 : Evolution du phosphate et du lactate libres en fonction du pH chez le lapin



donc lui aussi être facilement libéré. Par contre le potassium est plus concentré dans le hyaloplasme que dans le milieu interstitiel, il doit donc franchir la membrane plasmique qui ne lui est pas perméable (Berkaloff *et al.*, 1987). Il faut donc que le plasmalemme soit endommagé avant qu'il puisse être libéré. Il est probable que le magnésium soit dans un cas proche de celui du potassium.

3-1-1-2 Expérience 2 : chevreaux

3-1-1-2-1 Composition chimique

Les muscles des chevreaux ont une composition biochimique peu différente au sein d'une même expérimentation (tabl. 3-1-1-**3**)

Tableau 3-1-1-**3** : Composition chimique des muscles LD de chevreaux

	Expérience 2a		Expérience 2b	
	m	σ	m	σ
Matière sèche (%MF)	24,1	1,0	24,2	1,1
Lipides (%MF)	1,41	0,32	-	-
Protéines brutes (%MF)	22,2	1,1	-	-
Cendres (%MF)	1,12	0,03	1,35	0,10
Sodium (mmol/kgMF)	27,4	0,5	27,9	2,9
Magnésium (mmol/kgMF)	14,8	2,1	14,2	1,0
Potassium (mmol/kgMF)	97	5,5	113,8	4,9

Les teneurs obtenues ici sont proches de celles citées par Park (1990) sur du LD de caprins, avec 28 mmol/kgMF pour le sodium, 10 mmol/kgMF pour le magnésium et 76 mmol/kgMF pour le potassium.

3-1-1-2-2 Evolution *post mortem* de la libération des ions

Les teneurs en minéraux libres augmentent toutes durant la phase *post mortem* (fig. 3-1-1-**8**, **9**, **11**, **12** et **13**). L'augmentation se poursuit après la *rigor mortis* (24 h), ce qui signifie qu'une fois le pH_u atteint, les ions continuent à être relâchés. Ces résultats sont cohérents avec les évolutions de la pression osmotique citées par Geesink *et al.* (1992) et Bonnet *et al.* (1992) où l'augmentation se poursuivait au delà de 24 h chez le bovin. L'interprétation de ce phénomène est cependant difficile. Il pourrait s'agir d'un temps de latence entre le moment où le pH de la solution intercellulaire atteint le pH_u et le moment où les charges protéiques s'équilibrent, la faible température ralentissant la vitesse de réaction. Deux autres hypothèses peuvent être envisagées : la rupture différée des membranes ou le

Figure 3-1-1-6 : Evolution de Cl, Mg et K libres en fonction du pH chez le lapin

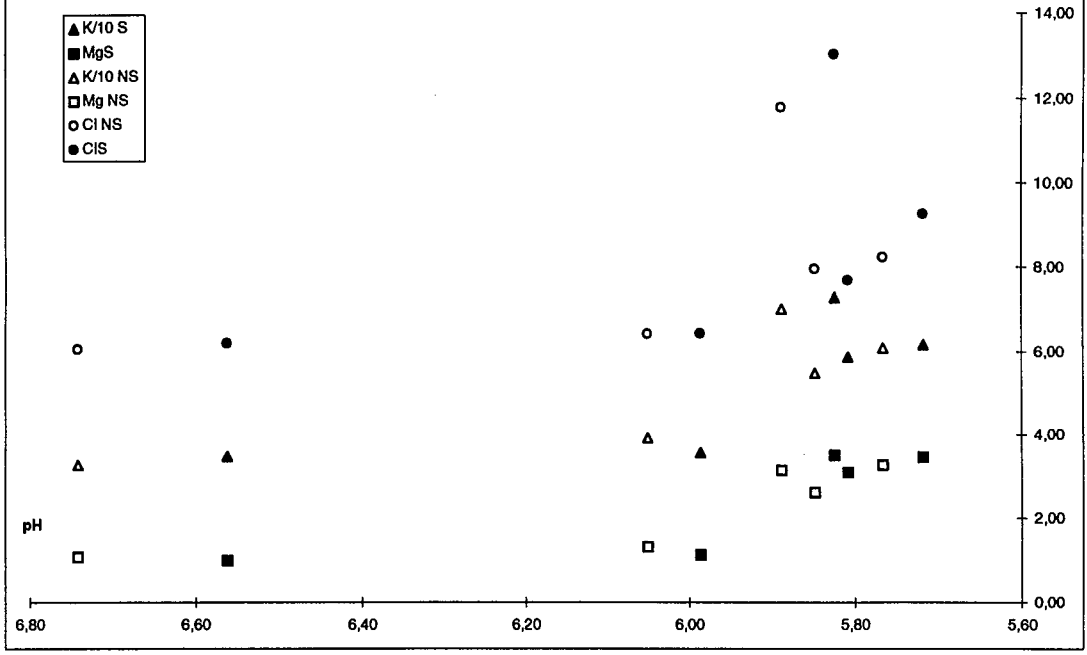
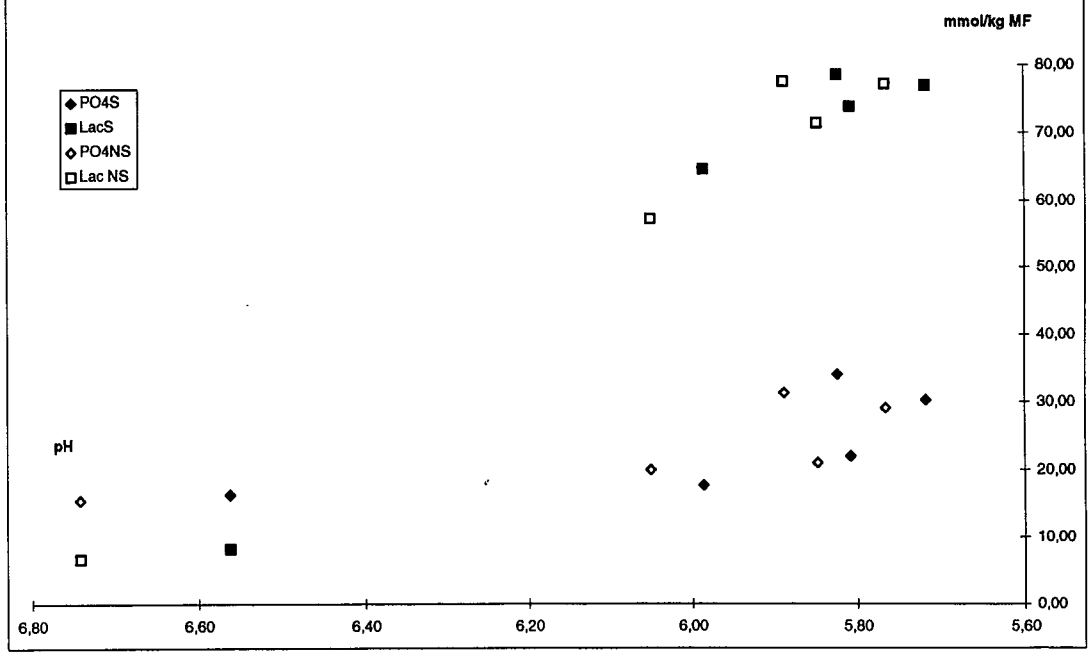


Figure 3-1-1-7 : Evolution du phosphate et du lactate libres en fonction du pH chez le lapin



début de la protéolyse qui en rompant les structures tertiaires des protéines ou des clusters hydrophobes pourrait libérer des ions "bloqués".

Nous avons estimé l'augmentation de force ionique engendrée par la libération des ions à partir de la différence de concentration (Δ) mesurée entre 1 h et 24 h *post mortem* (tabl. 3-1-1-**4**).

Tableau 3-1-1-**4** : Evolution de la teneur en ions libres (mmol/kg MF) entre 1 h et 24 h *post mortem* chez le chevreau (12 mesures)

Ion	1 h		24 h		Δ	Somme des Δ
	m	σ	m	σ	24h/1h	
Cl	14,4	3,1	21,5	4,5	7,1	
Na	10,7	1,0	19	4,6	8,3	**41**
K	47,2	3,6	70,6	9,7	23,4	
Mg	1,3	0,32	3,5	0,78	2,2	
PO4	23,5	8,9	32,0	7,7	9	**83**
Lactate	33	3,5	107	20,0	74	

Comme la production de phosphate et de lactate débute dès la mort de l'animal, le calcul de la différence Δ prenant en compte les valeurs à une heure sous estime largement la production de ces métabolites. Nous avons estimé que leurs teneurs étant quasiment nulles à la mort de l'animal, l'augmentation sur 24 heures est de 139 mmol/kg MF pour la somme de ces deux éléments. Ce n'est pas le cas pour les ions non métabolites qui sont présents lors de la vie de l'animal : Mg^{2+} 0,5 à 0,8 mM (Alvarez-Leefmans et al., 1986 ; Jeacoke, 1993), Na^+ : 11 mM ou K^+ (Conway, 1957).

La teneur moyenne en eau des muscles étudiés est de 76% (tabl. 3-1-1-**3**). La variation due aux minéraux "passifs" ou non métabolites (Δ*1,32) est de +54 mmol/l d'eau et celle due aux métabolites est de +183 mmol/l d'eau.

Winger et Pope (1980-81) citent une augmentation de la pression osmotique équivalente à du NaCl 120 mM, soit 240 mmol/l d'eau pour un ion seul. En rapportant nos valeurs calculées à cette différence et en supposant que la variation de pression osmotique (non mesurée ici) est équivalente à celle citée par Winger et Pope (1980-81), nous pouvons estimer que 76 % de l'augmentation est due aux métabolites. Dans leur expérience Winger et Pope (1980-81) estiment que 60 à 80% de l'augmentation est due aux métabolites. Ils attribuent le reste à une libération d'éléments présents sous forme liée en *pre rigor* c'est-à-dire ce que nous appelons ions "passifs". La part d'augmentation de la pression osmotique liée aux

minéraux "passifs" est de 22 %. Les variations de teneur en métabolites et en ions "passifs" que nous avons mesurées expliqueraient pratiquement la totalité (98%) de l'augmentation de pression osmotique citée par Winger et Pope (1980-81).

Dans une synthèse bibliographique, Offer et Knight (1988) estiment par calcul les teneurs libres en *post rigor* : potassium 100 mM, sodium 27 mM, lactate 100 mM et phosphate 40 mM. Leurs estimations sont proches des nôtres. En revanche, la teneur calculée pour le magnésium correspond à la teneur totale en magnésium du muscle, 11 mM (Dumont et Hudzik, 1990 ; Park, 1990). Cette évaluation est très supérieure à nos résultats (3,5 mmol/kg MF) et à ceux (entre 2 et 4 mmol/kg MF) cités par Jeacoke (1993).

Tableau 3-1-1-**5** : Augmentation relative des minéraux libres entre 1 h et 24 h

Ion	Magnésium	Sodium	Potassium	Chlore
Augmentation	+195 %	+83 %	+56 %	+59 %

Le magnésium se singularise par l'intensité de sa libération relative (tabl. 3-1-1-**5**). Sa concentration triple presque entre 1 h et 24 *post mortem*. Cette différence suggère un mécanisme différent de libération pour cet ion.

3-1-1-2-3 Effet du refroidissement sur la libération des ions (exp. 2a)

Les vitesses de libération des ions ne sont pas différentes (tabl. 3-1-1-**6** ou fig. 3-1-1-**8**, **9**, **11**, **12** et **13**) entre les demi-carcasses de chevreaux refroidies précocement (RP) une heure après la mort et celles réfrigérées plus tardivement (RT) 4 heures après abattage malgré la différence de cinétique de refroidissement (fig. 3-1-1-**10**). Le décalage de 3 h entre les 2 traitement pour la mise en chambre froide n'a engendré qu'une différence de 15 °C pendant 2 heures, ce qui ne semble pas suffisant pour modifier la cinétique de libération des minéraux.

Tableau 3-1-1-**6** : Effet de la cinétique de refroidissement sur la quantité d'ions libérés (mmol/kg MF) à 4 et 24 h *post mortem* chez le chevreau (2*6 demi-carcasses)

Ion	RP à 4 h		RT à 4 h		p	RP à 24 h		RT à 24 h		p
	m	σ	m	σ		m	σ	m	σ	
Sodium	15,9	1,2	15,2	1,8	NS	20,5	0,21	24,4	5,2	NS
Magnésium	1,70	0,6	1,58	0,4	NS	3,07	0,5	3,37	0,9	NS
Potassium	50,1	5,5	49,3	4,2	NS	65,2	4,1	63,1	2,6	NS
Chlore	16,0	4,3	16,1	3,7	NS	21,8	5,4	20,7	5,0	NS
Phosphate	24,3	10,1	20,8	11,0	NS	30,0	12,9	32,6	8,7	NS
Lactate	49,5	7,6	51,5	5,4	NS	98,8	9,1	97	12,9	NS

NS : non significatif au seuil de 5%.

Figure 3-1-1-14 : Evolution de la teneur en phosphate libre en fonction du pH

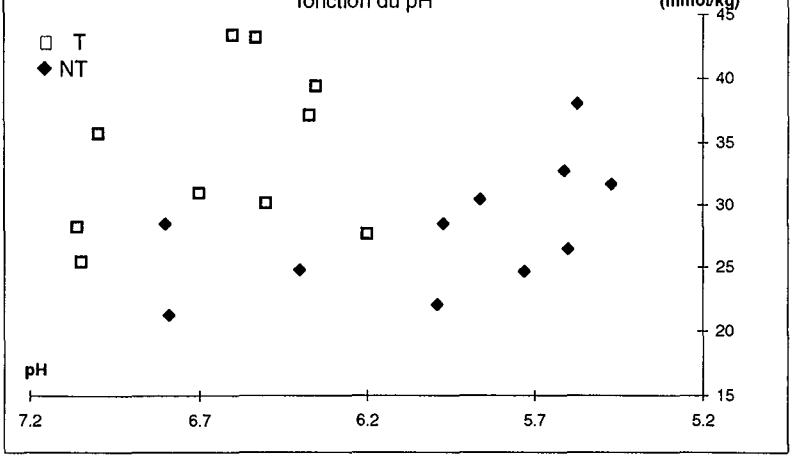


Figure 3-1-1-15 : Evolution du lactate libre en fonction du pH

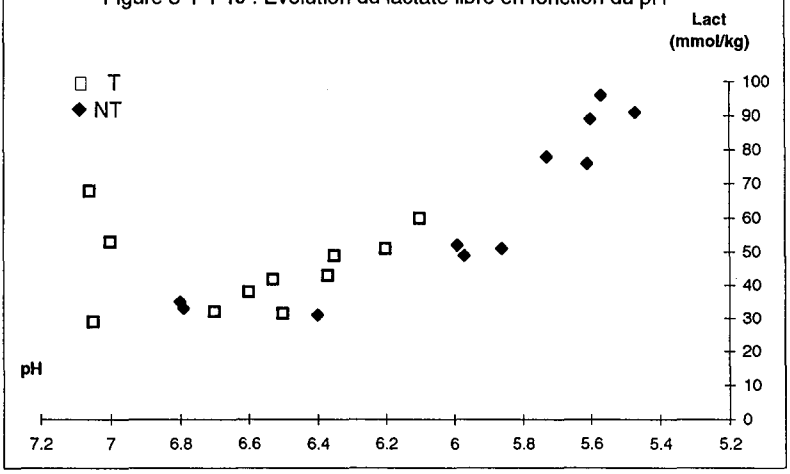
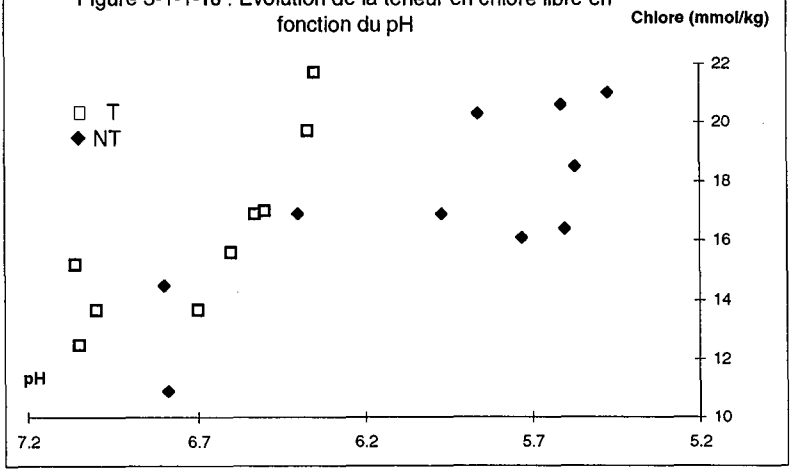


Figure 3-1-1-16 : Evolution de la teneur en chlore libre en fonction du pH



3-1-1-2-4 Effet du pHu sur la libération des ions (exp. 2b)

Pour les chevreaux stimulés par une injection d'adrénaline *ante mortem*, dont le pH est resté supérieur à 6, les teneurs en phosphate sont élevées dès la première heure (tabl. 3-1-1-**7**). Ces valeurs correspondent à l'utilisation des réserves énergétiques engendrées par le stress. L'animal n'a pas eu le temps de reconstituer ses réserves sous forme d'ATP, le phosphate libéré par l'utilisation *ante mortem* de l'ATP est donc présent dans le muscle à la mort de ces animaux.

La teneur en magnésium est un peu plus élevée en début (écart non significatif) mais devient significativement inférieure à 24 h chez les stressés (tabl. 3-1-1-**7**). Le léger écart au début peut s'expliquer par une dissociation du complexe Mg-ATP (faible teneur en ATP).

Pour les chlorures, le potassium et le sodium, les écarts importants entre les animaux ne nous ont pas permis de mettre en évidence de différence significative (tabl. 3-1-1-**6**) entre les témoins et les stressés même si les teneurs moyennes des stressés à 24 heures (tabl. 3-1-1-**7**) ont tendance à être supérieures aux autres. Cette moindre libération est sans doute imputable au pH plus élevé.

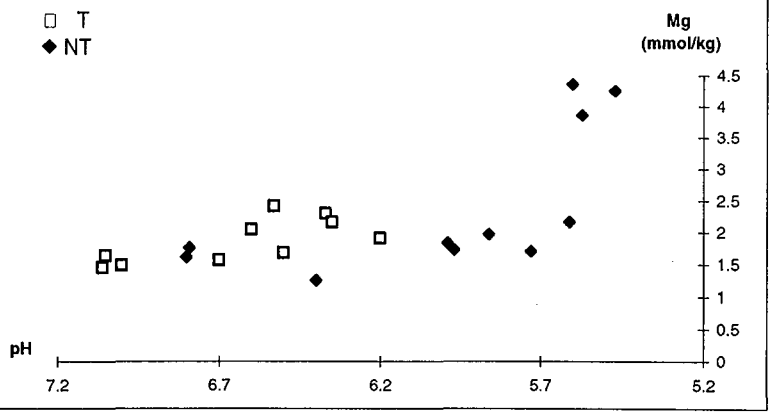
Les relations entre les teneurs en potassium, sodium, chlorures et le pH sont significatives et négatives. Les teneurs augmentent lorsque le pH décroît (fig. 3-1-1-**14** à **19**).

La particularité du phosphate (nuage de points distendu) est due aux animaux stressés pour lesquels avant même que ne débute la chute *post mortem* du pH les ions sont libres. La teneur en lactate est plus faible chez les animaux dont le pH_u est supérieur à 6 aussi bien à 1 h qu'à 24 h *post mortem* (tabl. 3-1-1-**7**), ce qui correspond bien à la disparition des réserves de glycogène avant la mort de l'animal.

Pour un même temps *post mortem*, les concentrations en ions sont différentes suivant le traitement (tabl. 3-1-1-**7**), ce qui peut être imputé à un effet du pH. Mais pour un même pH, les concentrations en ions peuvent différer (fig. 3-1-1-**14** à **19**), ce qui est imputable à l'épuisement relatif des réserves énergétiques.

Le pH a donc un rôle dans la libération des ions chlorures, sodium potassium et magnésium. Il ne peut cependant pas être considéré comme le seul responsable car cette libération est significative même pour les animaux ayant des pH_u supérieurs à 6. La mort cellulaire et notamment la désorganisation des membranes a également un effet direct sur la libération de ces ions.

Figure 3-1-1-17 : Evolution du magnésium libre en fonction du pH



Figue 3-1-1-18 : Evolution de la teneur en potassium libre en fonction du pH

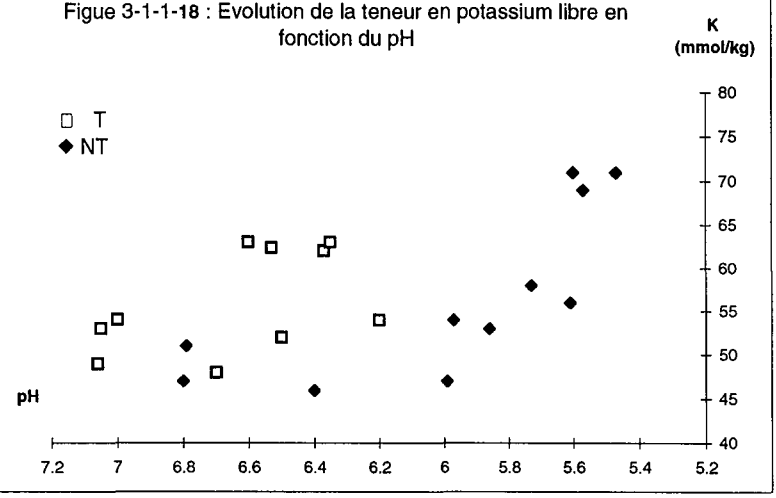


Figure 3-1-4-19 : Evolution des teneurs en sodium libre en fonction du pH

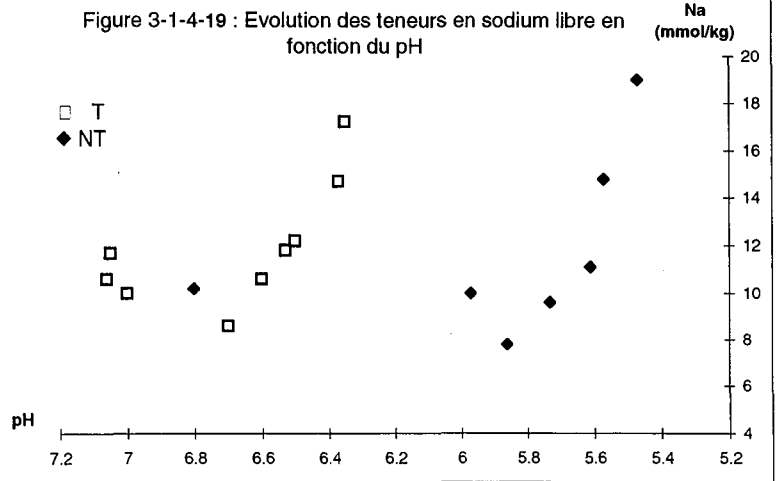


Tableau 3-1-1-7 : Effet du traitement à l'adrénaline *ante mortem* sur la quantité d'ions libérés (2*3 chevreaux)

Ion	pH<6 à 1 h		pH>6 à 1 h		p	pH<6 à 24 h		pH>6 à 24 h		p
	m	σ	m	σ		m	σ	m	σ	
Sodium	7,9	2,0	10,5	1,3	NS	16,1	1,9	14,4	3,5	NS
Magnésium	1,49	0,1	1,64	0,1	NS	3,89	0,2	2,57	0,3	**
Potassium	49,1	1,2	51,7	0,9	*	64,6	3,7	68,4	8,2	NS
Chlore	15,7	3,4	14,9	1,3	NS	21,0	4,3	19,7	3,3	NS
Phosphate	22,6	8,8	32,0	4,2	*	29,6	9,3	36,9	9,1	NS
Lactate	32,6	2,3	31,7	2,1	NS	92,0	2,6	55,7	13,6	**

*, $p<0,05$; ** $p<0,01$; NS, non significatif.

Nous pouvons donc faire la distinction entre trois phénomènes de fixation/libération des ions :

- une fixation "passive" des ions par les protéines, directement dépendante du pH et de son écart avec le pI des protéines.
- un cloisonnement actif utilisant de l'ATP qui cesse lors de l'épuisement des réserves énergétiques de la cellule et qui engendre une sortie d'ions non directement conditionnée par le pH.
- une "libération" de métabolites comme le phosphate inorganique ou le lactate issus du métabolisme énergétique *peri mortem*. La quantité de phosphate inorganique est liée à l'épuisement des réserves énergétiques. La quantité de lactate est liée au potentiel glycolytique de la cellule. Plus le cycle de la glycolyse est reproduit un grand nombre de fois, plus il y a de lactate produit et plus le milieu est acidifié.

Ces différents mécanismes peuvent se superposer. Quand les pompes ATPases dépendantes du réticulum s'arrêtent, le magnésium est relâché mais, suivant le pH, une part de ce magnésium est fixée par les protéines du cytoplasme (Haiech *et al.*, 1979 ; Alvarez-Leefmans *et al.*, 1986). Cette part est d'autant plus faible que le pH_u est bas.

3-1-1-2-5 Variations du pourcentage d'ions libérés liées à l'espèce

La comparaison entre lapin et chevreau n'a été réalisée que pour le magnésium et le potassium car ce sont les deux seuls ions pour lesquels nous connaissons à la fois la quantité totale et libre dans les muscles étudiés.

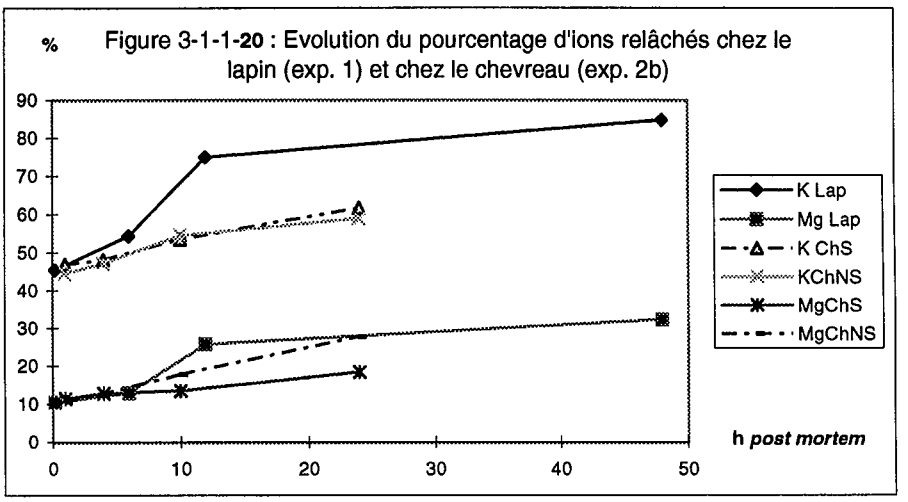


Figure 3-1-1-**20** : Evolution du pourcentage d'ions relâchés chez le lapin (exp. 1) et chez le chevreau (exp. 2b)

La proportion du magnésium libre chez le lapin comme chez le chevreau (fig. 3-1-1-**20**) est proche de celle calculée par Jeacoke (1993) qui obtient chez la souris 20 et 35 % de magnésium libre. Chez le lapin, le magnésium semble arriver plus vite à son maximum mais il atteint également la *rigor* plus rapidement. La part de potassium relâché semble plus élevée chez le lapin que chez le chevreau.

3-1-2 Lien avec la composition chimique

3-1-2-1 Expérience 1 : lapins

Tableau 3-1-2-**1** : Coefficients de corrélation entre concentrations en ions et composition chimique chez le lapin (10 animaux)

	eau	prot	lipid	cend	pHu	K	Mg	Cl	PO4	Lact	Ktot	Mgto
eau	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
prot	-0,18	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lipid	-0,28	0,02	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cend	-0,35	0,24	0,16	1	-	-	-	-	-	-	-	-
pHu	0,28	0,17	-0,35	0,06	1	-	-	-	-	-	-	-
K	0,10	-0,40	-0,28	-0,45	0,14	1	-	-	-	-	-	-
Mg	-0,34	-0,10	0,25	-0,56	-0,16	0,57	1	-	-	-	-	-
Cl	-0,25	-0,10	0,29	0,04	-0,30	0,29	0,44	1	-	-	-	-
PO4	0,28	-0,11	0,46	-0,45	-0,32	0,48	0,44	0,33	1	-	-	-
Lact	0,36	0,04	-0,28	-0,36	0,18	-0,30	-0,11	-0,24	-0,15	1	-	-
Ktot	-0,03	0,48	0,11	0,14	-0,01	-0,25	-0,10	-0,05	-0,11	-0,10	1	-
Mgto	-0,51	0,65	0,41	0,58	0,54	-0,36	-0,12	0,16	-0,00	-0,26	0,64	1

Il y a peu de corrélations significatives entre la composition chimique globale et la libération des ions à 48 heures *post mortem* chez les lapins étudiés. Nous n'avons pas non plus mis en évidence de lien entre les minéraux libérés et les quantités totales de K ou de Mg présentes dans le muscle. La quantité de Mg totale est liée à celle de K total et à la teneur en protéines et en cendres. La composition chimique ne permet pas de prédire la capacité d'un muscle à libérer ses minéraux.

3-1-2-2 Expérience 2a : chevreaux

Ces observations sont valables pour le chevreau (tabl. 3-1-2-**2**). Les teneurs en minéraux totaux (Mgto, Ktot et Nato) semblent liées entre elles. Les teneurs en Mg, K et Na libres à 24 heures *post mortem* sont corrélées négativement avec leur teneur totale. Comme chez le lapin, la composition chimique du muscle n'apporte guère d'informations sur son potentiel à libérer des ions. Cependant nous ne disposons pas des teneurs en chlore et en phosphate total.

Tableau 3-1-2-**2** : Coefficients de corrélation entre concentrations en ions et composition chimique chez le chevreau (animaux de l'expérience 2a)

	Eau	prot	lipid	cend	pHu	K	Mg	Cl	PO_4	Na	Ktot	Mgto	Nato
Eau	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
prot	0,29	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lipid	-0,56	-0,40	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cend	-0,20	0,11	0,68	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pHu	0,14	-0,10	0,40	0,32	1	-	-	-	-	-	-	-	-
K	0,24	0,10	-0,19	0,16	-0,21	1	-	-	-	-	-	-	-
Mg	0,12	-0,01	-0,30	-0,10	-0,77	0,29	1	-	-	-	-	-	-
Cl	0,48	0,55	-0,59	-0,40	-0,16	0,03	-0,10	1	-	-	-	-	-
PO_4	0,12	0,02	0,50	0,54	0,80	0,05	-0,46	-0,01	1	-	-	-	-
Na	0,20	0,17	-0,5	-0,49	-0,40	-0,12	0,06	0,66	-0,29	1	-	-	-
Ktot	-0,12	-0,15	0,74	0,83	0,64	0,02	-0,44	-0,44	0,77	-0,66	1	-	-
Mgto	-0,44	-0,15	0,52	0,22	0,21	-0,32	-0,12	-0,64	0,24	-0,50	0,52	1	-
Nato	-0,31	-0,13	0,50	0,23	0,52	-0,22	-0,59	-0,39	0,29	-0,47	0,49	0,66	1

3-2 Etude des produits de faible poids moléculaire issus de la protéolyse

3-2-1 Acides aminés libres

3-2-1-1 Effet de la durée de stockage (3 et 10 jours) sur le *Longissimus dorsi* (expérience 3)

Tableau 3-2-1-**1** : Effet de la durée de stockage sur la concentration en acides aminés libres dans le *Longissimus dorsi* de taurillons(21 animaux)

Acide aminé	J3 [a]		J10 [a]		p
	m	σ	m	σ	
Alanine	4,75	0,13	6,00	0,16	**
Asparagine	0,42	0,10	0,55	0,11	**
Aspartate	0,19	0,07	0,21	0,10	NS
Glutamate	4,46	1,73	4,96	1,58	NS
Glutamine	1,43	0,92	2,13	1,12	NS
Glycine	1,66	0,34	1,93	0,37	NS
Histidine	0,42	0,14	0,82	0,28	**
Hydroxyproline	0,30	0,05	0,57	0,12	***
Isoleucine	0,18	0,03	0,48	0,11	***
Leucine	0,56	0,10	1,06	0,22	**
Lysine	1,43	0,59	2,13	0,82	***
Méthionine	0,59	0,28	0,60	0,32	NS
Proline	0,56	0,09	0,66	0,10	**
Sérine	0,72	0,27	1,15	0,33	**
Thréonine	0,21	0,06	0,50	0,09	**
Valine	3,37	0,74	4,40	1,41	NS

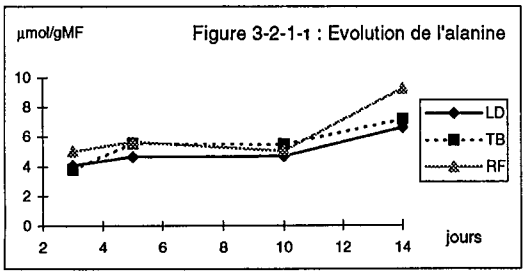
[a] Concentrations en µmoles d'acide aminé par g de viande fraîche

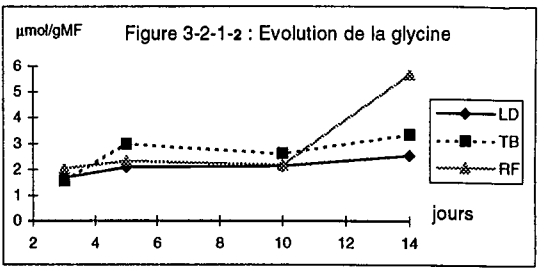
*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; NS, non significatif.

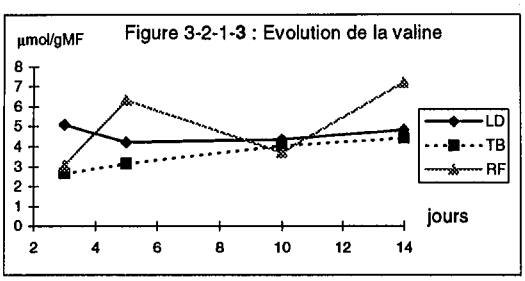
Toutes les concentrations des acides aminés détectés augmentent entre le troisième jour de stockage et le dixième. Cette augmentation est hautement significative pour 11 d'entre eux (tabl. 3-2-1-**1**). Les variations individuelles très importantes des teneurs en glutamine et en acide glutamique peuvent expliquer l'absence d'effet significatif malgré une augmentation moyenne de 10 à 20 %. Cette variabilité peut s'expliquer par le fait que le ratio Glu/Gln est utilisé dans la cellule pour réguler son équilibre azoté. Il ne semble pas y avoir de lien avec le poids de carcasse ou le pH_u (tabl. 3-2-1-**2**). En revanche, même si elles sont faibles les corrélations avec l'âge sont systématiquement négatives. Cette relation négative pourrait être lié à un potentiel protéolytique décroissant avec l'âge chez ces jeunes animaux (17-22,5 mois).

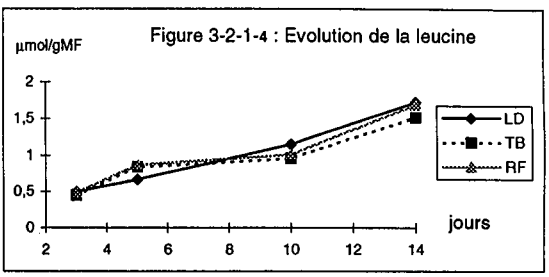
Tableau 3-2-1-**2** : Corrélations entre acides aminés libres et paramètres de carcasse (J3 et J10)

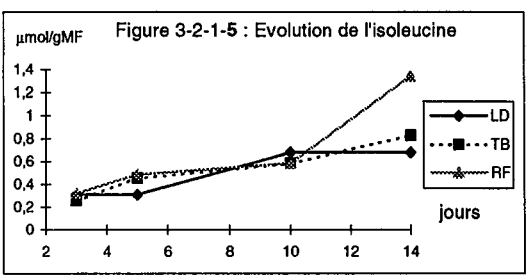
Acide aminé	Poids	pHu	Age
alanine	0.076	0.198	0.122
asparagine	0.382	0.355	-0.044
aspartate	0.156	-0.108	-0.129
glutamate	0.196	-0.157	-0.030
glycine	-0.325	0.301	-0.242
histidine	0.109	0.137	-0.109
hydroxyproline	0.284	0.184	-0.060
isoleucine	-0.145	-0.133	-0.111
leucine	-0.009	-0.075	-0.011
lysine	0.452	0.231	-0.120
méthionine	0.137	0.080	-0.232
proline	0.026	0.098	-0.144
sérine	0.161	0.421	-0.105
thréonine	0.134	0.111	-0.131
valine	0.248	-0.091	0.008
Poids	1.000	-0.103	0.254
pH_u	-0.103	1.000	-0.536

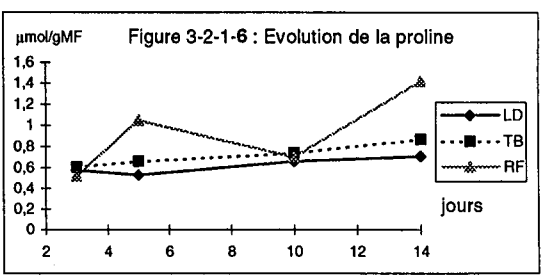

µmol/gMF
Figure 3-2-1-1 : Evolution de l'alanine
10
8
6
4
2
0
2
4
6
8
10
12
14
jours
LD
TB
RF

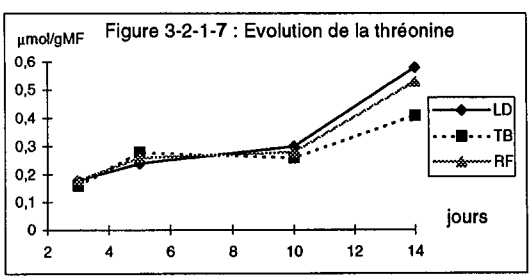

µmol/gMF
Figure 3-2-1-2 : Evolution de la glycine
6
5
4
3
2
1
0
2
4
6
8
10
12
14
jours
LD
TB
RF

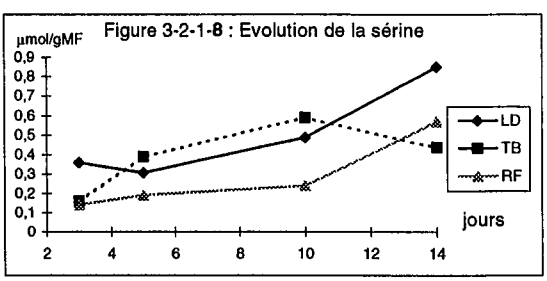

µmol/gMF
Figure 3-2-1-3 : Evolution de la valine
8
7
6
5
4
3
2
1
0
2
4
6
8
10
12
14
jours
LD
TB
RF


µmol/gMF
Figure 3-2-1-4 : Evolution de la leucine
2
1,5
1
0,5
0
2
4
6
8
10
12
14
jours
LD
TB
RF


µmol/gMF
Figure 3-2-1-5 : Evolution de l'isoleucine
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2
4
6
8
10
12
14
jours
LD
TB
RF


µmol/gMF
Figure 3-2-1-6 : Evolution de la proline
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2
4
6
8
10
12
14
jours
LD
TB
RF


µmol/gMF
Figure 3-2-1-7 : Evolution de la thréonine
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
2
4
6
8
10
12
14
jours
LD
TB
RF


µmol/gMF
Figure 3-2-1-8 : Evolution de la sérine
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
2
4
6
8
10
12
14
jours
LD
TB
RF

3-2-1-2 Expérience 4 : Effet temps et muscle entre 3 et 10 jours sur *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* et *Rectus femoris*

Tableau 3-2-1-**3** : Coefficients de corrélation entre les teneurs en acides aminés libres et les valeurs d'IFM et le temps

	IFM			Temps		
Acides aminés	LD	TB	RF	LD	TB	RF
ALA	0.392	0.589	0.436	0.640	0.625	0.610
GLY	0.070	0.225	0.426	0.509	0.354	0.671
VAL	0.198	0.395	0.310	-0.018	0.648	0.474
LEU	0.500	**0.758**	**0.811**	0.825	0.679	0.747
ILE	0.613	**0.777**	**0.788**	0.774	0.683	0.750
PRO	0.224	0.566	0.577	0.332	0.401	0.510
THR	0.489	0.526	**0.744**	0.797	0.599	0.712
SER	0.232	0.618	0.474	0.651	0.510	0.683
GLU	0.437	0.220	0.109	0.582	0.342	0.273
ASN	0.447	-0.281	0.275	0.781	-0.313	0.285
ASP	0.292	0.107	-.0015	0.345	0.080	0.012
MET	0.473	0.534	**0.709**	0.796	0.563	0.644
HYP	0.564	0.568	0.552	0.869	0.607	0.660
LYS	0.394	0.416	0.556	0.791	0.543	0.650
HIS	0.289	0.009	0.390	0.640	-0.169	0.570

Comme dans l'expérience 3, les concentrations en acides aminés libres augmentent (fig. 3-2-1-**1** à **15**) et cet effet du temps est hautement significatif (tabl. 3-2-1-**2**).

L'effet muscle est significatif pour la plupart des acides aminés (tabl. 3-2-1-**4**). L'interaction entre muscle et temps de stockage est significative (tabl. 3-2-1-**4**). Les muscles LD, TB et RF ne libèrent pas les mêmes quantités d'AA libres pendant la maturation et les concentrations en AA libres diffèrent selon le muscle.

L'effet animal et les interactions animal*temps et animal*muscle ne sont pas significatives pour les trois quarts des AA (tabl. 3-2-1-**4**).

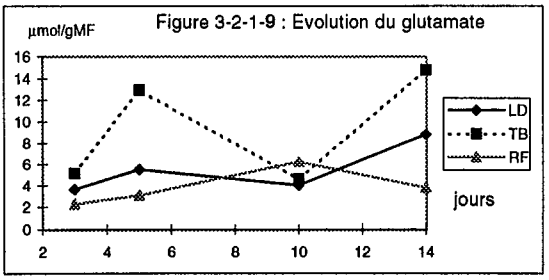


Figure 3-2-1-9 : Evolution du glutamate

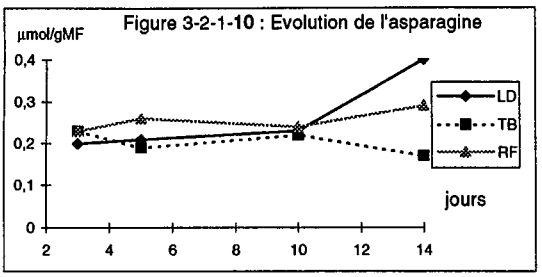


Figure 3-2-1-10 : Evolution de l'asparagine

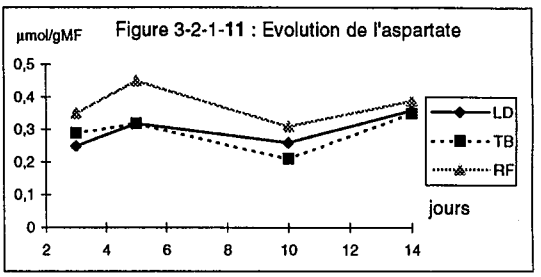


Figure 3-2-1-11 : Evolution de l'aspartate

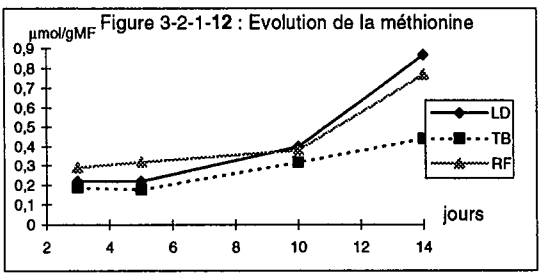


Figure 3-2-1-12 : Evolution de la méthionine

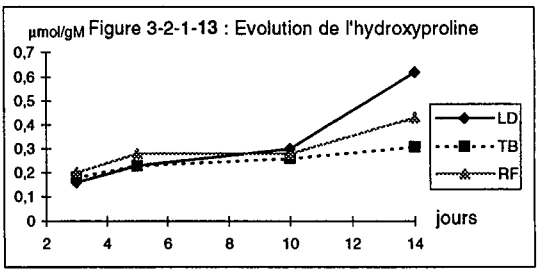


Figure 3-2-1-13 : Evolution de l'hydroxyproline

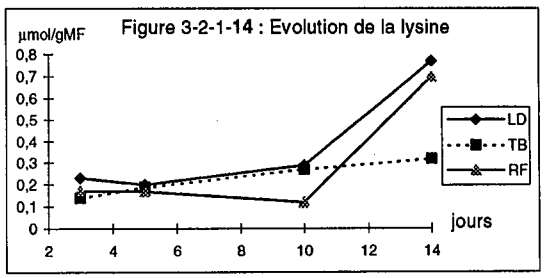


Figure 3-2-1-14 : Evolution de la lysine

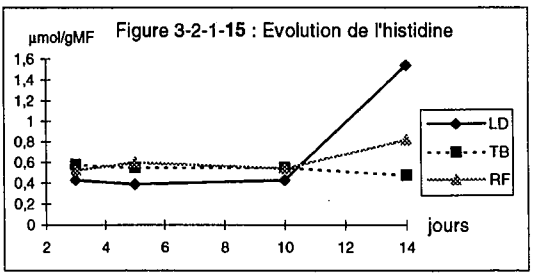


Figure 3-2-1-15 : Evolution de l'histidine

Tableau 3-2-1-4 : Effets des facteurs étudiés sur la concentration des acides aminés libres (pour chaque facteur étudié, la valeur F et la probabilité sont données)

Acide aminé	Muscle	Temps de stockage	Muscle *temps	Animal	Muscle *animal	Animal *temps
ALA	7.37 **	67.42 ***	3.06 *	5.95 *	1.61 NS	0.69 NS
GLY	9.05 **	32.45 ***	7.61 ***	4.57 *	1.45 NS	0.85 NS
VAL	17.69 ***	5.13 **	9.13 ***	1.16 NS	1.09 NS	2.35 *
LEU	0.70 NS	46.30 ***	1.50 *	4.82 **	1.97 *	2.31 *
ILE	7.02 **	58.81 ***	13.42 ***	4.16 **	2.90 **	1.97 *
PRO	6.97 **	17.16 ***	4.59 **	2.27 NS	2.00 NS	0.90 NS
THR	3.77 *	37.61 ***	1.84 NS	3.36 NS	0.62 NS	1.40 NS
SER	17.93 ***	14.16 ***	5.13 ***	0.84 NS	0.76 NS	1.62 NS
GLU	29.61 ***	14.27 ***	7.91 ***	0.34 NS	0.96 NS	1.08 NS
ASN	10.69 **	13.78 ***	11.31 ***	1.61 NS	1.15 NS	0.55 NS
ASP	8.74 **	5.56 **	0.37 NS	6.46 NS	0.56 NS	0.84 NS
MET	7.63 **	44.53 ***	8.69 ***	2.71 *	3.62 ***	2.45 **
HYP	9.58 **	59.93 ***	12.67 ***	1.56 NS	1.61 NS	1.29 NS
LYS	13.10 ***	99.91 ***	8.76 ***	4.20 NS	0.86 NS	0.60 NS
HIS	3.62 NS	19.17 ***	7.69 ***	33.13 NS	0.56 NS	0.46 NS

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; NS, non significatif.

Afin d'affiner l'étude de l'effet temps, nous avons utilisé la méthode des contrastes. Nous avons opposé chaque jour contre les 2 jours précédents ou suivants. Pour le *Longissimus dorsi* et le *Rectus femoris*, seuls les contrastes entre le jour 14 et les jours 5 et 10 sont hautement significatifs (**A-5** et **7**). Ces résultats confirment une rupture dans la croissance des concentrations en AA libres après 10 jours *post mortem*. Dans le *Triceps brachii* (**A-6**) l'augmentation est plus régulière. La cinétique de libération est différente entre les 3 muscles.

La différence observée dans la libération des acides aminés libres est cohérente avec la variabilité de maturation entre muscles déjà décrite (Dransfield et Jones, 1981). Flores *et al.* (1996) ont montré chez le porc une activité supérieure des exopeptidases alanyl aminopeptidase et aminopeptidase B dans le *Longissimus dorsi* par rapport au *Biceps femoris*. Même si nous ne pouvons indiquer quelle a été la source de variabilité intermuscle observée ici (teneur en enzyme, en inhibiteurs, conditions physico-chimiques), il apparaît que les AA libres reproduisent des différences de maturation comme le lien avec l'IFM de la leucine, de l'isoleucine, de la proline, de la thréonine, de la méthionine et de l'hydroxyproline (tabl. 3-2-1-**3**) le laissait supposer.

Parmi les cathepsines qui jouent un grand rôle dans le turn-over protéique *in vivo* (Gerard *et al.*, 1988), figurent les cathepsines A, B2 et C qui sont des exopeptidases (Goll *et al.*, 1989). Zeece *et al.* (1986a) ont observé une activité des

cathepsines pour un pH de 5,5 *in vitro*. Dans nos conditions de pH ces cathepsines ont donc pu lyser des protéines et relâcher de petits fragments protéiques. Cependant les cathepsines doivent être libérées par les lysosomes. Dutson et Lawrie (1974) affirment que les lysosomes sont rompus à 5 jours *post mortem* alors que Chambers *et al.* (1994) observent seulement 11% d'activité de la βglucoronidase à 14 jours *post mortem*. La relative inertie dans la production d'AA libres que nous avons observée pourrait provenir du délai nécessaire à l'activation des cathepsines.

Le collagène qui représente 2% des protéines du muscle et l'élastine 0,1 % (Bailey et Light, 1989), sont les seules molécules du muscle à contenir de l'hydroxyproline. Cet acide aminé est donc presque exclusivement d'origine collagénique dans le muscle. L'hydroxyproline libérée pendant le stockage (tabl. 3-2-1-**5**) provient donc de la coupure de la triple hélice du collagène. En effet, les parties globulaires de la molécule ne contiennent pas d'hydroxyproline (Bailey et Light, 1989).

Tableau 3-2-1-**5** : Teneurs en hydroxyproline libre A (µg/g MF) et part relative B rapportée au collagène total (%) dans les muscles de bovins étudiés

Jours *post mortem*	LD		TB		RF	
	m	σ	m	σ	m	σ
J3 A	21,0	5,3	23,6	4,0	26,2	8,2
B	2,9		2,0		3,3	
J5 A	30,2	7,3	30,2	9,3	36,7	11,0
B	4,2		2,5		4,7	
J10 A	39,8	6,6	34,4	8,6	36,5	6,6
B	5,5		2,9		4,6	
J14 A	81,3	15,7	40,6	10,4	55,0	9,2
B	11,2		3,4		7,0	
Teneur en collagène total (µg hydroxyproline / g de matière fraîche)	725	282	1192	268	786	369

Dutson et Lawrie (1974) ont observé une augmentation des fractions solubles du collagène (exprimées en hydroxyproline contenue dans les fragments) qui passent de 4,4 µg/ml à 1 h à 10,6 µg/ml à 14 jours *post mortem*. Ils ont conclu que la taille des fragments de collagène décroissait durant le stockage. Stanton et Light (1987, 1988, 1990) ont montré que le périmysium et l'épimysium subissaient des attaques protéolytiques. Ils ont observé une augmentation faible, mais significative de la solubilité du collagène dans la viande au bout de 14 jours *post mortem*. Dans

le muscle, coexistent des métalloprotéinases capables d'hydrolyser la triple hélice de collagène (Etherington, 1972 ; Woessner, 1991) et d'autres protéases (calpaïnes ou cathepsines) capables de dégrader les domaines globulaires où se situent les ponts entre triples hélices de collagène (Bailey et Light, 1989). Il est donc probable qu'une synergie entre ces deux types d'enzymes se mette en place, les calpaïnes ou les cathepsines dépolymérisant la structure collagénique et les métalloprotéinases sectionnant la triple hélice. Les fragments de triple hélice pourraient alors être repris par les endo- et exopeptidases de toute sorte, libérant alors peptides et AA libres parmi lesquels l'hydroxyproline serait présente. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la forte augmentation d'hydroxyproline libre pour les temps de stockage les plus longs dans notre expérience. Nishimura *et al.* (1995) observent une dégradation seulement après 10 jours ce qui corrobore nos observations. Les informations sur la dégradation des protéoglycans lors de la maturation vont dans le même sens. Eggen et Ekholdt (1995) relatent une dégradation de la décorine entre 14 et 21 jours *post mortem* et Nishimura *et al.* signalent (1996) que les protéoglycans liés à l'épimysium chutent à 40% de leur valeur initiale à 7 jours *post mortem* pour décroître régulièrement jusque 28 jours *post mortem* (dans le périmysium, la dégradation ne semble débuter qu'après 7 jours *post mortem*). Le tissu conjonctif semble bien être la cible de protéases mais dont l'action n'est sensible qu'après au moins une semaine de maturation.

Nous avons calculé la part du collagène total dégradé (tabl. 3-2-1-**6**) en considérant qu'à J3, l'hydroxyproline libre appartient au pool d'acides aminés libres lié au turn-over protéique de la cellule. En effet, l'hydroxyproline libre provient de la dégradation du collagène qui a également lieu *in vivo*. Chez des agneaux (3-4 kg de poids vif), Patureau-Mirand *et al.* (1990) observent un taux de renouvellement protéique de 12 à 14 % par jour dans le *Longissimus dorsi*. Schaefer *et al.* (1986) chez la brebis (57 kg) estiment ce taux compris entre 2 et 4,5 % dans le *Biceps femoris*. Baracos *et al.* (1991) chez la chèvre tarie de race alpine observent un turn-over protéique de 4 % dans le muscle de la cuisse. Les jeunes bovins utilisés sont encore en forte croissance et peuvent être considérés comme intermédiaires. Leur taux de renouvellement protéique est au moins de 4 %. Ce renouvellement est constant, ce qui signifie qu'en permanence au moins 4 % des acides aminés constitutifs des protéines musculaires, y compris celles du tissu conjonctif sont libres. Il est donc probable d'observer une teneur en hydroxyproline libre voisine de 5 % de l'hydroxyproline totale. Or à J3, nous retrouvons respectivement 2,9 ; 2,0 et 3,3 % d'hydroxyproline libre dans les muscles LD, TB et RF (tabl. 3-2-1-**6**), ce qui est compatible avec ces estimations.

Tableau 3-2-1-**6** : Part du collagène total dégradé (%) après J3

Jours *post mortem*	LD	TB	RF
J5	1,3	0,5	1,4
J10	2,6	0,9	1,3
J14	8,3	1,4	3,7

Dans notre expérimentation, à 14 jours *post mortem* la part du collagène dégradé est estimée à 8,3 % dans le LD, 3,7 % dans le RF et à seulement 1,4 % dans le TB (tabl. 3-2-1-**6**). Cette variabilité dans les pourcentages de collagène dégradé suggère un effet muscle sur la synergie interenzymes dans la dégradation du tissu conjonctif.

3-2-1-3 Hydroxyproline libre chez le chevreau

La teneur moyenne en hydroxyproline (OH-PRO) du muscle LD de chevreau est de 620 µg par g de MF. L'hydroxyproline libre augmente au cours du temps et représente 4,7 % de l'hydroxyproline totale à 24 jours *post mortem* (tabl. 3-2-1-**7**). Sa teneur est multipliée par 3,6. Le pourcentage du collagène total dégradé est de 3,4 %, ce qui est plus faible que la dégradation observée dans le LD bovin (tabl. 3-2-1-**6**).

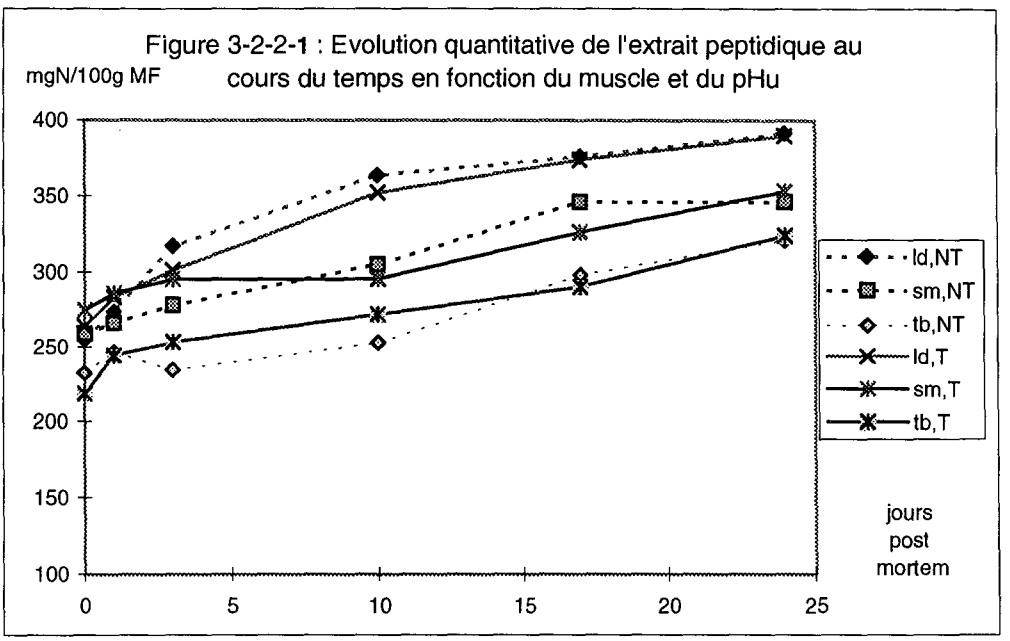
Tableau 3-2-1-**7** : Evolution de l'hydroxyproline libre au cours du stockage dans le LD de chevreau

J0		J10		J24	
µg / g de MF	% OH-PRO totale	µg / g de MF	% OH-PRO totale	µg / g de MF	% OH-PRO totale
8	1,3	13	2,1	29	4,7

Le suivi des AA libres dans 3 muscles de bovins entre 3 et 14 jours *post mortem* apporte des informations intéressantes sur le pool d'AA libérés par la protéolyse et disponible pour les réactions de Maillard lors de la cuisson de la viande, dont on connaît l'importance dans la genèse de la flaveur.

L'approche bibliographique nous a montré que la protéolyse diffère d'un muscle à l'autre. Les produits issus de la protéolyse que nous avons étudiés diffèrent également d'un muscle à l'autre. Les différences observées peuvent être rapprochées des différences de maturation. La présence d'hydroxyproline libre semble confirmer la dégradation du collagène lors du stockage de la viande. La

Figure 3-2-2-1 : Evolution quantitative de l'extrait peptidique au cours du temps en fonction du muscle et du pHu



cinétique de libération de l'hydroxyproline semble prouver que le collagène n'est dégradé de manière significative que tardivement (10 jours *post mortem*), et ce, quel que soit l'animal.

Le lien entre la dégradation des protéines constitutives de la cellule musculaire et les teneurs en AA libres n'est cependant pas direct car il existe une étape entre ces deux types de composés aminés : la fraction peptidique.

3-2-2 Fraction peptidique

3-2-2-1 Evolution quantitative de la fraction peptidique

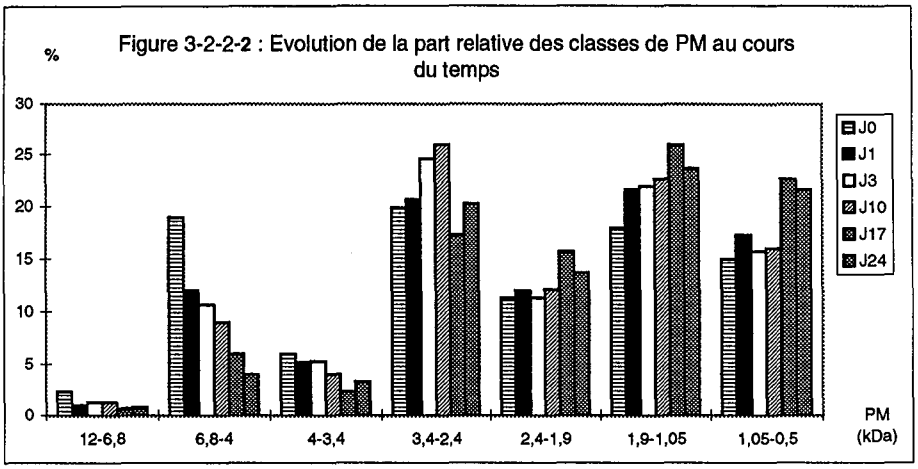
Les quantités de peptides et d'acides aminés libres augmentent au cours du stockage (fig. 3-2-2-**1**) de manière significative (tabl. 3-2-2-**1**). Mikami *et al.* (1991) observent chez le bovin une augmentation des peptides solubles dans le TCA 2%, de 100 mg/100 g de MF à 2 jours *post mortem* jusque 400 mg/100 g de MF à 21 jours *post mortem,* ce qui correspond à l'augmentation que nous avons observée.

La quantité de composés aminés de petite taille varie significativement avec le muscle (tabl. 3-2-2-**1**), elle augmente dans l'ordre TB, SM et LD. Le pH_u n'a pas d'effet et parmi les interactions testées, seule l'interaction temps*muscle est significative (tabl. 3-2-2-**1**). Ce comportement différent des muscles au cours du temps provient à la fois de la quantité de peptides présents au départ et de l'ampleur de l'augmentation de leur quantité. A J0, c'est le muscle SM le plus riche, puis LD et TB alors qu'à J24 on retrouve l'ordre LD, SM et TB. L'écart s'est creusé entre le LD et les 2 autres muscles et s'est tassé entre SM et TB. C'est dans le LD que la production de composés aminés en 24 jours est la plus forte +130 mg N/100 g de MF, puis dans le TB +100 mg/100 g de MF et la plus faible +82 mg/100 g de MF.

Tableau 3-2-2-**1** : Effet des facteurs étudiés sur la quantité d'azote de l'extrait peptidique

Facteur	DDL	p
Temps	5	***
pHu	1	NS
Muscle	2	***
Temps*pH	5	NS
Temps*muscle	10	*
pH*muscle	2	NS

*, p<0,05 ; ***, p<0,001 ; NS, non significatif.


Figure 3-2-2-2 : Evolution de la part relative des classes de PM au cours du temps
%
30
25
20
15
10
5
0
12-6,8
6,8-4
4-3,4
3,4-2,4
2,4-1,9
1,9-1,05
1,05-0,5
PM (kDa)
J0
J1
J3
J10
J17
J24

3-2-2-2 Evolution du profil des classes de poids moléculaire des peptides

Le suivi par HPLC de la fraction peptidique montre que le poids moléculaire des peptides a tendance à décroître au cours de la maturation. Il y a un décalage vers les classes de faible poids moléculaire (fig. 3-2-2-**2**), cet effet du temps est significatif (tabl. 3-2-2-**2**).

Tableau 3-2-2-**2** : Effet des facteurs étudiés sur l'évolution des différentes classes de PM de l'extrait peptidique

Classe de PM	Temps	pH	Muscle	pH*temps	Animal (pH)
12-6,8	***	***	***	***	***
6,8-4	***	**	**	NS	***
4-3,4	***	***	*	***	***
3,4-2,4	***	***	**	***	***
2,4-1,9	***	***	*	**	***
1,9-1,05	***	***	*	NS	***
1,05-0,5	***	NS	***	*	***

* , p<0.05 ; **, p<0.01 ; ***, p<0.001 ; NS, non significatif.

L'interaction muscle*temps a été retirée de l'analyse car elle était systématiquement non significative.

La part des classes de PM élevé diminue régulièrement avec le temps de stockage (fig. 3-2-2-**1** ; tabl. 3-2-2-**3**). De même apparaît une augmentation des classes de faible PM qui n'est significative qu'à partir de 10 jours *post mortem*. Il semble que la classe intermédiaire (3,4-2,4 kDa) augmente de manière significative entre J3 et J10 (tabl. 3-2-2-**3**) puis diminue pour retrouver son niveau initial (tabl. 3-2-2-**3**).

Tableau 3-2-2-**3** : Comparaison des moyennes des classes de PM par temps de stockage (tous les autres facteurs confondus)

Temps	12-6,8	6,8-4	4-3,4	3,4-2,4	2,4-1,9	1,9-1,05	1,05-0,5
J0	2,3 a*	19,3 a	6,1 a	19,6 b	11,1 a	17,8 a	14,9 a
J1	1,1 b	11,7 b	5,2 b	20,4 b	12,0 a	21,5 bd	17,1 b
J3	1,6 c	10,5 b	5,4 b	24,6 c	11,1 a	21,8 bd	15,1 b
J10	1,5 bc	7,8 c	3,9 c	25,9 c	12,3 abc	22,5 bd	15,8 b
J17	0,8 b	4,3 d	2,5 d	17,3 a	15,6 b	25,7 c	22,3 c
J24	0,9 b	3,9 d	3,3 cd	20,1 b	13,6 c	23,2 bd	21,5 c

* : les valeurs d'une colonne comportant une lettre identique ne diffèrent pas au seuil de 5%.

L'interaction pH*temps est principalement due à une augmentation plus rapide des petits peptides pour les pH inférieurs à 6 (tabl. 3-2-2-**4**).

La répétition de teneurs significativement supérieures chez les animaux dont le pH est inférieur à 6 pour les classes de faible PM (2,4-0,5 kDa) entre J3 et J17 (tabl. 3-2-2-**4**), de teneurs significativement inférieures pour les classes de PM intermédiaire (3,4-2,4 kDa) entre J1 et J10 (tabl. 3-2-2-**4**) et de teneurs supérieures pour les classes de fort PM (12-4 kDa) entre J1 et J10 (tabl. 3-2-2-**4**) suggère un retard dans la fragmentation en petits peptides chez les animaux dont le pH est supérieur à 6. Une interprétation possible de cette observation serait une origine différente du morcellement des peptides. Si les cathepsines sont en partie responsables de l'apparition des petits peptides, l'inhibition de leur activité par le pH pourrait expliquer le retard dans la coupure des classes intermédiaires. Le clivage des forts PM serait plutôt du à des protéases neutres telles les calpaïnes ou le MCP. Dransfield (1993) a montré une corrélation positive entre vitesse de maturation et pH_u. Cette augmentation de vitesse de la protéolyse serait due à une activité supérieure et prolongée des calpaïnes, notamment de la µcalpaïne grâce à des conditions de pH plus proches du pH optimum de l'enzyme.

Tableau 3-2-2-**4** : Contrastes de l'interaction pH*temps

Temps	pH	12-6,8	6,8-4	4-3,4	3,4-2,4	2,4-1,9	1,9-1,05	1,05-0,5
J0	<6	1,6 bd*	20,0 a	7,0 a	19,6 b	11,6 d	18,9 c	14,4 de
J0	>6	3,1 a	18,7 a	5,1 b	19,5 bc	10,6 d	16,8 d	15,4 de
J1	<6	1,0 c	13,6 b	6,4 a	21,9 b	11,9 cd	21,5 bc	15,9 cd
J1	>6	1,3 b	9,7 de	3,9 c	18,9 cd	12,1 cd	21,6 bc	18,4 bc
J3	<6	1,0 c	11,4 cd	6,1 ab	21,9 b	12,0 cd	23,7 b	15,9 bd
J3	>6	2,1 bd	9,7 de	4,7 b	27,3 a	10,1 d	19,9 c	14,3 d
J10	<6	1,0 c	7,6 de	3,4 c	22,2 b	14,5 a	24,6 b	18,2 cd
J10	>6	2,0 bd	8,0 de	4,4 b	29,7 a	10,0 d	20,3 c	13,5 e
J17	<6	0,8 c	4,2 f	3,1 c	17,1 d	17,2 a	27,4 a	22,6 a
J17	>6	0,8 c	4,4 f	2,0 d	17,6 d	14,0 b	24,0 b	22,1 a
J24	<6	1,2 bc	5,0 f	4,6 b	19,0 cd	13,7 b	23,4 b	21,9 a
J24	>6	0,6	2,8 f	1,9 d	21,3 bc	13,5 b	23,1 b	21,2 ab

* : les valeurs d'une colonne comportant une lettre identique ne diffèrent pas au seuil de 5%.

Les effets muscle et temps sont systématiquement significatifs. A partir des valeurs des moyennes pondérées (LSMEANS) fournies par SAS, nous avons calculé la moyenne des PM pour chaque traitement, les trois muscles étant confondus. Pour cela nous avons estimé le poids moyen des peptides d'une classe par la moyenne des 2 PM extrêmes de cette classe. Par exemple, le poids moyen des peptides de la classe 3,4-2,4 est estimé à 2,9 kDa.

Ce calcul donne 2,37 kDa pour le LD, 2,35 kDa pour le SM et 2,53 kDa pour le TB (pour un temps moyen de 10 jours *post mortem*). L'écart le plus grand est de 180 Da soit environ 1,5 AA si on prend 120 Da comme poids moyen d'un acide aminé. En moyenne le TB a des peptides qui comportent un AA de plus que le LD et le SM pour une longueur moyenne des peptides de 20 AA. Ceci ne permet pas de conclure sur une éventuelle différence de protéolyse entre muscles.

Par contre le même calcul réalisé tous muscles confondus pour les 2 temps extrêmes de stockage (2 h et 546 h *post mortem*) est plus probant. A 4 h, la longueur moyenne est de 2,94 kDa contre 2,07 à 504 h *post mortem*. Cette différence correspond à une diminution d'environ 7 AA sur 20. La maturation durant 3 semaines a donc réduit la longueur moyenne des peptides de 30 %. Cette approximation confirme le fait qu'à 4 h *post mortem*, 47 % des peptides analysés ont un PM supérieur à 2,4 kDa alors que 21 jours plus tard seulement 28 % d'entre ont toujours un PM supérieur à 2,4 kDa.

Ce décalage vers les classes de faible PM peut être interprété de la façon suivante. La quantité de peptides augmente, approvisionnée par la coupure de protéines. Comme l'activité endopeptidasique diminue, le nombre de peptides de grande de taille qui entrent dans le compartiment des composés azotés solubles dans l'acide se réduit, il y a de plus en plus de petits peptides qui arrivent. D'autre part les gros peptides ont tendance à être recoupés et à produire des petits. Ces événements conjoints contribuent alors à la diminution de la part relative des peptides de grande taille et à la réduction globale de la longueur des peptides.

3-2-2-3 Relation entre l'évolution des peptides et la dégradation des protéines myofibrillaires

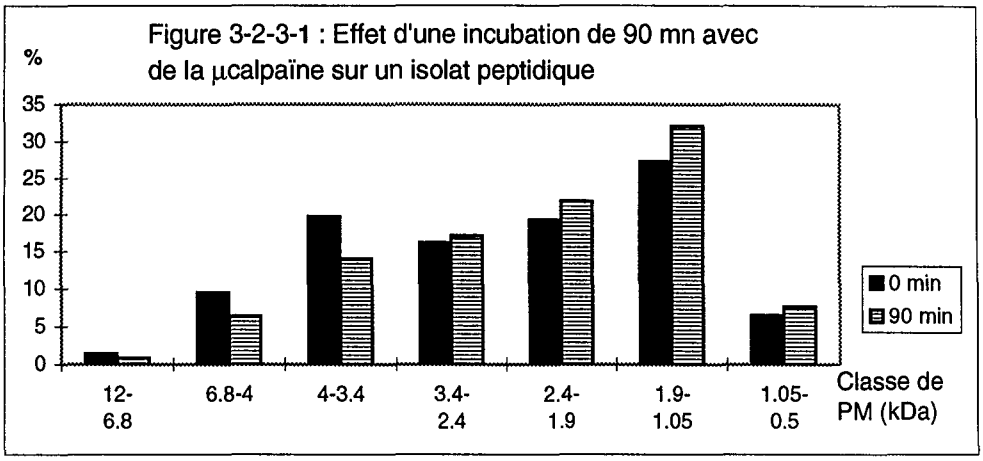
Tableau 3-2-2-**5** : Evolution des quantités de troponine T et I et du fragment de 30 kDa exprimées en mg/g de protéine myofibrillaire équivalent BSA au cours du temps chez les chevreaux

	$pH_u<6$						$pH_u>6$					
	J1		J10		J15		J1		J10		J15	
	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ
Troponine T	6,91	2,61	0,06	0,08	0,06	0,06	10,88	0,22	3,69	0,70	0,61	0,50
30 kDa	1,24	0,71	8,67	1,29	7,83	2,01	0,60	0,22	7,30	1,50	11,3	2,61
Troponine I	9,55	1,10	6,21	1,15	4,61	2,61	10,41	1,25	7,25	3,26	6,10	3,15

La troponine T diminue très fortement chez les chevreaux. Avant le dixième jour elle a quasiment disparu (tabl. 3-2-2-**5**). Le composé de 30 kDa apparaît rapidement et son évolution correspond bien à la diminution de la troponine T comme relaté dans la bibliographie (Negishi *et al.*, 1996). La troponine I est dégradée plus lentement et la dégradation continue entre 10 et 15 jours *post mortem*. La dégradation de la troponine T que la bibliographie permet de lier à l'évolution de la tendreté (Olson *et al.*, 1976 ; Penny et Dransfield, 1979) est donc découplée de la forte augmentation de la fraction ANP et du fractionnement de celle-ci. Ce découplage entre évolution des composés structuraux et évolution de la tendreté a déjà été observé par Parrish *et al.* (1969). Certaines protéines continuent d'être dégradées comme la troponine I, ce qui continue à alimenter la fraction peptidique. De plus pour des temps de stockage prolongés, les gros peptides comme le 30 kDa sont dégradés et diminuent (E. Claeys, communication personnelle).

L'augmentation de la fraction ANP se fait donc au début directement par coupure des protéines, et ensuite à la fois par dégradation des protéines et par redécoupage des fragments produits antérieurement.

Le pH_u semble avoir une influence sur la vitesse de dégradation des protéines de haut poids moléculaire. Watanabe et Devine (1996) trouvent une relation curvilinéaire entre le pHu et la dégradation de la nébuline et de la titine. Pour un pH_u de 7, la première bande de titine et la nébuline ont déjà disparu à 24 h, c'est presque aussi rapide pour un pH_u de 5,4 mais il faut attendre 48 h pour que cela se produise dans les échantillons dont le pHu est compris entre 6,0 et 6,3. Dans


Figure 3-2-3-1 : Effet d'une incubation de 90 mn avec de la μcalpaïne sur un isolat peptidique
%
35
30
25
20
15
10
5
0
12-6.8
6.8-4
4-3.4
3.4-2.4
2.4-1.9
1.9-1.05
1.05-0.5
Classe de PM (kDa)
0 min
90 min

notre expérimentation la troponine T est davantage dégradée chez les animaux dont le pH_u est inférieur à 6 (tabl. 3-2-2-**5**) à J1 et J10. Ce décalage est peut être à relier au retard dans l'apparition des peptides de faible poids moléculaire chez les animaux dont le pH_u est supérieur à 6. Dransfield (1981) cité par Alarcon-Rojo et Dransfield (1996) observe une vitesse de maturation 4 fois plus faible chez des animaux dont le pH_u est compris entre 6,3 et 6,5 par rapport à des animaux de pH_u compris entre 5,0 et 5,9. Or dans notre expérimentation le lot pH>6 a un pH moyen de 6,35 et le lot pH<6 a un pH moyen de 5,70.

Il y a donc diminution de la taille moyenne des peptides lors du stockage de la viande, diminution particulièrement significative après 10 jours de stockage. L'effet du pH_u induit l'hypothèse de l'intervention d'enzymes différentes dans le remaniement de ces peptides. Il est donc intéressant de se pencher sur l'interaction entre peptides et protéases. Les enzymes auxquelles est attribué l'effet principal d'attendrissage sont les calpaïnes. Johnson et Hammer (1981) ont observé un effet inhibiteur de dipeptides et de la 3méthyl-histidine sur l'activité des calpaïnes. Nous ne nous intéresserons pas à l'interaction des AA libres et de ces protéases car les concentrations en AA libres que nous avons observées sont très en deçà des concentrations pour lesquelles ils ont obtenu une interaction. En revanche, nous avons testé l'interaction peptides-calpaïnes.

3-2-3 Interactions entre produits de la protéolyse et enzymes protéolytiques

3-2-3-1 Les peptides : des substrats pour la µcalpaïne bovine

Nous avons fait incuber des peptides issus de long dorsal de chevreau (isolés à J0) avec de la µcalpaïne bovine. Nous avons alors comparé l'évolution des aires relatives (exprimées en % de l'aire totale des différentes classes) de chaque classe de poids moléculaire avant et après incubation (fig. 3-2-3-**1**). Les classes de poids moléculaires les plus élevés (12 à 3,4 kDa) voient leur part diminuer significativement après 90 mn d'incubation (tabl. 3-2-3-**1**). Les peptides correspondants sont donc dégradés par la µcalpaïne. Les peptides de la classe intermédiaire sont sans doute attaqués eux aussi mais l'arrivée de fragments issus des classes supérieures font que la taille de cette classe demeure stable. Les classes de faible poids moléculaire (1,9-0,5 kDa) augmentent de manière significative mais pas la plus faible. La calpaïne ne semble pas relâcher d'acides aminés ou de dipeptides, ce qui correspond à son activité endopeptidasique connue.

Les peptides isolés dans nos conditions sont donc bien un substrat potentiel pour les calpaïnes, notamment pour des poids moléculaires supérieurs à 3000 Da.

Figure 3-2-3-2 : Effet d'une concentration croissante de peptides sur l'activité de la µcalpaïne

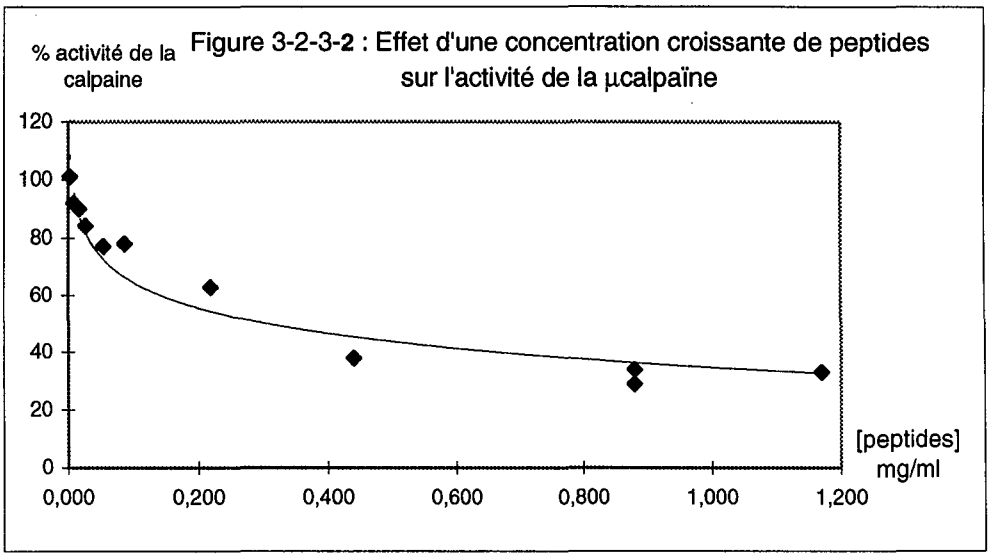


Tableau 3-2-3-1 : Effet d'une incubation de 90 mn avec de la µcalpaïne sur un isolat peptidique, résultats du test de comparaison de moyenne (3 répétitions)

Classe de PM (kDa)	% de l'aire totale avec calpaïne sans incubation	% de l'aire totale avec calpaïne et incubation (90 mn)	p
12-6,8	1,59	0,89	***
6,8-4,0	10,75	7,02	**
4,0-34	17,52	13,06	**
3,4-19	15,81	16,62	NS
1,9-1,05	19,30	21,69	**
1,05-0,5	28,26	32,74	**
0,5-0,08	6,76	8,00	NS

* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001, NS : non significatif.

3-2-3-2 Les peptides : inhibiteurs de l'activité de la µcalpaïne

Nous avons testé l'éventuel effet des peptides extraits de viande de chevreau (10 jours *post mortem*) sur l'activité de la µcalpaïne bovine testée avec du SLT.

Plus la concentration en peptides est élevée, plus l'activité de l'enzyme sur le SLT est inhibée (fig. 3-2-3-**2**). Son activité atteint cependant un plateau situé entre 30 et 35 % d'activité pour les plus fortes concentrations de peptides testées. Le type de la courbe suggère une inhibition compétitive car la courbe semble être une exponentielle décroissante et non une droite.

L'utilisation de produits de PM donné a été tentée afin de déterminer si le PM de la structure protéique (peptidique) avait un rôle dans cette inhibition. Pour une même concentration (mg/ml), ce sont les peptides de chevreau qui ont la plus forte activité inhibitrice puis l'insuline puis la BSA (fig. 3-2-3-**3**). Pour une concentration donnée, il y a plus de molécules de peptides (9 < PM < 0,5 kDa et PM = 2,1 en moyenne) en circulation que d'insuline (PM = 3 kDa) et que de BSA (PM = 67 kDa) ce qui augmente le risque de rencontre avec une molécule d'enzyme. Ce raisonnement probabiliste pourrait expliquer l'inhibition compétitive plus forte observée pour les peptides. Si on transforme les quantités en nombre de moles/ml, on s'aperçoit que les peptides susceptibles de se fixer sur le site actif de l'enzyme sont effectivement beaucoup plus nombreux (fig. 3-2-3-**4**). Cependant les peptides dégradés lors de l'incubation avec la µcalpaïne ne faisaient pas partie de toutes les classes de PM. En effet ce sont les peptides d'un PM supérieur à 4 kDa qui ont été

Figure 3-2-3-3 : Effets comparés de l'isolat peptidique, de la BSA et de l'insuline en fonction de leur concentration massique sur l'activité de la µcalpaine

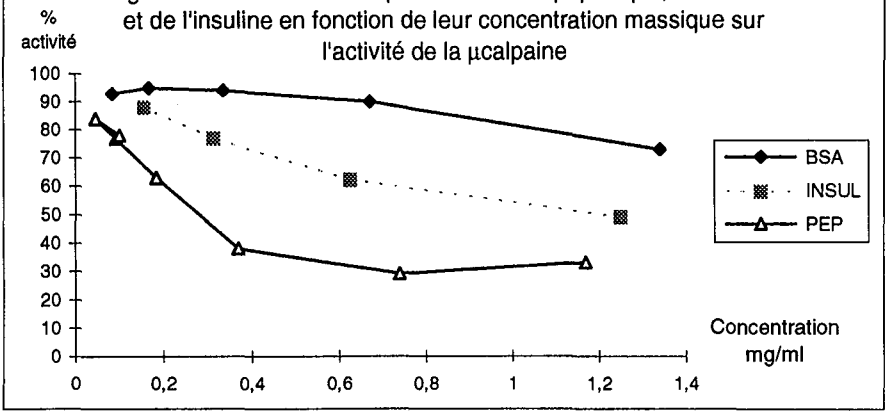
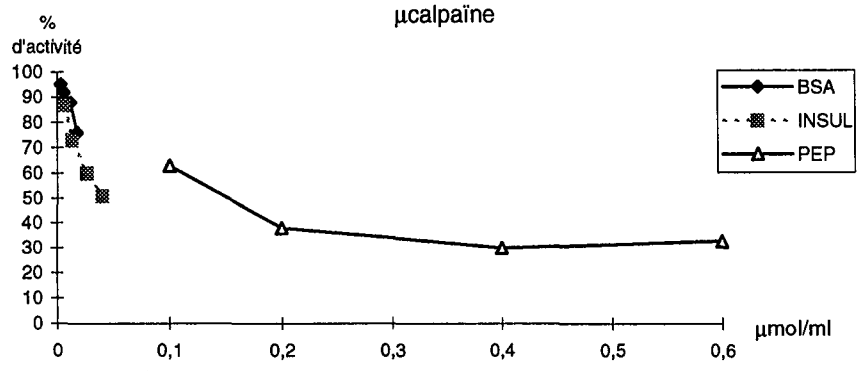
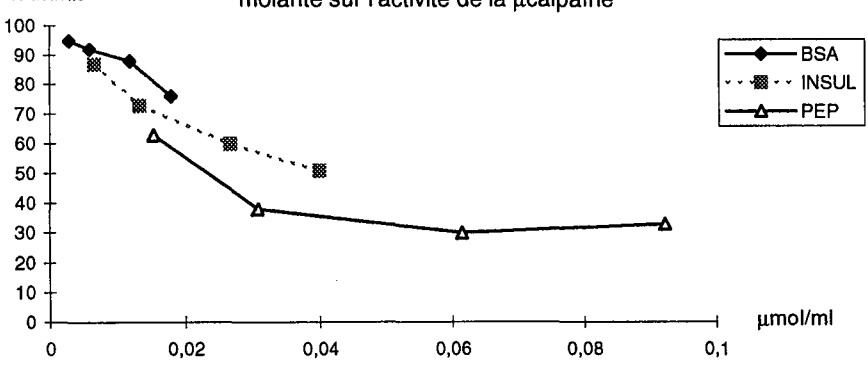


Figure 3-2-3-4 : Effets comparés de l'isolat peptidique, de la BSA et de l'insuline en fonction de leur molarité sur l'activité de la µcalpaïne



Figures 3-2-3-5 : Effets comparés de l'isolat peptidique ramené à sa part dégradée, de la BSA et de l'insuline en fonction de leur molarité sur l'activité de la µcalpaïne



dégradés. Si cette part seulement des peptides intervient sur la μcalpaïne pour l'inhiber, cela réduit fortement le nombre de molécules en cause et l'amène à un chiffre bien inférieur au nombre de molécules d'insuline provoquant une inhibition équivalente (fig. 3-2-3-**5**). La taille de la BSA et sa faible mobilité dans la solution semblent pouvoir expliquer son faible pouvoir inhibiteur par rapport aux peptides. L'insuline elle n'a pas ce handicap de diffusion de part sa taille de 3 kDa. Les peptides dégradés sont d'une taille comprise entre 4 et 12 kDa. Il semblerait donc que pour une concentration de substrat donnée, il y ait un optimum de PM. Il serait intéressant de poursuivre ces essais avec des peptides fractionnés par classe de PM, voire d'introduire des peptides marqués dans de la viande et de suivre leur dégradation et l'évolution parallèle de l'activité des calpaïnes en fonction du PM des peptides introduits.

Remarque : Des polymères d'alanine de poids moléculaire 1-5 et 10-15 kDa ont été testés sans succès sans que nous puissions interpréter ce fait. Les hypothèses envisageables sont une faible affinité de la calpaïne pour des liaisons ala-ala ou une faible solubilité de ce composé.

Bien qu'il existe des inhibiteurs de protéases de faible poids moléculaire (les stéfines responsables d'une inhibition réversible et compétitive) qui auraient pu se retrouver dans la fraction peptidique extraite et inhiber les calpaïnes, la combinaison de nos deux expériences montre que la fraction peptidique a inhibé la calpaïne en entrant en compétition avec son substrat.

Ceci pourrait avoir une importance dans la compréhension de la chute brutale de l'attendrissage *post mortem* de la viande alors que d'après la bibliographie, la mcalpaïne notamment reste stable à environ 70% de son activité initiale (Whipple *et al.*, 1990). Si les calpaïnes sont bien les enzymes majeures de la protéolyse induisant l'attendrissage de la viande (Uytterhaegen *et al.*, 1994 ; Dransfield, 1992,1993), leur rétro-inhibition partielle (fig. 3-2-3-**2**) par des produits de dégradation engendrerait une chute de leur activité assez rapidement et un ralentissement de l'attendrissage. Ceci demeure une hypothèse dont les mécanismes *in vivo*, notamment le rapport peptides/protéines pour lequel débuterait cette inhibition ou la taille de peptides "optimale", restent à préciser et à vérifier.

3-3 Etude des relations entre minéraux libres et protéolyse

3-3-1 Expérience 1 : lapins

Les résultats d'ANP sont exprimés en p100 de l'azote total (tabl. 3-1-1-**1**). Bruas et Brun-Bellut (1996) dans des conditions de maturation identiques aux nôtres n'ont pas observé de variation de la teneur en azote total.

Tableau 3-3-1-**1** : Comparaison des quantités d'ANP entre traitements

Variables	Témoins		Stressés		Probabilité
	m	σ	m	σ	
$ANP_{0,2}$ %N/N total	4,06	0,28	4,02	0,39	85,1
ANP_{48} %N/N total	5,82	0,61	6,64	0,61	4,3
ANP_{144} %N/N total	7,28	0,58	7,90	0,66	15,2

Nous obtenons une moyenne de 0,15% (N/MF) 12 minutes après la mort. Ce n'est qu'à 48 heures que nous obtenons un pourcentage de 0,228% puis 0,279% à 144 heures *post mortem*. Haddad (1995) pour des lapins de même type qui observe une teneur en ANP de 0,224% à une heure *post mortem* semble obtenir une quantité proche de nos résultats mais plus précocement malgré une cinétique de refroidissement voisine. Cet ANP présent en quantité importante constitue un pouvoir tampon non négligeable qui est peut-être à l'origine de la remontée du pH. En effet à 7 jours *post mortem* le pH moyen de nos animaux est remonté de 0,11 unité pH par rapport au pH_{48} (tabl. 3-1-1-**1**). Une telle remontée a été également observée par Cabanes-Roiron *et al.* (1994), les pH passant de 5,81 à 5,91 entre J_1 et J_8 pour se stabiliser ensuite jusqu'à J_{12} dans leur expérience.

La fraction ANP n'est pas différente entre les deux traitements (tabl. 3-2-2-**1**) à la mort de l'animal. Avant que la protéolyse ne débute, le stock d'ANP est donc identique entre les deux groupes. Par contre à 48 heures *post mortem* l'ANP est significativement supérieur chez les stressés. La protéolyse terminale qui s'est déroulée entre 12 minutes et 48 heures *post mortem* est donc supérieure chez les stressés. Cette différence s'atténue à 144 heures *post mortem* et devient non significative. Le traitement paraît provoquer une protéolyse terminale plus précoce mais ne modifie pas son intensité globale puisqu'une maturation plus longue (7 jours) aplanit les différences entre stressés et témoins.

Il est probable que la production plus précoce d'ANP chez les lapins stressés est due à une activation protéolytique plus précoce. Cependant cette activation serait à relier à une libération plus précoce de calcium que nous n'avons pas réussi

à suivre correctement dans cette étude. Les observations réalisées sur les autres ions ne nous permettent pas de conclure plus précisément sur l'interaction ions libres-protéases.

3-3-2 Relations entre minéraux libres et protéolyse

Tableau 3-3-2-**1** : Quantité finale d'ions libérés en fonction du pH_u chez le chevreau

Ion	pH>6	Σ	pH<6	Σ
Sodium	14,4		16,1	
Magnésium	25,7		38,9	
Potassium	68,4	221	64,6	263
Chlore	19,7		21,0	
Phosphate	36,9		29,6	
Lactate	55,7		92,0	

La somme des ions libres étudiés est de 221 mmol/kg MF pour les animaux traités et 263 mmol/kg MF pour les non traités, soit respectivement 292 et 347 mmol/l d'eau.

La plupart des articles attribuent la modification de l'activité protéolytique à une différence de force ionique, donc à un effet de la quantité d'ions présents.

Le traitement a engendré une diminution des ions libérés (tabl. 3-3-2-**1**), qui équivaut à une perte de 26 mM équivalent NaCl. Si l'on considère que la force ionique finale (non mesurée ici) est de 300 mM équivalent NaCl (Winger et Pope, 1980-81 ; Bonnet *et al.*, 1992) cette différence équivaut à une diminution de la force ionique de 8% environ. Ce changement minime abaisse la force ionique et l'amène en deçà de la zone 300-400 mM équivalent NaCl pour laquelle, d'après Kendall *et al.* (1993) l'activité des calpaïnes varie avec la force ionique.

Dans notre expérience la différence de pH_u a certainement eu plus d'effet sur l'activité des protéases que la faible amplitude de force ionique observée.

Geesink *et al.* (1992) observent une pression osmotique inférieure dans le *Rectus abdominis* (RA) et le *Diaphragma* (D) par rapport au *Longissimus* (LD), au *Semimembranosus* (SM) ou au *Triceps brachii* (TB). Ils observent également une bonne corrélation (r=0,79) entre cette pression osmotique et la force de cisaillement de ces muscles. La teneur en collagène est supérieure (exprimée en mg de collagène par g de viande) pour le SS (5,07) et le RA (3,81) par rapport au TB (3,42) ou au LD (2,76) selon Bailey et Light (1989). Le ratio calpaïnel/calpastatine qui est très lié à l'attendrissage relatif (r=0,93) dans la même expérience (Geesink *et al.*,

1992) est inférieur pour les muscles D et SS. Ces 2 facteurs vont dans le sens d'une tendreté moindre pour les muscles RA et D. Les équivalences en molarité de NaCl calculées à partir des osmolalités mesurées par Geesink *et al.* (1992) sont respectivement 253, 265, 280, 284, 290, 292 mM pour les muscles RA, D, SS, TB, LD et SM. Ces variations sont bien en deçà des valeurs de force ionique pour lesquelles Kendall *et al.* (1993) ont observé un effet sur l'activité des calpaïnes sur des myofibrilles. Ils observent une augmentation de l'activité uniquement pour des valeurs supérieures à 300 mM de KCl et pour des pH supérieurs à 6,2. Or ce n'est pas le cas dans les muscles étudiés. Les différences d'osmolalité observées semblent à relier au type métabolique des muscles étudiés. Le pH_u des muscles D et RA est supérieur de 0,2 unité au pH des autres muscles étudiés (TB, SM, LD et SS) d'après Talmant et Monin (1986). Le pouvoir tampon exprimé en µmol de lactate par unité de pH varie entre 40 et 43 pour SS, D et RA alors qu'il se situe autour de 50 pour SM, LD et TB (Talmant *et al.*, 1986). Il y a eu plus de lactate produit dans les muscles LD, SM, TB et SS que dans les muscles D et RA, ce qui correspond à une pression osmotique supérieure.

Il apparaît que les différences d'osmolalité des muscles sont dues à un métabolisme énergétique *post mortem* différent, que l'amplitude de ces différences est faible et inférieure au seuil cité dans la bibliographie pour lequel la force ionique affecte la protéolyse. Les différences de potentiel protéolytique, de teneur en collagène, voire de susceptibilité à la protéolyse des protéines entre muscles de type métabolique différents seraient plus à même d'expliquer les différences d'attendrissage observées que les amplitudes de force ionique dans l'expérimentation de Geesink *et al.* (1992). Hormis pour le calcium testé à 0,1 mM par Takahashi *et al.* (1987) et Takahashi *et al.* (1996) toutes les expériences (Koohmaraie *et al.*, 1989 ; Taylor et Etherington, 1991 ; Kerth *et al.*, 1995) ont utilisé des concentrations finales d'ions *in situ* supérieures ou égales à 30 mM de $CaCl_2$, soit 60 mM équivalent NaCl. Cet ajout porte la force ionique au delà des 300 mM équivalent NaCl valeur obtenue jusqu'ici pour la viande en *post rigor* (Winger et Pope, 1980-81 ; Bonnet *et al.*, 1992 ; Geesink *et al.*, 1992). L'effet positif sur l'attendrissage obtenu dans ces expériences ne peut donc pas permettre de conclure que les amplitudes de force ionique mesurées dans la viande non traitée affectent la protéolyse *post mortem*. Il serait intéressant de mesurer la force ionique dans des muscles PSE dont le fort potentiel glycolytique pourrait entraîner une force ionique plus élevée que 300 mM équivalent NaCl.

Le profil des ions libérés semble pouvoir affecter de façon notable l'activité du système protéolytique. Taylor et Etherington (1991) obtiennent un effet identique (solubilisation de la protéine C, de la troponine I et solubilisation partielle de la

Figure 3-3-3-1 : Effet du magnésium sur l'activité de la µcalpaïne

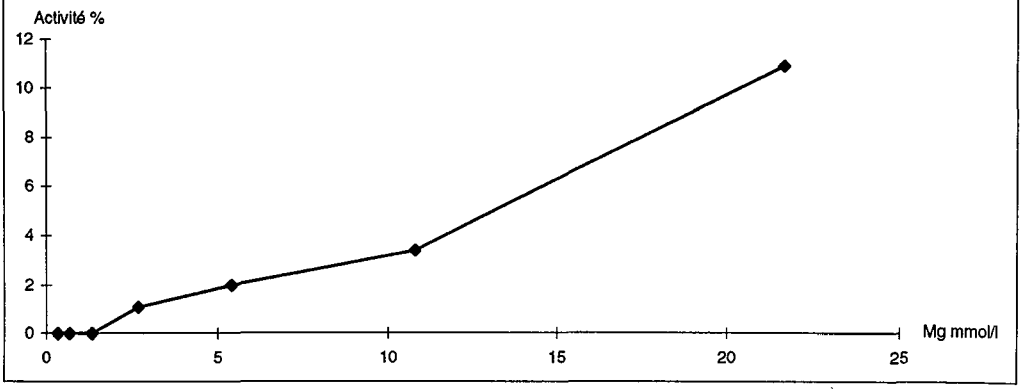


Figure 3-3-3-2 : Courbe d'activation de la µcalpaïne par le calcium

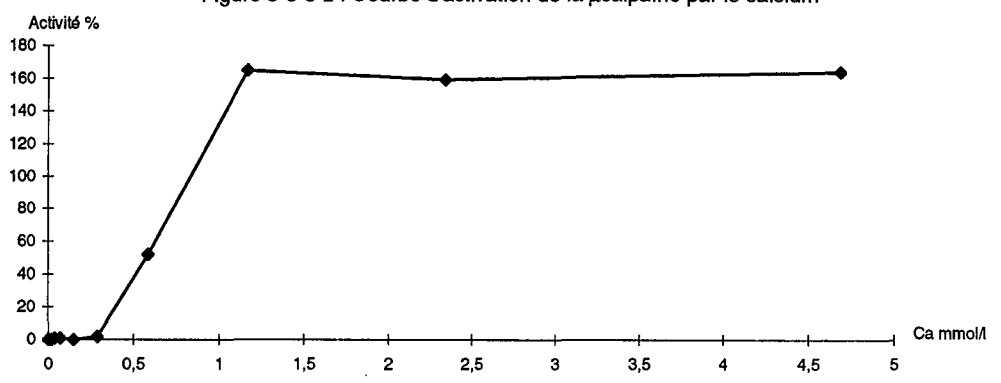
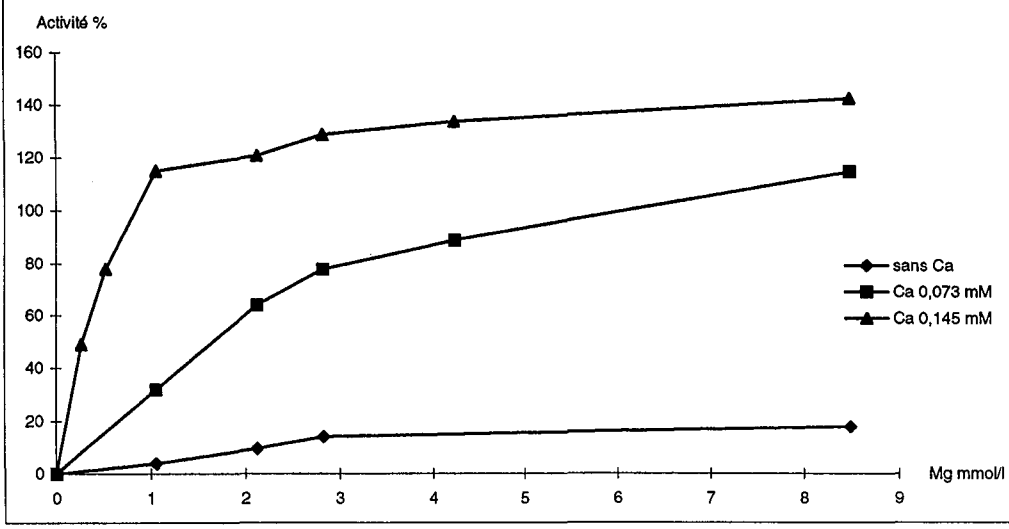


Figure 3-3-3-3 : Effet d'un apport de magnésium sur l'activité de la µcalpaïne en présence d'une concentration de calcium subactivatrice



troponine T et de la tropomyosine) en incubant des myofibrilles de lapin avec du $CaCl_2$ ou du $MgCl_2$ 30 mM. Or avec du $ZnCl_2$ utilisé à la même concentration, ils n'observent pas de solubilisation. Comme l'effet est immédiat, il ne s'agit pas de processus enzymatiques. On ne peut donc pas alléguer l'effet inhibiteur du zinc sur les cystéine-protéinases montré par Koohmaraie (1990) ou Whipple et Koohmaraie (1991). Il ne s'agit pas non plus d'un effet de la force ionique puisque les 3 traitements engendrent une élévation quasi-identique de la force ionique mais que l'un d'eux n'a pas eu d'effet. La seule hypothèse est une action spécifique des 2 cations divalents calcium et magnésium sur les protéines musculaires.

L'effet du calcium a été largement décrit *in vitro* sur les calpaïnes. Penny (1980), a évoqué une synergie possible du magnésium avec le calcium pour l'activation des calpaïnes, nous avons donc testé l'effet du magnésium seul et son interaction avec le calcium sur l'activité de la µcalpaïne.

3-3-3 Effet du magnésium libre sur l'interaction calcium-calpaïnes

L'effet d'une concentration croissante de magnésium (fig. 3-3-3-**1**) a été testée sur l'activité de la µcalpaïne dont la courbe d'activation par le calcium est connue (fig. 3-3-3-**2**). L'activité nulle correspond au blanc c'est à dire substrat et enzyme incubés sans calcium ou sans magnésium.

Le magnésium atteint +80% d'activation pour une concentration comprise entre 15 et 25 mmol/l. Or dans le muscle en *post rigor*, la teneur moyenne en magnésium libre de nos chevreaux non traités est de 3,5 mmol/kg MF soit environ 4 mmol/l d'eau et de 3,1 mmol/kg MF chez les lapins soit environ 3,5 mmol/l d'eau. Pour cette concentration l'activation n'est que de +10% donc négligeable. Le magnésium ne semble pas capable d'activer seul la µcalpaïne pour les concentrations qu'il atteint dans le muscle. Ce seuil est supérieur à la concentration totale dans le muscle, comprise entre 10 et 12 mM (Park, 1990 ; Dumont et Hudzik, 1990). Cependant dans le muscle le magnésium n'est pas seul et pourrait interagir avec le calcium (Penny, 1980).

Nous avons donc utilisé 2 concentrations en calcium "subactivatrices" (c'est à dire des concentrations en deçà du seuil d'activation de la µcalpaïne) avec une gamme de magnésium (fig. 3-3-3-**3**) proche des teneurs libres du muscle *post mortem*. Le zéro d'activité est identique : l'absence de magnésium entraîne une absence d'activation dans les 3 traitements. Le magnésium seul active peu l'enzyme mais en présence d'une concentration de calcium incapable par elle seule d'activer la µcalpaïne, il active fortement l'enzyme. La présence de calcium 0,073 et 0,145 mM multiplie respectivement par 6 et par 20 l'activation produite par du magnésium 1 mM seul. Il y a donc synergie entre le calcium et le magnésium pour l'activation de la µcalpaïne. L'activation semble d'autant plus forte que le calcium se

rapproche du seuil d'activation. Une concentration en magnésium de 3 mmol/l entraîne une activation de la µcalpaïne par du calcium 0,073 mM équivalente à une activation par du calcium 7 fois plus concentré (fig. 3-1-1-**1** et **3**). Or dans le muscle Jeacoke (1993) observe une libération du magnésium qui précède légèrement celle du calcium. Le magnésium libre *ante rigor* est de l'ordre de 0,5 mM (Jeacoke, 1993) et nous avons mesuré des concentrations de 1,5 mmol/kg à 1 h *post mortem*. De telles concentrations interagissent déjà fortement avec des teneurs en calcium subactivatrices. La présence de magnésium libre pourrait permettre une activation *in situ* des calpaïnes par le calcium pour des taux inférieurs à ceux estimés *in vitro* avec du calcium seul.

Alarcon-Rojo et Dransfield (1996) avec du $MgCl_2$ 30 mM ont obtenu un attendrissage à un jour *post mortem* certes moins important qu'avec du $CaCl_2$ 30 mM mais plus important qu'avec du NaCl ou du KCl 30 mM. Ces différences prouvent que le magnésium a un effet d'activateur du système protéolytique, même s'il est faible, en plus du simple effet d'augmentation de la force ionique. Ishiguro *et al.* (1987) et Yoshimura *et al.* (1983) cités par Alarcon et Dransfield (1995) ont observé *in vitro* une activation avec du magnésium respectivement 5 et 10 mM de la mcalpaïne humaine et des µ– ou mcalpaïnes de rein de rat.

Taylor et Etherington (1991) ont obtenu une solubilisation immédiate et identique avec du $CaCl_2$ ou du $MgCl_2$ mais pas avec du Cl_2. Le calcium et le magnésium ont donc eu un effet indépendant de la force ionique. Cependant comme la solubilisation est immédiate, ces auteurs interprètent cette solubilisation comme une action non enzymatique de ces cations divalents sur les protéines myofibrillaires.

Le magnésium agit sur le couple calcium-calpaïne. Sa vitesse comme son intensité de libération peuvent être affectées par les conditions d'abattage utilisées dans notre expérimentation. Il serait nécessaire d'identifier les facteurs qui, en plus du pH, peuvent jouer sur les teneurs finales en calcium et en magnésium libres. La teneur en parvalbumines et leur affinité pour le magnésium (et le calcium) qui varient avec le type de fibres (Schmitt et Pette, 1991) pourraient être une piste à suivre. D'une part un pH_u différent (effet décrit dans la partie précédente) mais aussi une teneur en parvalbumines différente. Schmitt et Pette (1991) citent une forte variation des teneurs en parvalbumines suivant le type de fibres musculaires (15 à 600 fois plus dans des fibres de type IIB par rapport à des fibres I) chez le lapin. De plus Haiech *et al.* (1979) citent 2 types de parvalbumines, un type α (pI>5) et un type β (pI proche de 4), le type β ayant une affinité plus forte pour les cations divalents. Une protéine dont le pI est proche de 4 (type β) pourra toujours fixer le magnésium lorsque le pH est proche de 5,5. A l'opposé une parvalbumine dont le pI est légèrement supérieur à 5 sera amphotère à ce même pH et ne pourra plus fixer cet

ion. Le type contractile du muscle pourrait donc être un facteur de variation important de la teneur en magnésium libre.

La bibliographie établit donc une action du magnésium similaire à celle du calcium mais de moindre intensité. Nos observations sont favorables à un rôle enzymatique du magnésium révélé notamment par une synergie activatrice du calcium et du magnésium pour l'activation de la μcalpaïne bovine.

CONCLUSION

Tous les ions étudiés sont libérés lors de l'établissement de la *rigor mortis*. Leur libération est liée au pH mais ce n'est pas le seul facteur explicatif. Le phosphate et le lactate sont liés aux phénomènes qui conditionnent l'évolution du pH. Le phosphate libre dépend essentiellement de l'état d'épuisement des réserves énergétiques et le lactate des réserves énergétiques présentes à la mort de l'animal. Le sodium et le chlore évoluent régulièrement après la mort. Le potassium et le magnésium libres augmentent beaucoup et semblent plus dépendre de la rupture des compartiments membranaires que les deux ions précédents. Le magnésium est cependant très lié au pH car de nombreuses protéines du cytoplasme présentent une forte affinité pour cet ion. Même si sa teneur augmente fortement, la part du magnésium libre par rapport au magnésium total reste faible (environ 30 %). Cet élément est certainement présent sous des formes de sels insolubles dans le muscle contrairement au potassium (80 à 100 % de potassium libre). La composition chimique globale du muscle ne semble pas liée à l'aptitude du muscle à relâcher les ions.

Les teneurs totales en ions observées diffèrent peu dans notre étude malgré les conditions utilisées. Cette observation infirme un rôle majeur de la force ionique dans la variabilité de la protéolyse *post mortem*. En revanche nous avons montré *in vitro* une activation de la µcalpaïne bovine par du magnésium en présence de concentrations subactrivatrices en calcium. Cette synergie a été obtenue pour des teneurs en magnésium équivalentes aux teneurs en magnésium libre observées dans le muscle (0,5 à 3,5 mmol/kg de MF).

Le temps de stockage induit une libération de composés azotés de faible poids moléculaire. Cette libération n'entraîne une augmentation significative des concentrations de ces composés qu'après un temps de latence. Il semblerait que des peptides soient produits, coupés une première fois pour donner une majorité de peptides dont la taille est comprise entre 3,4 et 2,4 kDa puis à nouveau remaniés pour produire des petits peptides (inférieurs à 1,9 kDa), voire des acides aminés libres. L'effet du pH pour un muscle donné est cohérent avec l'effet du pH sur l'activité des protéases relevé dans la bibliographie. Il semble que les exopeptidases ne soient pas les seules à intervenir dans le remaniement des peptides. Des endopeptidases dont le site de coupure ne requiert pas une conformation particulière peuvent fort bien couper des peptides de 100 à 30 AA (12 à 4 kDa). L'inhibition de type compétitif entre isolat peptidique et calpaïnes pour la dégradation d'un substrat synthétique et la dégradation des peptides par la

µcalpaïne tend à valider cette possibilité. Les composés aminés de faible poids moléculaire apparaissent alors non seulement comme une source de composés aromatiques lors de la cuisson mais aussi comme une part non négligeable des facteurs modulant l'activité enzymatique protéolytique *post mortem*. Si les calpaïnes sont toujours actives à des temps *post mortem* élevés, notamment la mcalpaïne, il est en effet difficile d'expliquer le plateau d'attendrissage. Ce plateau ne correspond pas à une dégradation complète des structures myofibrillaires potentiellement dégradables par les protéases (les électrophorèses montrent toujours des bandes de protéines myofibrillaires, substrat non limitant), c'est donc l'activité protéasique qui est ralentie. Le pH ne peut être la source de cette variation dans l'activité enzymatique car il évolue peu et sa faible remontée est plutôt favorable à l'activité de la calpaïne. Les peptides de faible PM qui augmentent au fur et à mesure que cette activité décroît pourraient être une source d'inactivation des calpaïnes vis à vis des protéines que leur taille et leur structure rendent beaucoup moins accessibles que les peptides. Ces résultats nous amènent à envisager une hypothèse explicative de l'inactivation des calpaïnes en plus de leur autolyse correspondante au ralentissement de l'attendrissage *post mortem*.

Les calpaïnes quittent leur emplacement initial proche des stries Z (Beckerle *et al.*, 1987) et diffusent dans l'ensemble des sarcomères au cours du stockage (Taylor *et al.*, 1995). La mcalpaïne non autolysée est présente dans le muscle même après 10 jours *post mortem* (Whipple *et al.*, 1990 ; Dransfield, 1993) à un niveau proche de 70% de son activité initiale. La concentration de calcium requise pour une activation est inférieure à celle requise pour une autolyse (Goll *et al.*, 1995). Cette concentration est comprise entre 50 et 800 µM. Or dans la viande *post mortem* des concentrations de l'ordre de 100 µM ont déjà été mesurées (Jeacoke, 1993). L'activation est donc possible, d'autant plus que Penny (1980) a suggéré un seuil d'activation éventuellement plus bas à cause de la présence de magnésium libre dont ce travail a montré une concentration de 3,5 mmol/kg MF en *post rigor*, et un effet synergique de celui du calcium pour l'activation de la µcalpaïne. Le seul argument à l'encontre d'une activité de la mcalpaïne est l'abaissement du pH auquel elle est plus sensible que la µcalpaïne dont l'activité est déjà réduite de 80% lorsque le pH décroît de 7 à 5,5 (Dransfield, 1993). Cependant ce faible pH qui inhibe la liaison calpaïne-calpastatine (Dransfield, 1993) et le faible niveau de calpastatine (qui à 24 h ne représente plus que 30% de son activité initiale) réduit la possibilité d'une inhibition de la mcalpaïne par la calpastatine. La mcalpaïne est donc susceptible d'agir même à des temps de maturation supérieurs à 6 jours *post mortem*. Cependant son activité protéolytique est évaluée quasiment à zéro à partir d'un argument principal : l'absence d'attendrissage notable pendant cette période (Dransfield, 1993, 1994). C'est la modélisation de la part de la mcalpaïne dans

l'attendrissage qui conduit à négliger son activité protéolytique. Alors que l'enzyme est présente, potentiellement active et en présence de ses substrats, le fait que ceux-ci ne soient pas dégradés est paradoxal.

Parallèlement à ces arguments centrés sur les calpaïnes nous avons constaté une augmentation du nombre de peptides (de PM inférieur à 12 kDa), dont la taille moyenne diminue. Nous avons observé une réduction de l'activité de la calpaïne sur un substrat synthétique en présence de peptides extraits de viande maturée. Ces peptides diffusent plus facilement dans l'enchevêtrement protéique de la viande que les protéines et sont certainement plus aptes à rencontre le site actif des protéases que les protéines qui jouent un rôle structural. Nous avons vérifié qu'ils sont bien des substrats pour les calpaïnes (y compris pour la µcalpaïne).

La somme de ces informations nous conduit à l'hypothèse suivante : la mcalpaïne a bien une activité protéolytique après disparition de la µcalpaïne mais celle-ci est dévolue à l'hydrolyse des peptides relâchés par une activité protéolytique antérieure (due aux calpaïnes ou aux autres protéases présentes dans la viande). Elle ne dégrade plus les protéines myofibrillaires, son activité est donc sans conséquences sur la dureté de la viande ce qui a conduit à la négliger. L'observation de la fragmentation successive des peptides dans le muscle qui conditionne cette hypothèse reste cependant à vérifier. L'injection en *pre-rigor* de peptides marqués dans la viande permettrait de suivre leur dégradation et les conséquences sur l'activité des calpaïnes et l'évolution de la tendreté.

Les deux méthodes de dosage de l'hydroxyproline utilisées (chromatographie et colorimétrie) ont permis de montrer la présence d'hydroxyproline libre dans le muscle. La teneur en hydroxyproline augmente significativement après 10 jours *post mortem*. Elle atteint 1,4 à 8% de l'hydroxyproline totale chez le bovin suivant le muscle et environ 4,6 % chez le chevreau dans le Long dorsal. L'étude de l'évolution des PM de la fraction peptidique a suggéré une dégradation des protéines par étapes. L'augmentation de l'hydroxyproline libre après 10 jours signifie une coupure antérieure des molécules de collagène. Cette antériorité dans l'attaque du collagène rapproche sa dégradation de la période de forte chute de dureté. De simples coupures à des points stratégiques (costamères, jonction endo-périmysium) pourraient engendrer un affaiblissement structural sans pour autant libérer immédiatement de nombreux fragments protéiques.

Il serait intéressant d'étudier à quel moment apparaissent dans la fraction peptidique des fragments contenant de l'hydroxyproline ou des protéoglycans attestant de la dégradation du collagène et se situant en amont de l'apparition d'hydroxyproline libre dans le sarcoplasme. L'étude de l'activité des métalloprotéinases serait également à envisager notamment pour essayer

d'expliquer l'effet muscle sur la libération d'hydroxyproline. L'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs de ces enzymes pourrait permettre de vérifier si elles jouent effectivement un rôle dans l'évolution de la tendreté.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALARCON-ROJO A.D., DRANSFIELD E., 1996. Alteration of post mor in beef by the addition of enzymes inhibitors and activators. Meat Sc 178.

ALVAREZ-LEEFMANS F.J., GAMINO S.M., GIRALDEZ F., G SERRATOS H., 1986. Intracellular free magnesium in frog skel fibers measured with ion-selective micro-electrodes. J. Physiol., 378 :

ARAKAWA T., TIMASHEFF S.N., 1982. Preferential interactions of p salts in concentrated solutions. Biochem., 21 : 6542-6552.

BAILEY A.J. , LIGHT N.D.,1989. Connective tissue in meat and mea Elsevier Applied Sci., 355 p.

BALTES W., 1990. Roast aroma formation. The role of amino acids during reaction. In The Maillard reaction in food processing, human n physiology., 43-62. Ed. Finot P.A., Aeschbacher H.U., Hurrel R.F., Birkhaüser Verlag, Basel.

BARACOS V.E., BRUN-BELLUT J., MARIE M., 1991. Tissue protein lactating and dry goats. Brit. J. Nutr., 66 : 451-465.

BECKERLE M.C., BURRIDGE K., DeMARTINO G.N., CROALL Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substr of cell adhesion. Cell, 51 : 569-577.

BEDINGHAUS A.J., OCKERMAN H.W., 1995. Antioxidative Mailla products from reducing sugars and free amino acids in cooked patties. J. Fd. Sci., 60 : 992-995.

BEITNER R., HABERMAN S., CYCOWITZ T., 1977. The effect of cyc phosphofructokinase from rat tissues. Biochim. Biophys. Acta, 482 : 3

BENDALL J.R., LAWRIE R.A., 1962. The effect of pretreatment with vario post mortem glycolysis and the onset of rigor mortis in rabbit skeletal Comp. Path., 72 : 118-125.

BENDALL J.R., 1979. Relations between muscle pH and important parameters during the *postmortem* changes in mammalian cells. M 143-157.

BERGMAN I., LOXLEY R., 1963. Two improved and simplified meth spectrophotometric determination of hydroxyproline. Annal. Chem. 1965.

BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P., LACROIX, J.C., 1987. physiologie cellulaires I-membrane plasmique. Hermann, Paris, p. 44

BLANCHARD P.J., MANTLE D., 1996. Comparison of proteolytic enzyme levels in chicken, pig, lamb and rabbit muscle at point of slaughter : role in meat tenderisation *post mortem*. J. Sci. Food Agric., 71, 83-91.

BOND J., BUTLER P.E, 1987. Intracellular Proteases. Ann. Rev. Bioch. 56 :333-364.

BONNET M., KOPP J., 1986. Préparation des échantillons pour le dosage et la caractérisation qualitative du collagène musculaire. Cah. Techn. I.N.R.A., 28, 43-58.

BONNET M., OUALI A., KOPP J., 1992. Beef muscle osmotic pressure as assessed by differential scanning calorimetry (DSC). Int. J. Food Sci. Tech., 27 : 399-408.

BRUAS F., BRUN-BELLUT J., 1996. Changes affecting the the *Longissimus dorsi, Triceps brachii caput longum* and *Rectus femoris* muscles of young Friesan bulls during meat during. Meat Sci., 43, sous presse.

BURRIDGE K., FATH K., KELLY T., NUCKOLLS G., TURNER C., 1988. Focal adhesions : Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. Ann. Rev. Cell. Biol., 4 : 487-525.

CABANES-ROIRON A., OUHAYOUN J., GILBERT S., 1994. Qualité de la viande de lapin. Influence de trois modes de conservation sur l'évolution des propriétés microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles. Viandes Prod. Carnés, 15 : 175-178.

CENA P., JAIME I., BELTRAN J.A., RONCALES P., 1992. Electrophoretic and immunological assessment of degradation of large muscle proteins of lamb by effect of calpains I and II and post mortem aging. 38 th ICoMST, Clermont-Ferrand, France, 341-344.

CHAMBERS J.J., REVILLE W.J., ZEECE M.G., 1994. Lysosomal integrity in *post mortem* bovine skeletal muscle. Sci. Alim., 14 : 441-457.

CHEAH A.M., CHEAH K.S., LAHUCKY R., KOVAC L., KRAMER H.L., McPHEE C.P., 1994. Identification of halothane genotypes by calcium accumulation and their meat quality using live pigs. Meat Sci.,38 : 375-384.

CHRYSTALL B.B., DEVINE C.E., 1985. Electrical stimulation. In Advances in meat research Vol. 1. A.M. Pearson, T.R. Dutson ed., AVI Publishing Co., Wesport, CT, p.73.

CLAEYS E., UYTTERHAEGEN L., BUTS B., DEMEYER D., 1995. Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. Meat Sci., 39 : 177-193.

CONWAY E.J., 1957. Nature and significiance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle. Physiological reviews, 37 : 84-132.

COTTIN P., POUSSARD S., DESMAZES J.P., GEORGESCAULD D., DUCASTAING A., 1991. Free calcium and calpain I activity. Bioch. Bioph. Acta, 1079 : 139-145.

CROSS H.R., STANFIELD M.S., KOCH E.J., 1976. Beef palability as affected by cooking rate and final internal temperature. J. Anim. Sci., 43, 114-122.

DAVEY C.L., GILBERT K.V., 1968. Studies in meat tenderness 4. Changes in the extractability of myofibrillar proteins during meat aging. J. Food Sci., 33 : 2.

DAVEY C.L., GILBERT K.V., 1975. Cooking shortening and the toughness of beef. J. Food Technol., 10 : 333.

DeMARTINO G.N., BLUMENTHAL D.K., 1982. Identification and partial purification of a factor that stimulates calcium-dependent proteases. Biochemistry, 21 : 4297-4303.

DE ROOS K.B., 1992. Meat flavor generation from cysteine and sugars. In Flavor Precursors. American Chemical Society. New-York. Ed. Teranishi R., Takeoka G.R., Güntert M., 202-214.

DEVINE C.E., GRAAFHUIS A.E., 1995. The basal toughness of unaged lamb. Meat Sci., 39 : 285-291.

DEVINE C.E., GRAAFHUIS A.E., MUIR P.D., CHRYSTALL B.B., 1993. The effect of growth rate and ultimate pH on meat quality of lambs. Meat Sci., 35 : 63-77.

DONALDSON S.K., BEST M., KERRICK W.G.L., 1978. Characterization of the effects of Mg^{2+} on Ca^{2+} and Sr^{2+}-activated tension generation of skinned rat cardiac fibres. J. Gen. Physiol., 71 : 645-655.

DOORNENBAL H., MURRAY A.C., 1981. Effects of age, breed, sex and muscle on certain mineral concentrations in cattle. J. Food Sci., 47 : 55-58.

DRANSFIELD E., 1992. Modelling *post-mortem* tenderisation I : Role of calpain I in conditioning. Meat Sci., 31 : 85-94.

DRANSFIELD E., 1993. Modelling *post-mortem* tenderisation IV. Role of calpain and calpastatin in conditioning. Meat Sci., 34 : 217-234.

DRANSFIELD E., 1994. Modelling post-mortem tenderisation-V : inactivation of calpains. Meat Sci., 37 : 391-409.

DRANSFIELD E., 1996. Calpains from thaw rigor muscle. Meat Sci., sous presse.

DRANSFIELD E., JONES R.C.D., 1981. Relationship between tenderness of three beef muscles. J. Sci. Food Agic., 32 : 300-304.

DRANSFIELD E., LACOURT A., LACOURT P., 1995a. Fibre fracture of bovine M. pectoralis profundus muscle cooked pre- and post-rigor. J. Food Texture Studies, 26 : 71-87.

DRANSFIELD E., BRÜGGEMANN D., ASTRUC T., LACOURT A., 1995b. Structural weakening of muscle post-mortem. 2nd Dummerstorf Muscle-Worshop "Muscle growth and quality", Rostock, Germany.

DUMONT B.L., HUDZIK E., 1990. Teneur en minéraux (Ca, Cu, Fe, Na, P et Zn) de la viande de taurillons. Viandes Prod. Carnés, 11 : 304-305.

DUBUISSON M., 1950. Proc. Symp. Muscle, Royaumont, France. p 8. Quoted in Bendall, J.R., 1954. The swelling effect of polyphosphates on lean meat. J. Sci. Food Agric. , 5 : 468.

DUTSON T.R., LAWRIE R.A., 1974. Release of lysosomal enzymes during *post mortem* conditioning and their relationship to tenderness. J. Food Technol., 9 : 43-50.

EGGEN K.H., EKHOLDT W.E., 1995. Degradation of decorin in bovine *M. Semimembranosus* during *post mortem* storage. 41 th ICOMST, San Antonio, U.S.A., 662-663.

EILERS J.D., TATUM J.D., MORGAN J.B., SMITH G.C., 1996. Modification of early-postmortem muscle pH and use of post-mortem aging to improve beef tenderness. J. Anim. Sci., 74 : 790-798.

ETHERINGTON D.J., TAYLOR M.A.J., DRANSFIELD E., 1987. Conditioning of meat from different species. Relationship between tenderising and the levels of cathepsin B, cathepsin L, calpain I, calpain II and α-glucoronidase. Meat Sci.,20 : 1.

FAGAN J.M., WAXMAN L., GOLDBERG A.L., 1987. Skeletal muscle and liver contain a soluble ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system. Bioch. J., 243 : 335-343.

FAROUK M.M., PRICE J.F., 1994. The effect of post exsanguination infusion on the composition, exsudation, color and *post mortem* metabolic changes in lamb. Meat Sci., 38 : 477-496.

FAUCHON C., SEOANE J.R., BERNIER J.F., 1995. Effects of dietary cation-anion concentrations on performance and acid-base balance in growing lambs. Can. J. Anim. Sci., 145-151.

FLORES M., ALASNIER C., ARISTOY M.C., NAVARRO J.L., GANDEMER G., TOLDRA F., 1996. Activity of aminopeptidase and lipolytic enzymes in five skeletal muscles with various oxidative patterns. J. Sci. Food Agric., 70 : 127-130.

FOLCH J., LESS M., SLOANE STANLEY G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509.

FRITZ J.D., GREASER M.L., 1991. Changes in titin and nebulin in post mortem bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. J. Food Sci., 56 : 607-610.

FRITZ J.D., MITCHELL M.C., MARSH B.B., GREASER M.L., 1993. Titin content of beef in relation to tenderness. Meat Sci., 33 : 41-50.

GANN G.L., MERKEL R.A., 1978. Ultrastructural changes in bovine *longissimus dorsi* muscle during *post mortem* ageing. Meat Sci., 2 : 129.

GARIEPY C., DELAQUIS P.J., AALHUS J.L., ROBERTSON M., LEBLANC C., RODRIGUE N., 1995. Functionality of high and low voltage electrically stimulated beef chilled under moderate and rapid chilling regimes. Meat Sci., 39 : 301-310.

GAULT N.F.S., 1991. Marinaded meat. *In* development in meat science. Ed. R. Lawrie, Elsevier, p. 191-246.

GEESINK G.H., OUALI A., TASSY C., SMULDERS F.J.M., 1992. Tenderization, calpain/calpastatin activities and osmolality of six different beef muscles. 38 th ICoMST, Clermont-Ferrand. France, 363-365.

GERARD K.W., HIPKISS A.R., SCHNEIDER D.L., 1988. Degradation of intracellular protein in muscle. J. Biol. Chem., 263 : 18886-18890.

GOLL D.E., OTSUKA Y., NAGAINIS P.A., SHANNON J.D., SATHE S.K., MUGURUMA M., 1983. Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. J. Food Bioch., 7 :137-142.

GOLL D.E., KLEESE W.C., SZPACENKO A., 1989. Skeletal muscle protease and protein turnover. In Animal Growth Regulation, D.R. CAMPION, G.J. HAUSMAN and R.D. MARTIN (ED.). Plenum Publishing, New-York : 141-182.

GOLL D.E., THOMPSON V.F., TAYLOR R.G., EDMUNDS T., CONG J., 1995. Properties and biological regulation of the calpain system. *In* expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality. Eds. A. OUALI, D.I. DEMEYER et SMULDERS F.J.M., ECCEAMST, Utrecht, Pays-Bas., 47-68.

GOODMAN M.N., LOWENSTEIN J.M., 1977. The purine nucleotide cycle. The Journal of biological Chemistry, 252 : 5054-5060.

GORDON S., CROCKER P.R., MORRIS L., LEE S.H., PERRY V.H., HUME D.A., 1986. Localization and function of tissue macrophages. In Biochemistry of macrophages. Pitman, London (Ciba Foundation Symposium 118), p 54-67.

GREASER M.L., FRITZ J.D., 1995. Post mortem changes in myofibrillar proteins in relation to meat texture. *In* expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality. Eds. A. OUALI, D.I. DEMEYER et SMULDERS F.J.M., ECCEAMST, Utrecht, Pays-Bas., 293-309.

GRANSTRÖM L.M., EKMAN G.E., MALMSTRÖM A., ULMSTEN U., WOESSNER J.F., 1992. Serum collagenase levels in relation to the state of the human cervix during pregnancy and labor. Am. J. Obstet. Gynecol., 167 : 1284-1288.

GUIGNOT F., TOURAILLE C., OUALI A., RENERRE M., MONIN G., 1994. Relationships between *post mortem* pH changes and some traits of sensory quality in veal. Meat Sci., 37 : 315-325.

HADDAD B., 1995. Etude technologique et génétique de la qualité de la viande de lapin. Thèse de Doctorat, Université de Gand, Belgique.

HAIECH J., DERANCOURT J., PECHERE J.F., DEMAILLE J.G., 1979. Magnesium and calcium binding to parvalbumins : evidence for differences between parvalbumins and an explanation of their relaxing function. Biochemistry, 18 : 2752-2758.

HALL J.B., HUNT M.C., 1982. Collagen solubility of A-maturity bovine Longissimus muscle as affacted by nutritional regimen. J. Anim. Sci., 55 : 321-328.

HAN D., MCMILLIN K.W., GODBER J.S., BIDNER T.D., YOUNATHAN M.T., HART L.T., 1995. Lipid stability of beef model systems with heating and iron fractions. J. Food Sci., 60 : 599-602.

HARRIS E.D., KRANE S.M., 1972. An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. Biochim. Biophys. Acta, 258 : 566-576.

HEINZE P.E., BRUGGEMANN D., 1994. Ageing of beef : influence of two ageing methods on sensory properties and myofibrillar proteins. Sci. Alim., 14 : 387-399.

HERSHKO A., CIECHANOVER A., 1992. The ubiquitin system for protein degradation. Ann. rev. Bioch., 61 : 761-807.

HERTZMAN C., OLSSON U., TORNBERG E., 1993. The influence of high temperature, type of muscle and electrical stimulation on the course of rigor ageing and tenderness of beef muscles. Meat Sci., 35 : 119-141.

HO C.T., ZHANG J., HWANG H.I., RIHA W.E., 1994. Release of ammonia from peptides and proteins and their effects on Maillard flavor generation. In Maillard reactions in chemistry, food and health. Ed. T.P. Labuza, G.A. Reineccius, V. Monnier, J. O'Brien, J. Baynes. Proc. Fifth Int. Symposium. The royal society of biochemistry, Cambridge, R-U.

HUFF-LONERGAN E., MITSUHASHI T., PARRISH F.C., Jr, ROBSON R.M., 1996. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting comparisons of purified myofibrils and whole muscle preparations for evaluating titin and nebulin in post mortem bovine muscle. J. Anim. Sci., 74 : 779-785.

HUFF E.J., PARRISH F.C., ROBSON R.M., 1992. Changes in myofibrillar/cytoskeletal proteins of bovine longissimus muscles differing in tenderness ICoMST, Clermont-Ferrand, France, 371-374.

HUSEK P., 1991. Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. J. Chromatography, 552 : 289-299.

HWAN S.F., BANDMAN E., 1989. Studies of desmin and α-actinin degradation in bovine *semitendinosus* muscle. J. Food Sci., 54 : 1426-1430.

JAIME I., BELTRAN J.A., CENA P., LOPEZ-LORENZO P., RONCALES P., 1992. Tenderisation of lamb meat : effect of rapid postmortem temperature drop on muscle conditioning and aging. Meat Sci., 32 : 357-366.

JEACOKE R.E., 1993. The concentration of free magnesium and free calcium ions both increase in skeletal muscle fibres entering *rigor mortis*. Meat Sci., 35 : 27-45.

JOHNSON P., HAMMER J.L., 1989. Effects of L-1 methyl-histidine and the muscle dipeptides carnosine and anserine on the activities of muscle calpains. Comp. Bioch. Physiol., 94B : 45-48.

JUDGE M.D., ABERLE E.D., 1982. Effects of chronological age and post-mortem ageing on thermal shrinkage temperature of bovine intramuscular collagen. J. Anim. Sci., 54 : 68-71.

KASTNER C.L., SCHWENKE J.R., KENNEY P.B., KENDALL J.A., MILLIKEN G.A., 1993. Comparisons of the effect of electrical stimulation methods on *post mortem* pH decline in beef muscle. Meat Sci., 35 : 183-190.

KAY J., HEARTH R., DAHLMANN B., KUEHN L., STAUBER W.T., 1985. Serine proteinases and protein breakdown in muscle. *In* intracellular protein catabolism, (K.A. KHAIRALLAH, J.S. BOND, J.W.C. BIRD, Eds). pp195. Alan R. LISS, New-York.

KAUFFMAN R.G., SYBESMA W., SMULDERS F.J.M., EIKELENBOOM G., ENGEL B., VAN LACK R.L.J.M., HORING-BOLINK A.H., STERRENBURG P., NORDHEIM E.V., WALSTRA P., VAN DER VAL P.G., 1993. The effectiveness of examining early post mortem musculature to predict ultimate pork quality. Meat Sci., 35 : 183-190.

KEMP R.G., FOE L.G., 1983. Allosteric regulatory properties of muscle phosphofructokinase. Mol. Cell. Bioch., 57 : 147-154.

KENDALL T.L., KOOHMARAIE M., ARBONA J.R., WILLIAMS S.E., YOUNG L.L., 1993. Effect of pH and ionic strength on bovine m-calpain and calpastatin activity. J. Anim. Sci., 71 : 96-104.

KERTH C.R., MILLER M.F., RAMSEY C.B., 1995. Improvement of beef tenderness and quality traits with calcium chloride injection in beef loins 48 hours *post mortem*. J. Anim. Sci., 73 : 750-756.

KING N.L., 1987. Thermal transition of collagen in ovine connective tissues. Meat sci., 20 : 25-37.

KOEHLER P.E., MASON M.E., NEWELL J.A., 1969. Formation of pyrazines compounds in sugar amino acid model systems. J. Agric. Food Chem., 17 : 393-396.

KOOHMARAIE M., 1988.The role of endogenous proteases in meat tenderness. Recip. Meat Conf. proc., 41 : 89.

KOOHMARAIE M., 1990. Inhibition of postmortem tenderization in ovine carcasses trough infusion of zinc. J. Anim. Sci., 68 : 1476-1483.

KOOHMARAIE M., 1992a. Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μcalpain. J. Anim. Sci., 70 : 3071-3080.

KOOHMARAIE M., 1992b. Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (Proteasome) : purification, characterization and comparison of its effects on myofibrils with μcalpains. J. Anim. Sci., 70 : 3697-3708.

KOOHMARAIE M., CROUSE J.D., MERSMANN H.J., 1989. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through infusion of calcium chloride: effect of concentration and ionic strength. J. Anim. Sci., 67 : 934-942.

KOOHMARAIE M.,WHIPPLE G., KRETCHMAR D.H., CROUSE J.D., MERSMANN H.J., 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. J. Anim. sci., 69 : 617-624.

KOTULA A.W., LUSBY W.R., 1982. Mineral composition of muscles of 1 to 6 years old steers. J. Anim. Sci., 54 : 544-548.

LAHUCKY R., MADAJOVA V., MHARAPARA O., MARAK J., KANIANSKY D., POLTARSKY J., KOVAC L., 1995. A comparison of some metabolites in skeletal muscle of different halothane sensitivity with meat quality traits of pigs using capillary isotachophoresis technique. Meat Sci., 39 : 403-414.

LEWIS G.L., PURSLOW P.P., RICE A.E., 1991. The effect of conditioning on the strength of perimysial connective tissue dissected from cooked meat. Meat sci., 30 : 1-12.

LIGHT N., CHAMPION A.E., VOYLE C., BAILEY A.J., 1985. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. Meat sci., 13 : 137-149.

LOWENSTEIN J.M., 1972. Ammonia production in muscle and other tissues : the purine nucleotide cycle. Physiol. Rev., 52 : 382-414.

LUSBY M.L., RIBPATH J.F., PARRISH F.C., JR., ROBSON R.M., 1983. Effect of *post mortem* storage on degradation of the myofibrillar protein titin in bovine *longissimus dorsi*. J. Food Sci., 48 : 1787-1795.

MADRUGA M.S., MOTTRAM D.S., 1995. The effect of pH on the formation of Maillard derived aroma volatiles using a cooked meat system. J. Sci. Food Agric., 68 : 305-310.

MARSH B.B., RINGKOB T.P., RUSSEL R.L., SWARTZ D.A., PAGEL L.A., 1987. Effect of early *post mortem* glycolytic rate on beef tenderness. Meat Sci., 21 : 241-248.

MARSH B.B., RINGKOB T.P., RUSSEL R.L., SWARTZ D.A., PAGEL L.A., 1988. Mechanismns and strategies from improving meat tenderness. Recip. Meat Conf. Proc., 41 : 113.

MELLONI E., PONTREMOLI S., 1991. The calpain-calpastatin system : structural and functional properties. J. Nutr. Bioch., 2 : 467-476.

MERDACI M., COTTIN P., OUALI A., VALIN C., DUCASTAING A., 1983. Comparative effects of two calcium-activated neutral proteinases on ATPase activities in rabbit skeletal muscle. Sci. des Aliments, 3 : 499-512.

MIKAMI M., WHITING A.H., TAYLOR M.A.J., MACIEWICZ R.A., ETHERINGTON D.J., 1987. Degradation of myofibrils from rabbit chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates. Meat Sci., 21 : 81-97.

MIKAMI M., YAMADA Y., WAKAHARA Y., MIURA H., 1991. Effects of electrical stimulation on the sarcoplasmic proteins, peptide and amino acvid contents of beef. Anim. Sci. Technol. (Jpn.), 62 : 519-528.

MILLS E., SMITH S.H., JUDGE M.D., 1989. Early post-mortem degradation of intramuscular collagen. Meat Sci., 26 : 115-120.

MILLS E., SMITH S.H., FORREST J.C., ALBERT E.P., JUDGE M.D., 1989. Effects of early post-mortem ageing on intramuscular collagen stability, yield and composition. Meat Sci., 26 : 133-141.

MIRI A., FOUCAT L., RENOU J.P., RODET L., TALMANT A., MONIN G., 1991. Use of perfused isolated muscle, as studied by ^{31}PNMR, to investigate metabolism and *post mortem* changes. Meat Sci., 30 : 327-336.

MOELLER P.W., FIELDS P.A., DUTSON T.R., LANDMANN W.A., CARPENTIER Z.L., 1976. Effect of high temperature conditioning on subcellular distribution and levels of lysosomal enzymes. J. Food Sci., 41 : 216-217.

MOESGAARD B., QUISTORFF B., CHRISTENSEN V.G., THERKELSEN I., ORGENSEN P.F., 1995. Differences of *post mortem* turnover in skeletal muscle of normal and heterozygote malignant hyperthermia pigs : comparison of 31P-NMR and analytical biochemical measurements. Meat Sci., 39 : 43-57.

MONIN G., 1988. Stress d'abattage et qualité de la viande. Rec. Méd. Vét., 164 : 835-842.

MORGAN J.B., WHEELER T.L., KOOHMARAIE M., CROUSE J.D., SAVELL J.W., 1993. Effect of castration on myofibrillar protein turnover endogenous proteinase activities and muscle growth in bovine skeletal muscle. J. Anim. Sci., 71 : 408-414.

NEGISHI H., YAMAMOTO E., KUWATA T., 1996. The origin of the 30 kDa component appearing during post-mortem ageing of bovine muscle. Meat Sci., 42 : 289-304.

NISHIMURA T., RHUE M.R., OKITANI A., 1988. Components contributing to the improvement of meat taste during storage. Agric. Biol. Chem., 52 : 2323-23330.

NISHIMURA T., HATTORI A., TAKAHASHI K., 1995. Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditionning of beef. Meat Sci., 39 : 127-133.

NISHIMURA T., HATTORI A., TAKAHASHI K., 1996. Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during post-mortem ageing of beef.Meat Sci., 42 : 251-260.

OFFER G., KNIGHT P., 1988. The structural basis of water holding in Meat. *In* Developments in Meat Science-4. R. Lawrie Ed., Elsevier, Londres, pp. 63-243.

OLSON D.G., PARRISH F.C., Jr, 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., PARRISH F.C., DAYTON W.R., GOLL D.E., 1977. Effect of postmortem storage and calcium activated factor on the myofibrillar proteins of bovine skeletal muscle. J. Food Sci., 42 : 117-124.

OLSSON U., HERTZMAN C., TORNBERG E., 1994. The influence of low temperature, type of muscle and electrical stimulation on the course of rigor mortis, ageing and tenderness of beef muscles. Meat Sci., 37 : 115-131.

OUALI A., 1990. Meat tenderization : possible causes and mechanisms. A review. J. Muscle Foods, 1 : 129-165.

OUALI A., DUFOUR E., OBLED A., DEVAL C., VALIN C., 1988. Action des protéinases musculaires sur les myosines rapide et lente. Relation avec la protéolyse *post mortem* dans les muscles de type contractile variable. Reprod. Nutr. Develop., 28 : 839-844.

OUALI A., TALMANT A., 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. Meat Sci., 28 : 331-348.

OUALI A., 1991. La maturation des viandes : facteurs biologiques et technologiques de variation. Viandes Prod. Carnés, 11 : 281-290.

OUHAYOUN J., 1992. Quels sont les facteurs qui influencent la qualité de la viande de lapin? Cuniculture, 106 : 171-175.

PARK Y. W., 1990. Effect of breed, sex and tissues on concentrations of macrominerals in goat meat. J. Food Sci., 55 : 308-311.

PARRISH F.C., J.R., GOLL D.E., NEWCOMB W.J., DE LUMEN B.O., CHAUDRY H.M., KLINE E.A., 1969. Molecular properties of post mortem muscle 7. Changes in nonprotein nitrogen and free amino-acids of bovine meat. J. Food Sci., 70 : 3071-3080.

PATUREAU-MIRAND P., HOULIER M.L., PRUGNAUD J., DALLE M., GRIZARD J., 1990. Métabolisme protéique de l'agneau nouveau-né IV. Conséquences de l'ingestion d'acides aminés et de lactose. Reprod. Nut. Dev., 30 : 203-214.

PEARSON A.M., YOUNG R.B., 1989. Muscle and meat biochemistry. Academic Press, San Diego. 457p.

PENNY I.F., 1970. Conditioning of bovine muscle. II. Changes in the composition of extracts of myofibrils after conditioning. J. Food Sci., 21 : 303.

PENNY I.F., 1980. The enzymology of conditioning. In Developments in Meat Science, Vol 1, (R. LAWRIE, ed). Applied Science Publishers, London, pp.115.

PENNY I.F., DRANSFIELD E., 1979. Relationship between toughness and troponin T in conditioned beef. Meat Sci., 3 : 135-141.

PENNY I.F., FERGUSON-PRYCE R., 1979. Measurement of autolysis in beef muscle homogenates. Meat Sci., 3 : 121-126.

PERRIER G., OUHAYOUN J., 1993. Utilisation du mâle ZIKA en croisement terminal avec des femelles hybrides. Cuniculture, 112 : 179-184.

PIKE M.M., RINGKOB T.P., BEEKMAN D.D., KOH Y.O., GERTHOFFER W.T., 1993. Quadratic relationship between early post mortem glycolytic rate and beef tenderness. Meat Sci., 34 : 13-26.

PRINGLE T.D., CALKINS C.R., KOOHMARAIE M., JONES S.J., 1993. Effects over time of feeding a β-adrenergic agonist to wether lambs on animal performance, muscle growth, endogenous muscle proteinase activities, and meat tenderness. J. Anim. Sci., 1993, 71 : 636-644.

PURCHAS R.W., AUNGSUPARON R., 1993. Further investigations into the relationship between ultimate ph and tenderness for beef samples from bulls and steers. Meat Sci., 34 : 163-178.

RAO M.V., GAULT N.F.S., 1989. The influence of fibre type composition and associated biochemical characteristics on the acid buffering capacities of several beef muscles. Meat Sci., 26 : 5-18.

RENOU P., CANIONI P., GATELIER P., VALIN C., COZZONE P.J., 1986. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of *post mortem* catabolism and intracellular pH in intact excised rabbit muscle. Biochimie, 68 : 543-554.

RIVETT A.J., 1989. The multicatalytic proteinase of mammalian cells. Arch. Bioch. Biophys., 268 : 1-8.

ROSSI V., DENOYER C., BERDAGUE J.L., 1995. Composés volatiles désorbés après conservation à l'air de la viande de boeuf cuite. Sci. Alim., 15 : 381-392.

ROULET A., BURGAT J.M., CARDINAUD R., 1993. The proteolytic susceptibility of specific sites in myosin light chains is modulated by the filament conformation. Eur. J. Biochem., 216 : 89-101.

SCHLABACH T.D., ABBOTT S.R., 1980. Serum protein profiles by "High Performance" Liquid Chromatography with detection at multiple wavelengths. Clin. Chem., 26 : 1504-1508.

SCHMITT T.L., PETTE D., 1991. Fiber type-specific distribution of parvalbumins in rabbit skeletal muscle. Histochem. 96 : 459-465.

SCOPES R.K., 1987. Protein purification principles and practice second edition. Springer Verlag ed., New-York. 329p.

SHACKELFORD S.D., KOOHMARAIE M., SAVELL J.W., 1994. Evaluation of *longissimus dorsi* muscle pH at 3 hours *post mortem* as a predictor of beef tenderness. Meat Sci., 37 : 195-204.

SOLS A., 1981. Multimodulation of enzyme activity. Current Topics in Cellular Regulation, 19 : 77-101.

SPANIER A.M., Mc MILLIN K.W., MILLER J.A., 1990. Enzyme activity levels in beef : effect of *post mortem* aging and end-point cooking temperature. J. Food Sci., 55 : 318-322.

STANTON C., LIGHT N., 1987. The effects of conditioning on meat collagen : Part1-Evidence for gross *in situ* proteolysis. Meat Sci., 21: 249-265.

STANTON C., LIGHT N., 1988. The effects of conditioning on meat collagen : Part2-Direct biochemical evidence for proteolytic damage in insoluble perimysial collagen after conditioning. Meat Sci., 23 : 179-199.

STANTON C., LIGHT N., 1990. The effects of conditioning on meat collagen : Part3-Evidence for proteolytic damage to endomysial collagen after conditioning. Meat Sci., 27 : 41-54.

TAKAHASHI K., KIM O.H., YANO K., 1987. Calcium-induced weakening of Z-disks in *post-mortem* skeletal muscle. J. Bioch. 101 : 767-773.

TAKAHASHI K., 1992. Non enzymatic weakening of myofibrillar structures during conditioning of meat : calcium ions at 0,1 mM and their effect on meat tenderization. Biochimie, 74 : 247-250.

TAKAHASHI K., 1996. Structural weakening of skeletal muscle tissue during post mortem ageing of meat : the non enzymatic mechanism of meat tenderization. Meat Sci., 43 : S67-S80.

TALMANT A., MONIN G., BRIAND M., DADET M., BRIAND Y., 1986. Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscles. Meat Sci., 18 : 23-40.

TANABE R., NAKAI H., TAKAHASHI K., 1992. Post mortem changes in skeletal muscle connectin. 38 th ICoMST, Clermont Ferrand, France. 3 : 427-429.

TAYLOR M.A.J., ETHERINGTON D.J., 1991. The solubilization of myofibrillar proteins by calcium ions. Meat Sci., 29 : 211-219.

TAYLOR R.G., OUALI A., GOLL D.E., 1995. Enzyme localization during post mortem muscle tenderization. *In* expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality. Eds. A. OUALI, D.I. DEMEYER et SMULDERS F.J.M., ECCEAMST, Utrecht, Pays-Bas., pp. 347-358.

TOLDRA F. ARISTOY M.C., PARTC., CERVERO C., RICO E., MOTILVA M.J., FLORES J., 1992. Muscle and adipose tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. J. Food Sci., 57 : 813-816.

TREMOLIERES J., 1969. *In* Biologie Générale. Tome 3. Physiologie du milieu intérieur et des organes. Chap XXII Le sang. Dunod éd., Paris, 329-350.

TREVOR J.S., BAILEY A.J., 1981. *In* Developments in Meat science-2 (R. Lawrie, ed.). Applied Science Publishers ltd, London, p. 29.

TURNER C.E., BURRIDGE K., 1991. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. Current Opinion Cell. Biol., 3 : 849-853.

UYTTERHAEGEN L., CLAEYS E., DEMEYER D., 1992. The effect of electrical stimulation on beef tenderness, protease activity and myofibrillar protein fragmentation. Biochimie, 74 : 275-81.

UYTTERHAEGEN L., CLAEYS E., DEMEYER D., 1994. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. J. Anim. Sci., 72 : 1209-1223.

VALIN C., 1970. Activation des enzymes lysosomales du muscle au cours de la maturation de la viande. Ann. Biol. Anim., 10 : 313-316.

VALIN C., PALANSKA O., GOUTEFONGEA R., 1975. Etude de la qualité des viandes de bovin I. Etude biochimique de la maturation des viandes de taurillon. Ann. Technol. Agric., 24 : 47-64.

VALIN C., 1985. Les protéases des viandes. *In* Hydrolases et dépolymérases. Ed. Mouranche A., Costes C., Bordas, Paris. pp. 279-311.

VIGNON X., 1990. Le métabolisme énergétique peri mortem. Viandes Prod. Carnés, 11 : 266-272.

WATANABE A., DALY C.C., DEVINE C.E., 1996. The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing. Meat Sci., 42 : 67-78.

WATANABE A., DEVINE C.E., 1996. Effect of meat ultimate pH on rate of titin and nebulin degradation. Meat Sci., 42 : 407-413.

WEIL J.H., 1987. Biochimie générale. 5e édition. Masson éd., Paris. 508p.

WERB Z., 1994. *In* proteolysis and protein turnover, Portland Press, London. p. 177-182.

WHIPPLE G., KOOHMARAIE M., DIKEMAN M.E., CROUSE J.D., HUNT M.C., KLEMM R.D., 1990. Evaluation of attributes that affect *Longissimus dorsi* tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. J. Anim. Sci., 68 : 2716-2728.

WHIPPLE G., KOOHMARAIE M., 1991. Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. J. Anim. Sci., 69 : 4449-4460.

WHIPPLE G., KOOHMARAIE M., 1992. Effects of lamb age, muscle type and 24-hour activity of endogenous proteinases on *post-mortem* proteolysis. J. Anim. Sci., 70 : 798-804.

WINGER R.J., POPE C.G., 1980-81. Osmotic properties of *post-rigor* beef muscle. Meat Sci., 5 : 355-369.

WOESSNER J.F., 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. The FASEB J., 2145-2154.

WU F.Y., DUTSON T.R., VALIN C., CROSS H.R., SMITH S.B., 1985. Aging index, lysosomal enzymes activities and meat tenderness in muscles from electrically stimulated bull and steer carcasses. J. Food Sci., 50 : 1025.

WU J.J., KASTNER C.L., HUNT M.C., KROPF D.H., ALLEN D.M., 1981. Nutritionnal effects on beef collagen characteristics and palatability. J. Anim. Sci., 53 : 1256-1261.

WU F.Y., SMITH S.B., 1987. Ionic strength and myofibrillar protein solubilization. J. Anim. Sci., 65 : 597-608.

XIONG Y.L., ANGLEMIER A.F., 1989. Gel electrophoresis analysis of the protein changes in ground beef stored at 2 °C. J. Food Sci., 54 : 287-290.

YOUNG O.A., GRAAFHUIS A.E, DAVEY C.L., 1980-81. *Post-mortem* changes in cytoskeletal proteins of muscle. Meat Sci., 5 : 41-55.

YU L.C., ARATA T., STEVEN A.C., NAYLOR G.R.S., GAMBLE R.C., PODOLSKY R.J., 1984. Structural studies of muscle during force development in various states. In G.H. POLLACK and H. SERGI (Ed.). Contractile Mechanisms in Muscle. p 207. Planum Press, New York.

YU L.P., LEE Y.B., 1986. Effect of *post mortem* pH and temperature on bovine muscle structure and meat tenderness. J. Food Sci., 51 : 774-780.

ZAMORA F., DEBITON E., LEPETIT J., LEBERT A., DRANSFIELD E., OUALI A., 1996. Predicting variability of ageing and toughness in beef M. longissimus lumborum et thoracis. Meat Sci., sous presse.

ZEECE M.G., KATOH K., ROBSON R.M., 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., PARRISH F.C., 1986b. Effect of Ca activated protease (CAF) on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. J. Food Sci., 51 : 797-803.

ANNEXES

Annexe **A-1**

Etude de la fraction aminée

MODEL ala glu gly his ile leu pro met ser thr ohpro val = muscle jour animal muscle*jour muscle*animal jour* animal/ss3

RANDOM animal animal*muscle animal*jour/test

LSMEANS muscle jour muscle*jour/etype=3 tdiff

Annexe **A-2**

Etude de la fraction peptidique

MODEL 12-6,8 6,8-4 4-3,4 3,4-2,4 2,4-1,9 1,9-1,05 1,05-0,5 : temps muscle pH*temps animal(pH)/ss3

RANDOM muscle pH animal(pH)/test

LSMEANS muscle temps pH*temps/etype=3 tdiff

Annexe **A-3** : Paramètres de la cinétique de chute du pH dans le *Longissimus Dorsi* de lapin

Animal	Equation	pH(0,2)	pH(24)
L1	$pH=5,65+0,805.e^{-0,288.t}$	6,41	5,65
L3	$pH=5,79+0,847.e^{-0,145.t}$	6,61	5,82
L5	$pH=5,60+0,910.e^{-0,165.t}$	6,48	5,62
L7	$pH=5,82+1,024.e^{-0,226.t}$	6,80	5,82
L9	$pH=5,72+0,819.e^{-0,204.t}$	6,51	5,73
L2	$pH=5,70+1,013.e^{-0,197.t}$	6,67	5,71
L4	$pH=5,65+0,920.e^{-0,193.t}$	6,54	5,66
L6	$pH=5,80+0,947.e^{-0,199.t}$	6,71	5,81
L8	$pH=5,99+0,958.e^{-0,287.t}$	6,89	6,03
L10	$pH=5,68+1,270.e^{-0,204.t}$	6,90	6,90

Annexe **A-4** : Concentrations en acides aminés libres (µg/g de MF) par muscle et par temps de stockage

	LD				TB				RF			
AA	J3	J5	J10	J14	J3	J5	J10	J14	J3	J5	J10	J14
Ala	4,09	4,70	4,73	6,63	3,83	5,59	5,53	7,18	5,02	5,67	5,07	9,28
Gly	1,69	2,10	2,13	2,55	1,57	3,00	2,63	3,36	2,03	2,34	2,17	5,68
Val	5,10	4,21	4,34	4,82	2,66	3,17	4,04	4,42	3,06	6,33	3,72	7,19
Leu	0,50	0,67	1,15	1,73	0,45	0,83	0,96	1,52	0,49	0,87	1,01	1,70
Ile	0,31	0,31	0,68	0,68	0,26	0,46	0,59	0,83	0,32	0,49	0,59	1,34
Pro	0,58	0,53	0,66	0,71	0,61	0,66	0,74	0,87	0,52	1,05	0,70	1,42
Thr	0,18	0,24	0,30	0,58	0,16	0,58	0,26	0,41	0,18	0,26	0,28	0,53
Ser	0,36	0,31	0,49	0,85	0,16	0,39	0,59	0,44	0,14	0,19	0,24	0,57
Glu	3,68	5,55	4,04	8,83	5,18	12,9	4,64	14,8	2,32	3,09	6,25	3,79
Asn	0,20	0,21	0,23	0,40	0,23	0,19	0,22	0,17	0,23	0,26	0,4	0,29
Asp	0,25	0,32	0,26	0,36	0,29	0,32	0,21	0,35	0,35	0,45	0,31	0,39
Met	0,22	0,22	0,40	0,87	0,19	0,18	0,32	0,44	0,29	0,31	0,38	0,77
Hyp	0,16	0,23	0,30	0,62	0,18	0,23	0,26	0,31	0,20	0,28	0,28	0,43
Lys	0,23	0,20	0,29	0,77	0,14	0,19	0,27	0,32	0,17	0,17	0,12	0,70
His	0,43	0,39	0,43	1,54	0,58	0,55	0,55	0,48	0,52	0,59	0,54	0,82

Annexe **A-5** : Contrastes pour le *Longissimus dorsi*

	Jour 3/5+10		Jour 3+5/10		Jour 5+10/14	
Acide aminé	valeur F	p	valeur F	p	valeur F	p
ALA	3.17	NS	0.89	NS	29.87	***
GLY	5.82	*	1.81	NS	6.20	*
VAL	1.44	NS	0.21	NS	0.64	NS
LEU	8.77	**	16.63	***	35.13	***
ILE	21.74	***	82.75	***	20.90	***
PRO	0.06	NS	2.10	NS	2.59	NS
THR	4.85	*	4.20	NS	59.10	***
SER	0.10	NS	2.12	NS	18.38	***
GLU	2.60	NS	0.70	NS	34.24	***
ASN	0.94	NS	2.19	NS	79.00	***
ASP	2.80	NS	0.74	NS	7.07	**
MET	2.28	NS	8.91	**	89.69	***
HYP	11.93	**	11.93	**	127.44	***
LYS	0.12	NS	2.91	NS	144.77	***
HIS	0.01	NS	0.02	NS	38.59	***

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; NS, non significatif.

Annexe **A-6** : Contrastes pour le *Triceps brachii*

	Jour 3/5+10		Jour 3+5/10		Jour 5+10/14	
Acide aminé	valeur F	p	valeur F	p	valeur F	p
ALA	20.18	***	4.53	*	17.59	***
GLY	8.34	**	0.63	NS	1.58	NS
VAL	5.69	*	8.04	**	4.19	NS
LEU	18.52	***	9.15	**	36.60	***
ILE	16.44	***	12.09	**	21.02	***
PRO	1.90	NS	2.77	NS	7.28	**
THR	5.06	*	0.64	NS	8.97	**
SER	29.40	***	25.57	***	0.66	NS
GLU	4.47	*	6.70	*	12.40	**
ASN	2.15	NS	0.09	NS	2.15	NS
ASP	0.32	NS	5.14	*	5.14	*
MET	1.16	NS	7.22	*	15.14	***
HYP	5.95	*	4.89	*	5.30	*
LYS	4.66	*	5.66	*	4.54	*
HIS	0.10	NS	0.03	NS	0.59	NS

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; NS, non significatif.

Annexe **A-7** : Contrastes dans le *Rectus femoris*

	Jour 3/5+10		Jour 3+5/10		Jour 5+10/14	
Acide aminé	valeur F	p	valeur F	p	valeur F	p
ALA	0.59	NS	0.38	NS	56.26	***
GLY	0.45	NS	0.00	NS	79.67	***
VAL	14.24	**	3.45	NS	13.22	**
LEU	18.64	***	9.93	**	40.57	***
ILE	7.99	**	5.75	*	86.24	***
PRO	5.36	*	0.29	NS	9.84	**
THR	7.98	*	3.76	NS	45.09	***
SER	1.49	NS	1.39	NS	27.36	***
GLU	3.80	NS	8.67	**	0.41	NS
ASN	1.08	NS	0.11	NS	3.77	NS
ASP	0.21	NS	1.31	NS	0.03	NS
MET	1.53	NS	2.61	NS	60.37	***
HYP	2.22	NS	7.71	*	23.51	***
LYS	0.18	NS	0.68	NS	66.33	***
HIS	0.65	NS	0.05	NS	12.72	**

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; NS, non significatif.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur DEMEYER Daniel, Professeur, Université de Gent (Belgique),
Monsieur DRANSFIELD Eric, Docteur, INRA Theix.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur FEIDT Cyril

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :
"Ions, peptides et protéolyse post mortem dans le muscle strié."

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **"SCIENCES AGRONOMIQUES"**

Fait à Vandoeuvre le, **28 Novembre 1996**
Le Président de l'I.N.P.L.,
M. LUCTUS

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE NANCY

TEL. 33/83.59.59.59
FAX. 33/83.59.59.55

SUMMARY

The aim of this study is to follow the striated muscle soluble fraction (non-protein nitrogen and free minerals) evolution and to understand how these components can affect *post mortem* proteolysis.

Rabbit *Longissimus dorsi* was used for method elaboration, then kid *Longissimus dorsi, Triceps brachii* and *Semimembanosus* and young bull *Longissimus dorsi, Triceps brachii* and *Rectus femoris* were used in the analysis described below. Non-protein nitrogen components were extracted and studied using HPLC or GPC. Free mineral and organic ions were extracted using ultra-pure water and determined by capillary electrophoresis.

This study of ions releasing showed different mecanisms depending on ion species. Free magnesium content depends on reached ultimate pH, lactate depends on energy supplies at the death, free sodium, free chloride, free potassium and phosphate depend cellular energy supplies exhaustion. Total amounts of ions showed low variability and do not confirm a predominant role of ionic strength for proteolysis variability. *A contrario*, we have showed a synergistic effetc of magnesium and calcium for µcalpain activation.

The non-protein nitrogen showed a 40% increase in 24 days in kid meat. The average size of these compounds strongly decreased during this period. After the death, 48% of peptides are between 12 and 2·4 kDa long. This class represented only 27% after 24 days of storage. Free amino-acids significantly increased with time of storage especially after 10 days *post mortem*. Detection using chromatographic and colorimetric methods showed that significant free hydroxyproline amounts were present in bovine as well as in caprine meat (from 1·4 to 8 % of total hydroxyproline). Low molecular weight nitrogen compounds seemed to follow a three-steps evolution : non acidic soluble peptides, production of acidic soluble peptides (PM<12 kDa). These peptides were once again broken down, their size decreased and free amino-acids were released. We observed a significant relation between muscle type, ultimate pH and peptidic fraction evolution. Moreover, we found that *in vitro* these peptides inhibit bovine µcalpain activity.

These results suggest that *post mortem* calpain activity is affected by non-protein nitrogen compounds and ions.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur DEMEYER Daniel, Professeur, Université de Gent (Belgique),
Monsieur DRANSFIELD Eric, Docteur, INRA Theix.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur FEIDT Cyril

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :
"Ions, peptides et protéolyse post mortem dans le muscle strié."

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **"SCIENCES AGRONOMIQUES"**

Fait à Vandoeuvre le, **28 Novembre 1996**
Le Président de l'I.N.P.L.,
M. LUCQUIN

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE NANCY

TEL. 33/83.59.59.59
FAX. 33/83.59.59.55

RESUME

L'objectif de cette étude est de préciser la composition de la fraction soluble du muscle strié : Azote Non Protéique et minéraux libres, et d'étudier le rôle de ces éléments dans le déroulement de la protéolyse *post mortem*.

Après des mesures préliminaires sur le *Longissimus dorsi* de lapin, les mesures sont effectuées sur les muscles *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* et *Semimembranosus* de chevreau et sur les muscles *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* et *Rectus femoris* de jeune bovin. Les composés azotés non protéiques sont extraits en milieu acide et étudiés par HPLC ou CPG. Les ions minéraux ou organiques libres sont extraits à l'eau ultra-pure et dosés par électrophorèse capillaire.

L'étude de la libération des ions a montré des mécanismes différents selon leur nature. La teneur en magnésium libre dépend surtout du pH ultime atteint, celle du lactate dépend des réserves énergétiques présentes avant la mort, et celles du sodium, du chlore, du potassium et du phosphate libres dépendent de l'épuisement des réserves énergétiques de la cellule. La faible variabilité observée dans la quantité totale d'ions ne confirme pas l'hypothèse d'un rôle déterminant de la force ionique dans la variabilité de la protéolyse. En revanche, nous avons montré *in vitro* une synergie entre le magnésium et le calcium pour l'activation des calpaïnes.

La fraction azotée non protéique augmente de 40 % en 24 jours chez le chevreau. La taille moyenne des différents composés qui la constituent décroît fortement lors de cette période. Après la mort, 48% des peptides ont une taille comprise entre 12 et 2,4 kDa. Cette classe ne représente plus que 27% des peptides à 24 jours *post mortem*. Les acides aminés libres augmentent significativement avec le temps de maturation, notamment entre 10 et 14 jours *post mortem*. La détection par deux méthodes chromatographique et colorimétrique d'hydroxyproline libre chez le bovin comme chez le chevreau prouve l'existence d'une dégradation *post mortem* non négligeable (entre 1,4 et 8%) du collagène. L'évolution des composés azotés de faible poids moléculaire semble se faire en cascade : production de peptides à structure secondaire, production de peptides solubles dans l'acide perchlorique 3% (pas de structure secondaire, taille inférieure à 12 kDa), puis morcellement de ces petits peptides entraînant une nouvelle réduction de taille et une production d'acides aminés libres. Nous avons mis en évidence une relation significative entre le type de muscle, le pH ultime et l'évolution de la composition de la fraction peptidique. En outre, nous avons montré, *in vitro*, que ces peptides inhibent l'activité de la μ-calpaïne bovine.

Ces résultats suggèrent un rôle non négligeable des fractions azotées non protéiques et ioniques dans la régulation de l'activité *post mortem* des calpaïnes.