

7^{ème} REUNION DES INSTITUTS DE RECHERCHES SUR LES VIANDES

du 18 au 24 Septembre 1961

V A R S O V I E

SUR LES TAUX DE RIBO-NUCLEOTIDES ET NUCLEOSIDES DIFFUSANT DU MUSCLE DE PORC,

NORMAL ET MYOPATHIQUE, DANS LE LIQUIDE DE TYRODE, à 4° C.

par le Professeur A. B. LINDENBERG

Laboratoire de Biochimie-Physique, 16 rue Claude Bernard à PARIS 5°
et Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des
Conserves de Viandes.

SUR LES TAUX DE RIBO-NUCLEOTIDES ET NUCLEOSIDES DIFFUSANT DU MUSCLE DE PORC,
NORMAL ET MYOPATHIQUE, DANS LE LIQUIDE DE TYRODE, A 4° C

par A. J. LINDENBERG

INTRODUCTION

Le présent rapport, d'un caractère encore partiel, rentre dans le cadre plus général d'une étude comparée de la constitution du pool métabolique du tissu musculaire chez le porc normal et chez les animaux myopathiques, souffrant de l'affection désignée par HENRY et Coll (1958) sous le nom de "la myopathie exsudative dépigmentaire du porc".

Commençons par rappeler que le concept de la constitution du pool métabolique peut être compris de deux façons : dans un sens chimique et dans un sens physico-chimique.

Le plus souvent, on cherche à connaître la composition chimique de la réserve cellulaire en principes solubles, de poids moléculaire relativement peu élevé (pool métabolique), servant de pierres à bâtir pour l'édifice structural de la cellule ou du tissu, avec lequel les composés du milieu aqueux intra-cellulaire sont en constant équilibre dynamique d'échange et de transmutation.

La connaissance de la composition du pool cellulaire, à un moment donné de la vie de l'animal, peut être aisément acquise en procédant simplement à l'extraction des principes cellulaires solubles, soit par chauffage (coagulation) du tissu suivi de centrifugation ou de filtration, soit en traitant le tissu par des acides forts coagulants - tels les acides trichloracétique, perchlorique ou phosphotungstique - agents chimiques qui pénètrent rapidement dans les tissus pour précipiter les protéines et autres colloïdes protoplasmiques, tout en laissant dans le surnageant les composés de poids moléculaire moins élevé dits thermo- ou acido-solubles.

La connaissance de la composition du liquide inter- et intra-cellulaire présente un intérêt considérable pour le biochimiste attaché à l'étude des mécanismes présidant aux synthèses biologiques. Et il en est encore de même en ce qui concerne l'étude comparée des muscles de même espèce cellulaire chez des animaux de ferme et d'élevage industriel, comme aussi pour l'étude systématique de l'évolution post-mortem de la viande conservée à l'état frais.

.../...

Mais la méthode d'extraction des pools ne vise cependant que la connaissance de la composition chimique, mais non de la constitution physico-chimique pour ainsi dire structurée du milieu interne, prévalant dans le tissu intact. Il tombe en effet sous le sens que les traitements, par trop énergiques, que l'on fait subir au tissu en vue de l'extraction complète de ses constituants acido-solubles, ne saurait en aucune façon nous renseigner sur le degré de relâchement ou de labilisation des liaisons, dans le tissu exsudatif, entre constituants extractibles et constituants non-extractibles. En définitive, la question qui se pose est de savoir dans quelle mesure les liaisons intermoléculaires structurales, si importantes pour le développement harmonieux en biologie, sont-elles affaiblies dans le tissu myopathique par rapport à la normale.

Rappelons à ce sujet que l'état myopathique du muscle de porc est le plus commodément caractérisé par sa double tendance à l'exsudation (suintement morbide) et à la dépigmentation (appauvrissement en myoglobine).

En même temps, l'on constate que la myoglobine résiduaire du muscle exsudatif est plus aisément extraite à l'eau que la myoglobine du muscle non-exsudatif.

Il apparaît ainsi que l'état exsudatif et l'état dépigmentaire - tests de myopathie les plus apparents des muscles de porc - constituent en réalité deux aspects d'un même phénomène ; et il est à présumer que le relâchement des liaisons intermoléculaires présente une caractéristique générale du tissu myopathique. L'eau comme la myoglobine, comme sans doute aussi maintes autres constituants tissulaires, se trouvent être moins solidement liés les uns aux autres dans le tissu myopathique, la nature des liaisons en cause étant, de toute évidence, du type intermoléculaire réversible. Quelle que soit donc son étiologie, l'état myopathique se présente à nous comme un phénomène rattaché à une perte plus ou moins sensible du pouvoir lyophile des colloïdes protoplasmiques, soit en un mot à une perte de structuration tissulaire par rapport à l'état normal.

OBJET DE L'ETUDE

Pour approcher alors le problème de la constitution physico-chimique du muscle de porc, nous avons pensé à éprouver en premier lieu son comportement, à l'état isolé, au sein d'un liquide minéral équilibré dit physiologique. Cette épreuve est fondée sur le principe que le maintien en survie d'un tissu isolé dans un milieu liquide approprié est d'autant mieux assuré que le muscle y arrive à mieux conserver sa composition initiale. D'autre part, toutes choses étant égales par ailleurs, un muscle en survie lâchera d'autant moins de substances intracellulaires dans le milieu extérieur qui l'environne que sa structure est plus ferme. La caractérisation des vitesses avec lesquelles les différents solutés du pool métabolique sortent du muscle pour s'accumuler dans le liquide externe peut alors constituer un indice utile et commode du degré exsudatif du muscle éprouvé.

.../...

Nous nous sommes adressés au muscle couturier (Sartorius) de porc à cause de son excision relativement aisée et de sa taille appropriée à nos exigences expérimentales.

Nous relatons aujourd'hui quelques résultats obtenus en comparant l'exo-osmose de substances ribo-nucléiques, chez le muscle normal et myopathique. Les constituants nucléiques ont été choisis en raison de leur rôle primordial dans les synthèses organiques, et aussi en raison de la sûreté de leur caractérisation analytique.

TECHNIQUE DE DIFFUSION ET DE DIALYSE DU MUSCLE COUTURIER DU PORC DANS LE LIQUIDE DE TYRODE à pH 6,2 à 4° C.

Voici à présent comment nous opérons. Les muscles, prélevés à l'abattoir sur des carcasses déjà conditionnées, dans les heures qui suivent l'abattage, sont mis dans des pochettes en matière plastique, elles-mêmes enfermées dans un coffret à glace calorifugé, dans lequel les muscles sont transportés au laboratoire. Deux heures après, les Sartorius sont débarrassés du tissu conjonctif et adipeux adhérent, et pesés ; une portion est utilisée pour la détermination du résidu sec et de la myoglobine : la majeure partie qui reste, pesant 15 g environ, est plongée dans un sac dialyseur de cellophane, contenant 40 ml de liquide Tyrode glacé ; le sac ficelé est à son tour plongé dans un tube de verre cylindrique de 125 ml de capacité (3 x 15 cm), renfermant 60 ml du même liquide. Les tubes dialyseurs sont ensuite portés sur un dispositif ad hoc leur imprimant un lent mouvement de bascule, de manière à assurer l'homogénéité des liquides dans les deux compartiments au cours de la dialyse. Enfin, le dispositif avec les dialyseurs est placé dans un frigidaire fonctionnant à 4° C.

L'exo-osmose des substances intracellulaires commence aussitôt, et peut être suivi en fonction du temps sur les échantillons prélevés soit dans le compartiment liquide intérieur, en contact direct avec le muscle, soit dans le compartiment extérieur sur le dialysat.

L'accumulation des substances nucléiques provenant du muscle est naturellement plus lente dans le dialysat ; celui-ci présente cependant l'avantage d'être exempt de particules qui se détachent du tissu musculaire par simple frottement mécanique. Ces particules tissulaires peuvent être séparées, il est vrai, par centrifugation énergique du liquide extérieur. Mais l'interposition d'une membrane dialysante permet en outre de se prononcer si l'exo-osmose observée est bien le fait d'une diffusion moléculaire vers l'extérieur des composants du pool interne, à travers les membranes cellulaires et tissulaires du muscle isolé en survie.

Dans la pratique, les essais de dialyse sont généralement poursuivis pendant un temps suffisant (16 à 24 heures) pour approcher l'équilibre de concentrations dans les deux compartiments liquidiens. La comparaison des teneurs atteintes avec différents Sartorius nous renseigne alors sur la plus ou moins grande résistance à la diffusion vers l'extérieur de la réserve nucléique tissulaire, partant de la fermeté de constitution des muscles au départ.

La durée d'équilibration entre les deux compartiments, dans le système envisagé, dépend de la porosité de la membrane dialysante utilisée.

Pour écourter autant que faire se peut la durée des essais, on a donc intérêt à choisir des membranes de la plus grande porosité possible, retenant uniquement les particules tissulaires mécaniquement entraînées dans le premier liquide environnant le muscle d'essai.

La pratique préconisée d'effectuer les dosages au stade d'équilibration des deux compartiments liquidiens se justifie par la considération raisonnée des processus de diffusion en cours.

Au début, l'exo-osmose du muscle est rapide, à la faveur d'un fort gradient de concentration en substances diffusibles entre la réserve intracellulaire et le liquide interstitiel du tissu musculaire d'une part, et le liquide de Tyrode extérieur d'autre part. Mais, à mesure que le muscle s'épuise, le gradient s'amenuise, et la diffusion se ralentit ; et il arrive un moment où l'accumulation externe ne progresse plus qu'avec une lenteur extrême, et c'est au cours de ce stade que la concentration dans le dialysat s'approche de celle dans le liquide de diffusion. Si bien que le moment d'équilibration entre diffusat et dialysat correspond bien à l'état d'équilibre de diffusion entre le tissu musculaire en survie et le milieu extérieur de conservation.

METHODE CINETIQUE DE CARACTERISATION DU RIBOSE A L'ORCINOL CHLORHYDRIQUE

La caractérisation des substances nucléiques a été effectuée à l'aide des trois méthodes de dosage habituellement utilisées à cet effet, portant notamment sur le Ribose, l'ion phosphate et l'absorption dans l'ultraviolet (248 μ).

Plus particulièrement, nous nous sommes attachés à l'étude du dosage du ribose (purique) par la réaction colorée du Bial à l'orcinol chlorhydrique, en suivant la technique récemment indiquée par SLATER (1958), que nous avons élaborée en méthode cinétique en ce sens que l'intensité de la coloration obtenue est mesurée à l'absorptiomètre très sensible de Dognon (filtre rouge), après différents temps de chauffage à 100° C du mélange réactionnel, cette pratique permettant de distinguer le ribose des autres sucres qui l'accompagnent dans les extraits biologiques (cinq divisions au micro-ampéromètre correspondant à 1 μ g de ribose dans 3 ml de mélange réactionnel). (voir Figure I).

Comme il appert du graphique suivant, l'évolution de la coloration en fonction du temps du chauffage est radicalement différente pour le Ribose, le Glucose et le Fructose. Après 15 minutes de chauffage, la coloration du ribose est à son maximum, sa sensibilité colorimétrique étant alors 44 fois celle du glucose et 14 fois celle du fructose. En prolongeant le chauffage au-delà de 20 minutes, le rapport de sensibilité Ribose/Hexose ne fait pas que diminuer ; au bout de 40 minutes de chauffage, le rapport colorimétrique Ribose/Glucose est de 11, celui de Ribose/Fructose de 7 ; après 60 minutes de chauffage, la colorimétrie du glucose comme du fructose n'est déjà que 4 à 4,5 moins intense que celle du ribose. Nos essais continuent.

Cela revient à dire que pour doser le ribose en présence d'hexose, on a intérêt à effectuer les mesures après 15 à 20 minutes de
.../...

COLORIMETRIE A L'ORCINOL CHLORHYDRIQUE DU RIBOSE, DU GLUCOSE
ET DU FRUCTOSE EN FONCTION DE LA DUREE DE CHAUFFAGE A 100° C
DU MELANGE REACTIONNEL

Divisions à
l'absorptiomètre.

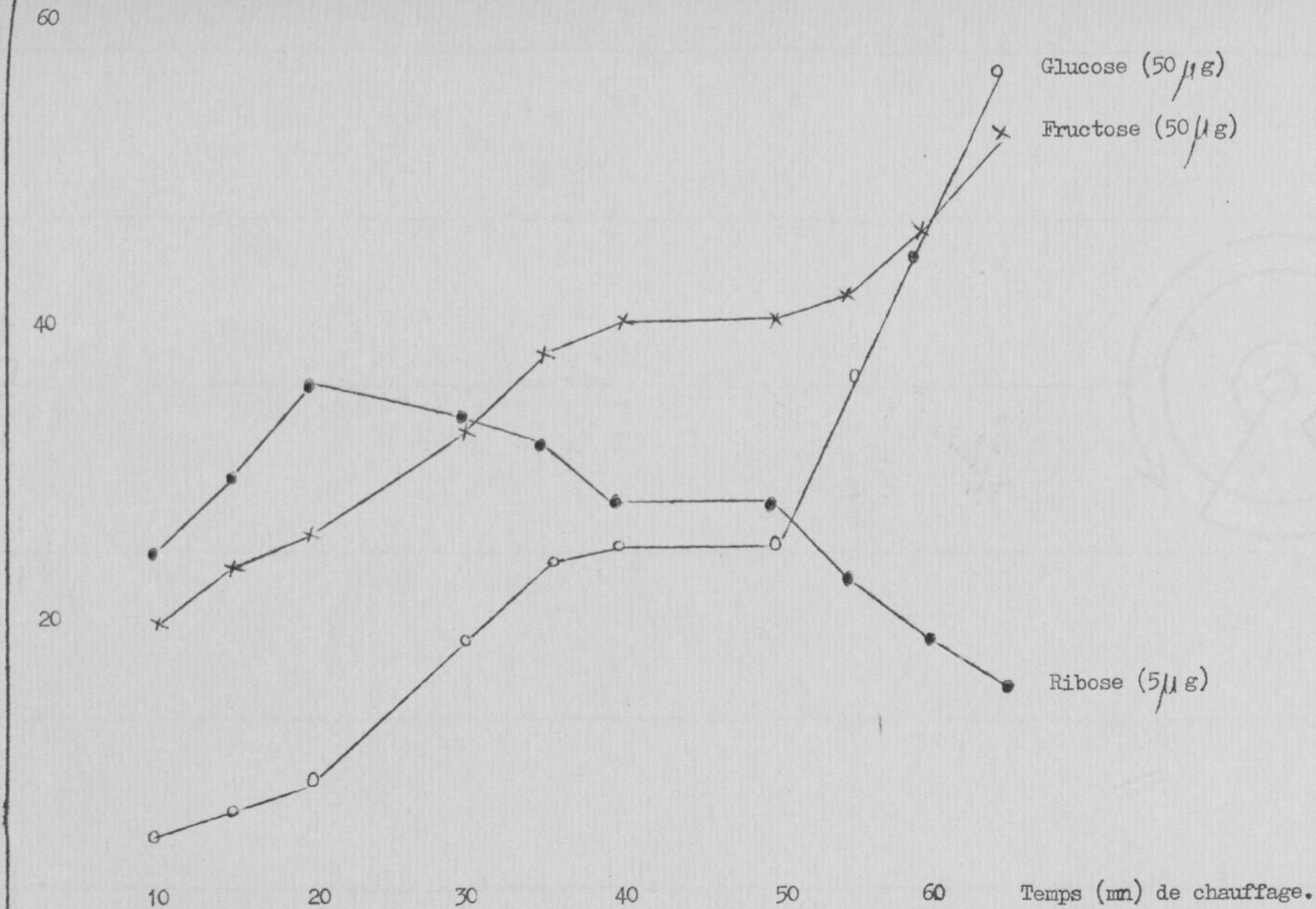
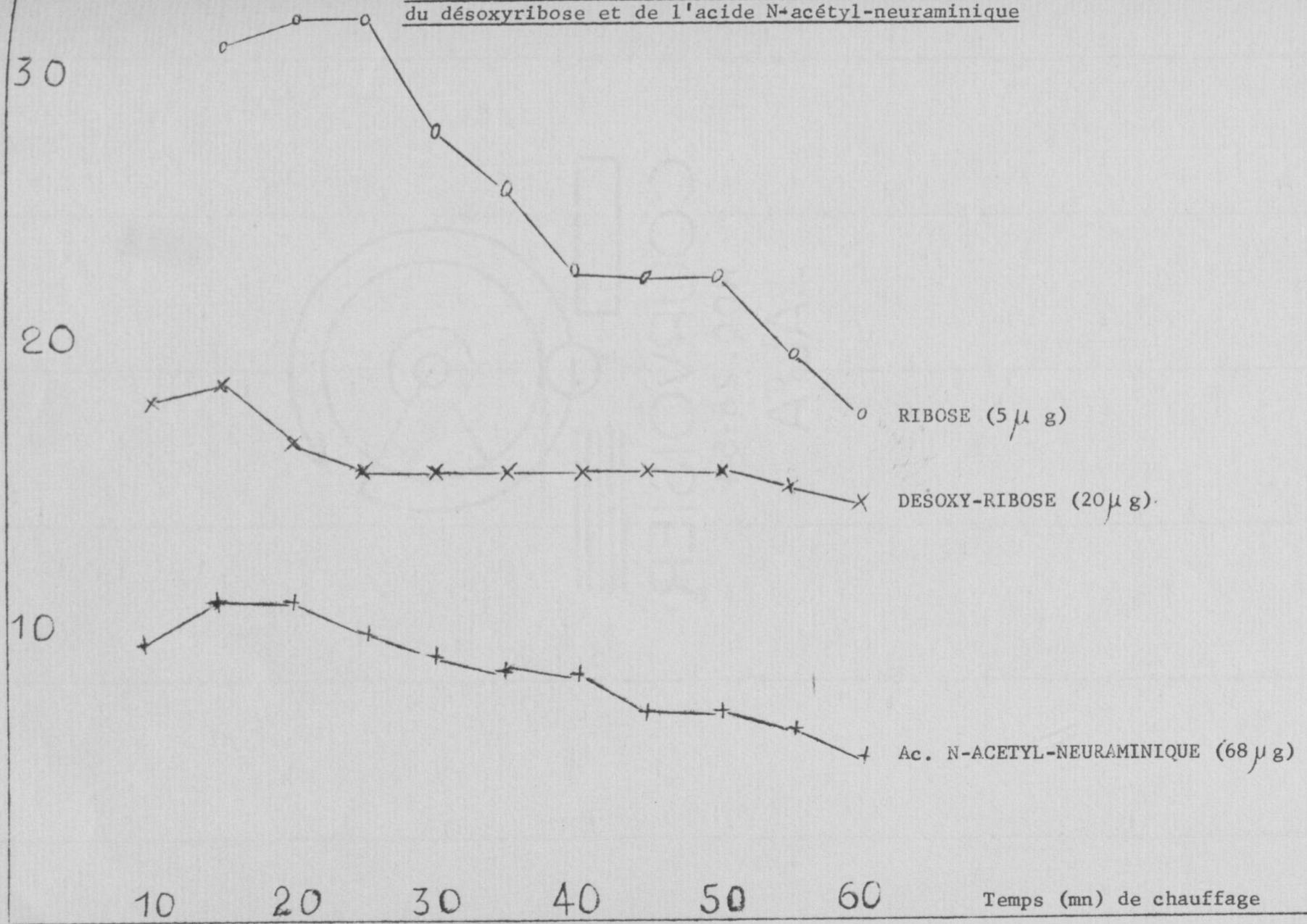


FIGURE 2

Colorimétrie à l'orcinol chlorhydrique du ribose,
du désoxyribose et de l'acide N-acétyl-neuraminique



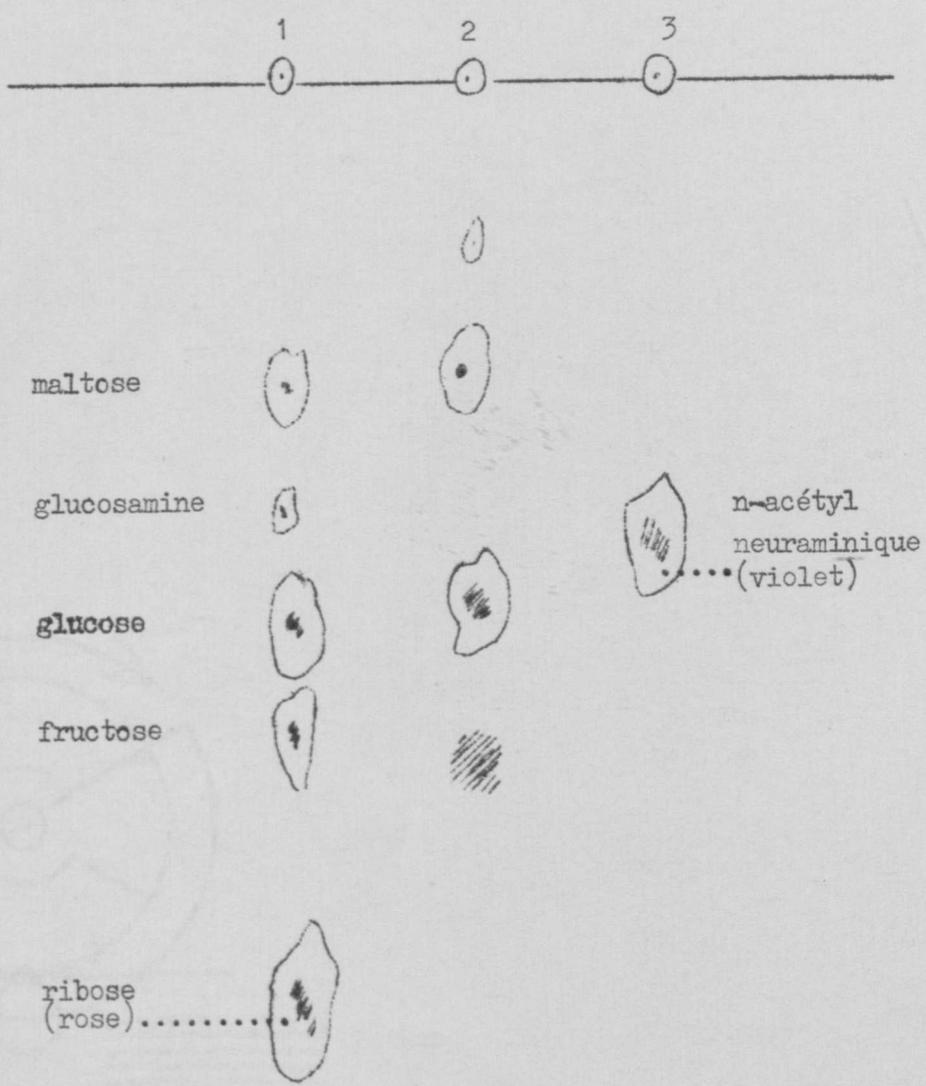


FIGURE 2

COLORIMETRIE A L'ORCINOL CHLORHYDRIQUE DU RIBOSE, DU DESOXY-RIBOSE ET DE L'ACIDE N-ACETYL-NEURAMINIQUE

chauffage, l'erreur commise du fait de la présence d'autres sucres étant alors à son minimum. Le dosage plus précis n'est toutefois possible qu'en procédant à l'établissement d'une courbe colorimétrique en fonction de la durée de chauffage, l'allure de cette courbe permettant d'évaluer la proportion du ribose dans le mélange réactionnel. Dans la pratique, on peut se contenter d'effectuer les mesures après les trois temps caractéristiques de 20, 40 et 60 minutes de chauffage. (voir figure 2).

Ici encore, on le voit, la présence de désoxy-ribose est la moins gênante après 20 minutes de chauffage, le rapport de sensibilité colorimétrique Ribose/Désoxy-ribose étant alors de 7,5 ; après 40 minutes, ce rapport descend à 5,75 et, après 60 minutes de chauffage, il n'est plus que de 4,8.

Quant à l'acide sialique, le temps de chauffage influe beaucoup moins sur l'intensité de sa coloration à l'orcinoïl, si bien que le rapport de sensibilité Ribose/Ac. Sialique conserve une valeur d'environ 4 avec tous les temps de chauffage appliqués.

Des essais analogues ont encore été effectués avec d'autres sucres physiologiques (arabinose, xylose, galactose, maltose, saccharose, lactose), en vue de vérifier la relative spécificité de la réaction de Bial, pour les pentoses, dans nos conditions coopératoires. La description détaillée de la méthode cinétique élaborée (comportant des formules pour le calcul de la proportion de pentose et d'hexoses dans les extraits biologiques) fera l'objet d'une prochaine communication dans un périodique spécialisé.

RESULTATS

SUBSTANCES NUCLEIQUES ACIDO-SOLUBLES DU MUSCLE SARTORIUS NORMAL ET EXSUDATIF

L'extraction à l'acide trichloracétique (10 %, une heure de contact, à la température du laboratoire, muscle hâché aux ciseaux) n'a jusqu'à présent révélé que des différences mineures et non systématiques dans les taux nucléiques des muscles Sartorius dit normaux, provenant des abattoirs GEO de PARIS, et des muscles Sartorius d'animaux d'élevage du C.N.R.Z. à JOUY-EN JOSAS, plus ou moins exsudatifs. (voir Tableau I).

Plus d'attention mérite la technique de dialyse, décrite plus haut, à l'aide de laquelle on a pu montrer que les muscles exsudatifs dépigmentés abandonnent deux fois sensiblement plus de substances nucléiques que les muscles d'apparence plus normale, les variations enregistrées allant de pair avec leur degré de dépigmentation. (voir Tableau 2).

Ce fait n'a pas encore reçu d'explication univoque. Trois possibilités se présentent à l'esprit :

1°) Le taux nucléique du pool tissulaire serait le même chez le porc normal et myopathique, mais la dégradation post-mortem serait plus intense dans le muscle exsudatif que dans le muscle normal ;

2°) les substances nucléiques solubles seraient moins solidement attachées aux protéines et nucléoprotéines tissulaires dans le muscle

TABLEAU I

TAUX NUCLEIQUES COMPARES, EN mg/g DE MUSCLE FRAIS, DES EXTRAITS
TRICHLORACETIQUES DE SARTORIUS NORMAUX ET EXSUDATIFS

/02

I96I	NORMAUX	EXSUDATIFS
9/5	Ribose : 0,90 A. N. : 3,14	
16/5	Ribose : 0,965 A. N. : 3,69	1,05 3,875
27/6	Ribose : 0,87 A. N. : 2,83 PO ₄ : 3,215	1,275 3,55 3,475
18/7	Ribose : 1,255 A. N. : 3,35 PO ₄ : 3,38	1,65 3,68 3,61
25/7 (24 h de conserva- tion sur glace)	Ribose : 1,00) 0,875) muscles A. N. : 3,5) gauches 3,2)	0,75) 0,625) droits 2,5) 2,5)

TABLEAU II

TAUX NUCLEIQUES COMPARES DES DIFFUSATS-DIALYSATS DE MUSCLES SARTORIUS
NORMAUX et EXSUDATIFS

I96I	NORMAUX	EXSUDATIFS
7/12/60	Ribose (muscle droit) : 0,40 (muscle gauche) 0,54	
31/1		Ribose (muscle droit) : 0,82 (muscle gauche) 0,91
11/4		Ribose (muscle droit) : 0,80 (muscle gauche) 0,85
11/7	Ribose : 0,42 A. N. : 1,50	0,815 2,60
12/7	Ribose : 0,37 A. N. : 1,755	0,80 2,645
18/7	Ribose : 0,34 A. N. : 1,62	0,64 2,19
25/7	Ribose : 0,55 0,355 A. N. : 1,785 1,23	0,74 0,68 2,48 2,575

exsudatif dépigmentaire que dans le muscle normal ;

3°) La perméabilité des membranes cellulaires et tissulaires serait accrue chez le Sartorius exsudatif.

Sans pouvoir se prononcer à l'heure présente sur la valeur de ces diverses possibilités d'interprétation, il est cependant permis d'accorder quelque vraisemblance à l'hypothèse (2) du fait d'observation déjà cité concernant la plus grande facilité d'extraction par l'eau de la myoglobine dans le cas du muscle exsudatif.

Quoi qu'il en soit, la plus ou moins prompte diffusion extra-tissulaire in-vitro des substances nucléiques du muscle, en survie dans un liquide minéral physiologique, fournit une méthode commode d'appréciation du degré de relâchement de la structure de la viande, touchant la fermeté de liaison des constituants (solubles) du pool métabolique.

ABSENCE DE RIBOSE LIBRE DANS LE MUSCLE SARTORIUS ISOLE DE PORC

La pratique concomittante des trois méthodes de dosage - pentose, phosphate, absorption spectrophotométrique à 248 mμ - nous avait déjà laissé entrevoir que le ribose trouvé dans les liquides de macération ou des dialyses des muscles y était très vraisemblablement lié sous forme de phosphate nucléotidique et nucléosidique.

Mais, étant donné certaines affirmations, sur lesquelles nous reviendrons dans un instant, suivant lesquelles du ribose libre se formerait dans la viande de porc à partir des acides ribonucléiques pendant la manipulation et le stockage post-mortem, il nous a semblé intéressant de procéder sans délai à la vérification de ce point sur les extraits et les diffusats musculaires, en se plaçant dans les conditions que voici :

Dans un premier temps, le dialysat est admis à passer à travers une colonne mixte (de 10 cm) de résines retenant les sels minéraux, et aussi les composés phosphorés nucléiques du ribose.

RESULTAT : la chromatographie des sucres pratiquée sur le liquide effluent permet de déceler la présence de divers sucres libres, sans que l'on puisse mettre en évidence du ribose, même à l'état de trace.

Le dialysat est préalablement déssalé sur échangeurs d'ions mixtes ; couche supérieure : DOWEX 50 x 2, 25-50 mesh, sous forme de chlorure ; couche inférieure : Amberlite IR 45, sous forme formiate.

La chromatographie est effectuée selon la méthode de Partridge, sur du papier Whatman n° I, dans le système solvant : Butanol-acide acétique -eau, dans les proportions 4 : 1 : 5, pendant 48 heures.

Révélation à l'oxalate :

- N° 1 : témoin contenant 50 μg de chaque sucre
- N° 2 : dialysat de muscles de porc,
- N° 3 : 50 g de n-acétyl-neuraminique.

Dans un deuxième temps, les nucléotides du dialysat sont tout d'abord retenus sur une colonne de résine DOWEX - I x 8, 200 - 400 mesh, sous forme formiate : l'effluent est ensuite passé à travers une colonne de la même résine, mais sous forme chlorure, pour retenir les nucléosides, qu'on fait fractionner par élution à l'acide chlorhydrique dilué, additionné ou non de NaCl, en suivant la procédure décrite par COH.

Dans ce cas encore, on arrive à éluer différents sucres libres, du glucose surtout que l'on caractérise aisément grâce à la méthode cinétique à l'orcinol, sans qu'on ait pu mettre en évidence une quantité appréciable de ribose.

Ce résultat n'est pas en contradiction avec celui obtenu par FREDHOLM (1960), qui emploie le terme "ribose libre" comme étant la quantité de ribose qui peut être détecté par les méthodes ménagées, utilisées par l'auteur, "même si une partie de ce pentose provenait de produits d'hydrolyse des acides ribo-nucléiques, tels des mononucléotides". L'auteur fait en effet passer l'extrait phosphotungstique du muscle simplement à travers la résine DOWEX - 50, qui ne retient pas le ribose combiné au phosphate.

Toutefois, la qualification de "libre" étant généralement employée en biochimie dans le sens rigoureux du terme, nous concluons à l'absence de quantités appréciables de ribose libre dans le muscle Sartorius du porc, qu'il soit normal ou affecté de myopathie exsudative dépigmentaire.

CONCLUSIONS

En s'adressant aux muscles frais de porc (Sartorius droit et gauche) d'apparence normale et exsudative (dépigmentée) - qu'on met en diffusion et en dialyse au sein du liquide de Tyrode à 4° C - les premiers résultats obtenus montrent que :

- les muscles dépigmentés abandonnent au milieu extérieur sensiblement deux fois autant de substances nucléiques que les muscles normaux.
- les extraits trichloracétiques, en revanche, ne montrent pas de différences systématiques dans leurs teneurs en composés nucléiques acido-solubles.
- les essais d'échange d'ions et de chromatographie des extraits et des diffusats - dialysats des muscles tant normaux qu'exsudatifs - n'ont pas permis d'y déceler la présence du ribose à l'état chimique libre.

Nous étions, par ailleurs, amenés à élaborer une méthode cinétique de dosage du ribose (purique) à l'orcinol chlorhydrique (réaction de Bial), permettant de distinguer les pentoses des hexoses physiologiques.

Nos essais continuent en vue de la résolution complète individuelle des composants nucléiques diffusibles dans les tissus musculaires normaux et myopathiques.