

13th EUROPEAN MEETING OF MEAT RESEARCH WORKERS  
ROTTERDAM. 20 - 26th August 1967

---

---

EVOLUTION POST MORTEM DES PROTEINES MYOFIBRILLAIRES  
DU MUSCLE DE BOVIN

---

C. VALIN

Laboratoire de Rescherches sur la Viande  
Centre national de Recherches zootechniques .  
78 - Jouy - en Josas. France.

---

D<sub>5</sub>

EVOLUTION POST MORTEM DES PROTEINES MYOFIBRILLAIRES  
DU MUSCLE DE BOVIN

=====

Les protéines myofibrillaires et leur état d'organisation subissent de profonds remaniements après la mort de l'animal. Tout d'abord le muscle mou et relâché devient rigide et dur au cours de la séquence relativement bien connue d'événements suivants :

- la glycolyse provoque une chute du pH du muscle,
- le taux de phosphocréatine puis celui de l'adénosine tryphosphate diminuent,
- consécutivement à l'hydrolyse de l'ATP, il y a combinaison de la F actine et de la myosine, apparition d'un état plus ou moins contracté et installation de la rigor.

La phase de maturation qui succède se traduit par une augmentation de la tendreté, le muscle s'amollit, mais cela ne correspond pas à la relaxation musculaire suivant la contraction. Les mécanismes mis en jeu dans cette phase et les modifications affectant la fraction myofibrillaire sont encore très mal connus :

- l'actomyosine ne peut plus se dissocier en actine et myosine,
- des remaniements ioniques se produisent entraînant une légère augmentation du pouvoir de rétention d'eau,
- l'activité protéolytique existante dans le muscle ne semble pas pouvoir expliquer le gain de tendreté survenant au cours de la maturation,
- le seul fait bien démontré jusqu'à présent est l'augmentation de l'extractibilité des protéines myofibrillaires au cours de cette période (1).

Nous nous sommes posés la question de savoir si parallèlement à l'augmentation d'extractibilité, la nature et la composition de la fraction extraite étaient les mêmes en rigor et après maturation. Cet examen pourrait peut-être nous amener à comprendre les mécanismes hydrolytiques mis en jeu.

La difficulté, dans ce type d'étude, réside dans l'interprétation des résultats obtenus par voie biochimique sur des solutions et l'extrapolation à la situation in situ. A cette fin, nous avons entrepris d'associer dans la mesure du possible les investigations biochimiques effectuées sur l'actomyosine extraite selon une méthode standard (WEBER-EDSALL) utilisée dans de nombreux laboratoires, à un examen au microscope électronique de l'état d'organisation de ces mêmes protéines aux différentes époques post mortem.

#### MATERIEL ET METHODES

L'étude a été faite sur des vaches de réforme. Le muscle utilisé était le longissimus Dorsi prélevé au niveau de la 12ème côte, un jour post mortem et au niveau de la 12ème côte, neuf jours post mortem. Les carcasses étaient conservées à + 4°C.

#### EXTRACTION DES PROTEINES MYOFIBRILLAIRES.

50 Grammes de muscle sont homogénéisés dans 200 ml de solution de Weber-Edsall (KCl 0,6 M ; Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 0,01 M ; Na H CO<sub>3</sub> 0,04M) Après 24 heures d'extraction à une température comprise entre 0 et + 4°C, l'homogénat est dilué dans 200 ml de solution de Weber et Edsall, puis est centrifugé pendant 45 mn à 27 000 G à une température inférieure à + 4°C.

La purification de l'actomyosine est réalisée par deux cycles de précipitation en milieu KCl 0,2 M et redissolution en milieu KCl 0,6 M. L'actomyosine est finalement mise en solution dans le mélange KCl 0,6 M ; tampon tris HCl 0,02 M pH 7,2 ; Mg Cl<sub>2</sub> 10<sup>-3</sup> et clarifiée par une centrifugation de 45 mn à 27 000 G.

Les concentrations en protéine sont mesurées en dosant l'azote par la méthode de KJELDAHL et en adoptant le coefficient de transformation de 6,25.

### MESURES SPECTROPHOTOMETRIQUES.

La détermination du  $E_{290\text{m}\mu}^{1\%}$  à pH 13 de l'actomyosine est effectuée en réalisant les spectres d'absorption en UV de solutions de concentration connue.

Deux corrections sont à introduire dans le calcul du

$E_{290\text{m}\mu}^{1\%}$ :

- une correction de turbidité obtenue à partie des densités optiques enregistrées hors de la zone d'absorption du chromophore protéique (DO 340, 360 et 380 m $\mu$ ).
- une correction d'absorption due aux nucléotides (2).

La mesure à pH 13 du  $E_{290\text{m}\mu}^{1\%}$  permet de réduire considérablement l'importance de ces deux corrections.

Les spectres ont été réalisés avec <sup>un</sup> spectrophotomètre Bansch et Lomb Spectronic 505.

### VISCOSIMETRIE.

Les mesures de viscosité ont été réalisées à 25°C dans un viscosimètre d'Oswald dont le temps d'écoulement pour 10 ml d'eau à cette température est de 33 secondes.

La sensibilité à l'ATP est déterminée par mesure de la viscosité relative avant et après addition d'ATP. La sensibilité est calculée selon la relation de Weber:

$$\text{sensibilité} = \frac{\text{Log. } \eta_{\text{rel}} - \log \eta_{\text{rel ATP}}}{\text{Log } \eta_{\text{rel ATP}}}$$

en corrigeant l'effet de dilution dû à l'addition d'ATP.

#### SUPERPRECIPITATION.

Les cinétiques de superprécipitation ont été enregistrées en suivant l'évolution de la transmission à 660 m $\mu$  (3).

#### ACTIVITE ATPasique.

L'activité ATPasique est déterminée en mesurant la libération de phosphore inorganique par la méthode de FISKE et SUBBAROW.

#### MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La préparation des fibres glycérinées a été faite selon la technique de SZENT GYORGYI (4). La fixation est faite dans O S O<sub>4</sub> tamponné à pH 7,0 et la coloration par l'acétate d'uranyl - citrate de plomb. L'examen a été réalisé à l'aide d'un microscope Siemens.

#### RESULTATS

#### MESURES SPECTROPHOTOMETRIQUES.

Compte tenu de la différence de composition en acides aminés et en particulier en acides aminés aromatiques de l'actine et de la myosine, les coefficients d'absorption de ces deux protéines sont très différents,  $E_{290 \text{ m}\mu}^{1\%} = 6,10$  pour la myosine et 11,06 pour l'actine (5), d'où la possibilité de suivre au cours du temps l'évolution du pourcentage de chacun des constituants de l'actomyosine.

Dans tous les cas, nous avons enregistré une diminution du  $E_{290 \text{ m}\mu}^{1\%}$  de l'actomyosine au cours de la maturation (tableau 1), ce qui traduit un abaissement du pourcentage d'actine dans le milieu

extrait par la solution de Weber et Edsall de 7% en moyenne.

	Temps de conservation		pour cent de diminution d'actine
	1 jour	9 jours	
$E_{290}^{1\%}$ $\mu$	8,36 $\pm$ 0,12	8,00 $\pm$ 0,11	7,2

Tableau 1 - Evolution post rigor du coefficient d'absorption de solutions à 1% d'actomyosine.

obtenu  
Ce résultat est à rapprocher de ceux/par FUJIMAKI et al. (6). Ces auteurs ont étudié la composition de l'actomyosine à l'aide de techniques reposant sur le principe de la dissociation du complexe et la détermination séparée de ses constituants après séparation par centrifugation (7-8). Mais il est alors difficile de savoir si au cours de la maturation ce sont les proportions relatives des constituants ou bien le degré de dissociation qui varient. Le résultat similaire que nous enregistrons à l'aide d'une méthode fondamentalement différente ne nécessitant pas la dissociation de l'actomyosine confirme l'évolution au cours de la maturation de la composition du complexe extrait par la solution de Weber-Edsall.

### VISCOSIMETRIE.

Les études de SZENT GYORGYI ont montré que la viscosimétrie constituait une méthode indirecte susceptible d'apporter de nombreuses informations concernant les protéines contractiles.

Les mesures de viscosité nous ont montré une diminution de la viscosité réduite de l'actomyosine au cours de la maturation (fig.1). Ceci peut traduire à neuf jours post mortem la présence d'actomyosine constituée par des filaments de F actine plus courts que ceux la constituant en rigor.

Ces remaniements au niveau de l'actine sont confirmés par la diminution de la sensibilité de l'actomyosine à l'ATP au cours de la période post rigor (tableau 2) :

	durée de conservation		pour cent de diminution
	1 jour	9 jours	
Sensibilité	1,63	1,34	18

Tableau 2 - Sensibilité de l'actomyosine à l'ATP mesuré dans un milieu contenant  $5 \cdot 10^{-4}$  M ATP

Comme la variation de viscosité relative d'une solution d'actomyosine est d'autant plus importante qu'il y a plus d'actine dans le mélange, ce résultat corrobore celui rapporté dans le chapitre précédent.

L'ATP produit une diminution de la viscosité. L'actomyosine et la myosine sont des ATPases et au fur et à mesure que l'ATP est hydrolysé, l'actomyosine se reforme et la viscosité relative croît. La cinétique de cette évolution est une mesure indirecte de l'activité ATPasique de la solution testée. Or les actomyosines extraites lors de la rigor et après maturation montrent des cinétiques très différentes (fig. 2) et les cinétiques d'activité ATPasiques dans les mêmes conditions sont du même type (fig. 3). L'actomyosine extraite après maturation montre, après addition d'ATP, une phase de dissociation avec inhibition de l'activité ATPasique, alors que l'actomyosine extraite en rigor ne présente pas cette inhibition momentanée.

Si, lors de la rigor l'actomyosine est extraite à la température ambiante ( $+20^{\circ}\text{C}$ ), on obtient des cinétiques de réponse à l'addition d'ATP et des  $E_{290\text{ m}\mu}^{1\%}$  identiques à ceux obtenues avec l'actomyosine extraite à froid après maturation.

Pour compléter cette étude, nous avons étudié l'interaction de l'ATP avec l'actomyosine en milieu de faible force ionique.

### SUPERPRECIPITATION

La superprécipitation est le phénomène qui se produit lors de l'interaction de l'ATP avec l'actomyosine en milieu de faible force ionique dans lequel l'actomyosine est sous forme précipitée.

Les figures 4 et 5 montrent les cinétiques de superprécipitation enregistrées avec des actomyosines extraites 2 jours et 9 jours post mortem dans deux milieux contenant respectivement 0,06 M KC1 et 0,15 M KC1.

Deux faits sont à retenir, d'une part, le comportement similaire des deux actomyosines en milieu KC1 0,06 M et la différence de cinétique en milieu KC1 0,15 où l'actomyosine extraite après maturation présente une superprécipitation retardée traduisant une inhibition d'activité ATPasique. SZENT GYORGYI et KAMINER (9) ont montré que l'actomyosine extraite par la méthode de Weber et Edsall pouvait être un composé ternaire d'actine, de myosine et d'un métachromatique dont le constituant majeur s'est avéré être la tropomyosine (10). KATZ (11), par ailleurs, a démontré l'effet inhibiteur de la tropomyosine sur la superprécipitation en milieu KC1 0,15 M, effet inexistant pour des concentrations de KC1 inférieures ou égales à 0,09 M.

L'ensemble de ces faits permettrait peut-être d'expliquer l'évolution post rigor des propriétés de l'actomyosine par une augmentation progressive dans l'extrait de Weber et Edsall de la part des composés autres que l'actine et la myosine, en particulier de la tropomyosine. Cette hypothèse concorde bien avec la diminution du pourcentage d'actine dans le milieu et le fait que l'actomyosine extraite à 20°C au moment de la rigor présente des caractéristiques analogues à celle extraite à froid après maturation.



CONCLUSION.

La maturation des viandes se traduit par un gain de tendreté. Cela se fait par fragilisation d'une structure apparemment indemne de bouleversement. Il s'agit donc de remaniements discrets que seule une étude de cette structure à l'échelle la plus fine peut déceler.

Ces remaniements existent et la microscopie électronique nous en montre déjà une partie. L'état d'organisation des protéines contractiles en rigor et post rigor est un état contracté, mais, en rigor, l'intégrité de la structure des sarcomères semble respectée, la figure 5 (diapositive) le montre. Les stries Z sont intactes et alignées. Après neuf jours de maturation, des modifications notables sont intervenues, (fig 5, diapositive) immédiatement visibles au niveau des stries Z qui sont plus ou moins fragmentées dans les myofibrilles comme dans l'espace intermyofibrillaire et, de plus, la liaison entre ces stries et les myofilaments semble plus ou moins altérée.

Les modifications observables au niveau de l'actomyosine extraite par la solution de Weber et Edsall sont aussi indiscutables, encore que très discrètes, puisque FUJIMAKI et al. (12) n'ont pu mettre en évidence aucune différence par ultra centrifugation analytique. Des techniques très sensibles doivent être utilisées et, en particulier, l'examen des interactions de l'ATP avec les protéines contractiles est certainement une des méthodes les plus sensibles permettant de mettre en évidence les modifications se produisant au niveau des protéines contractiles au cours de la maturation.

L'existence de ces modifications ne fait plus de doute et se reflète aussi bien dans l'augmentation d'extractibilité que dans la variation de la composition de la fraction extraite, mais nous ne pouvons pas nous permettre encore de préjuger de la nature des mécanismes hydrolytiques mis en jeu.

R E S U M E

=====

Cette note rapporte certaines modifications physicochimiques survenant au cours de la maturation au niveau des protéines contractiles.

Ces transformations, quoique discrètes, sont notables. On assiste, au cours de la période post rigor, à une évolution de la composition de l'actomyosine traduite par un abaissement de  $E_{290}^{1\%}$  et de la viscosité réduite, ainsi que des modifications de cinétique d'activité ATPasique.

Simultanément, il se produit des remaniements au niveau de l'état d'organisation de ces protéines dans le muscle au cours de la maturation, rupture de stries Z et altérations à la fonction stries Z et myofilaments.

S U M M A R Y

=====

This study treats the evolution of certain physicochemical properties of the actomyosin of bovin muscle during ripening.

The reduction of the  $E_{290}^{1\%}$  and of the reduced viscosity during aging show a change at the level of actin. The evolution of the ATPase properties of actomyosin in a solution of low ionic strength could be interpreted as a progressive solubilisation of tropomyosin during the post rigor phase.

Simultaneously, the histology of the muscular fiber indicates damages along the Z lines and at the function of the Z lines and the myofilaments.

BIBLIOGRAPHIE

=====

1. E.N. McINTOSH. J. of Food Science (1967). 32, 208
2. F. MIHALYI, K. LAKI, M.I. KNOLLER. Arch. Biochem. Bioph. (1957). 68, 130.
3. S. EBASHI. J. Biochem. (1961) 60, n° 3, 236.
4. A. SZENT GYORGYI. Chemistry of muscular contraction (1951) Acad. Press Inc. NEW YORK.
5. F. MIHALYI, A.J. ROWE. Bioch. Zeitschrift (1966). 395, 267.
6. M. FUJIMAKI, N. ARAKAWA, A. OKITANI and O. TAKAGI. J. Food Science (1965). 30 (6), 937.
7. A. WEBER. Bioch. Bioph. Acta (1956). 19, 345.
8. K. MARUYAMA, J. GERGELY. J. Biol. Chem. (1962). 237, 1 100.
9. A. SZENT GYORGYI, KAMINER. Proc. Natl. Acad. Sci. US (1963) 50, 1 033.
10. N. AZUMA, S. WATANABE. J. Biol. Chem. (1965). 240 (10), 3847.
11. A. KATZ. J. Biol. Chem. (1964). 239, 3 304.
12. A. OKITANI, N. ARAKAWA, M. FUJIMAKI. Agr. Biol. Chem. (1965) 29 (11), 971.

- - - - -

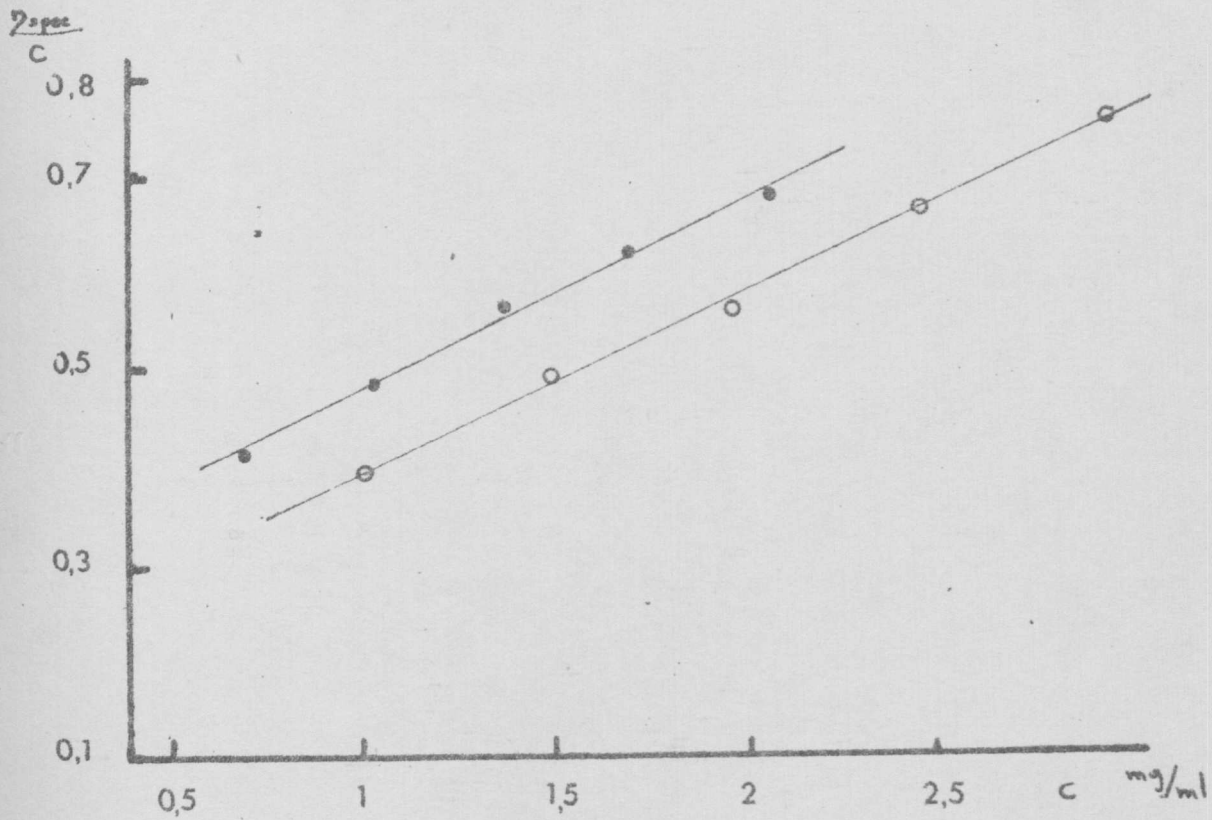


Fig I: Evolution post mortem de la viscosité réduite de l'extrait Weber Edsall:

- 2 jours post mortem
- 9 " " "

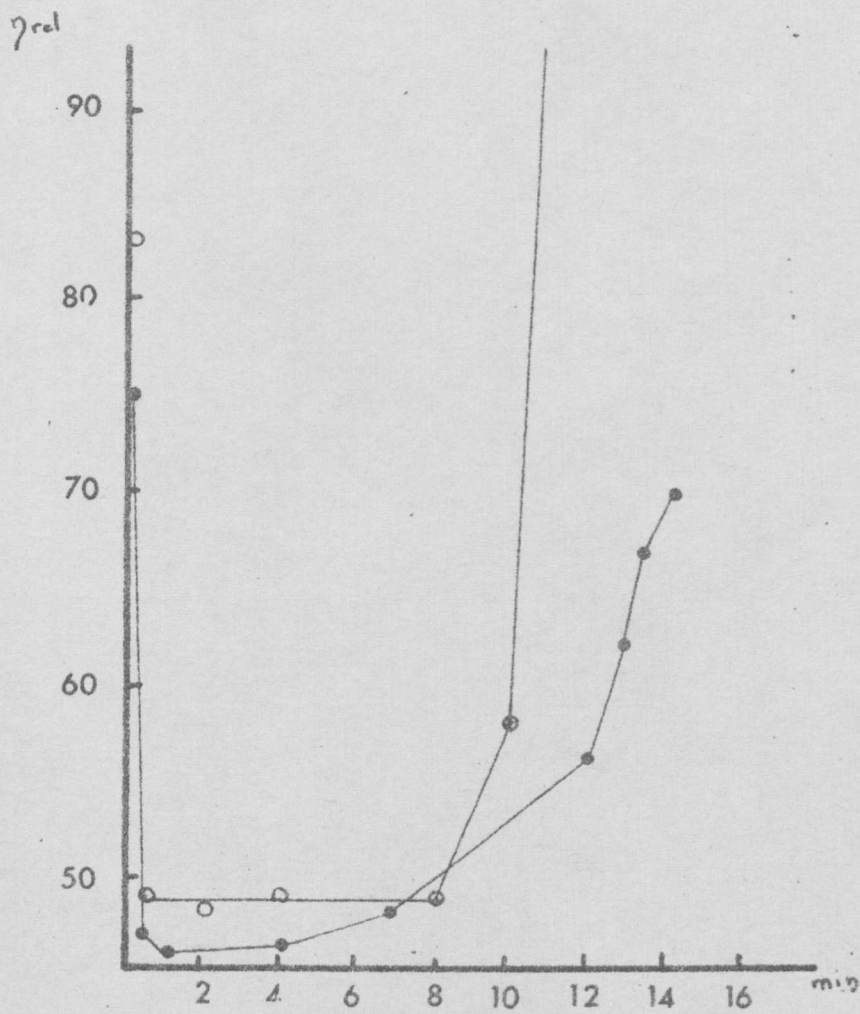


Fig II: Evolution de la viscosité relative après addition d'ATP

● ● 2 jours post mortem

○ ○ 9 " " "

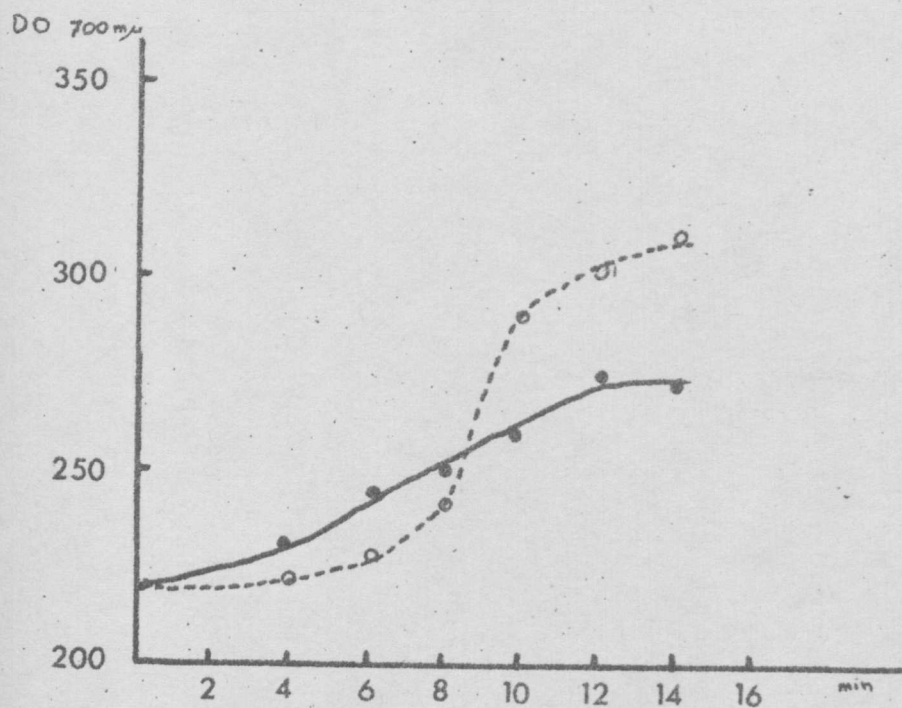


Fig III: Cinétique de l'activité ATPasique de l'actomyosine extraite 2 jours ● et 9 jours ○ post mortem ; en milieu  $\text{KCl } 0,6\text{M}$   $\text{TrisHCl } 0,02\text{M}$   $\text{pH: } 7,2$   $\text{MgCl}_2 \ 10^{-3}\text{M}$  ;  $\text{ATP } 5 \cdot 10^{-4}\text{M}$

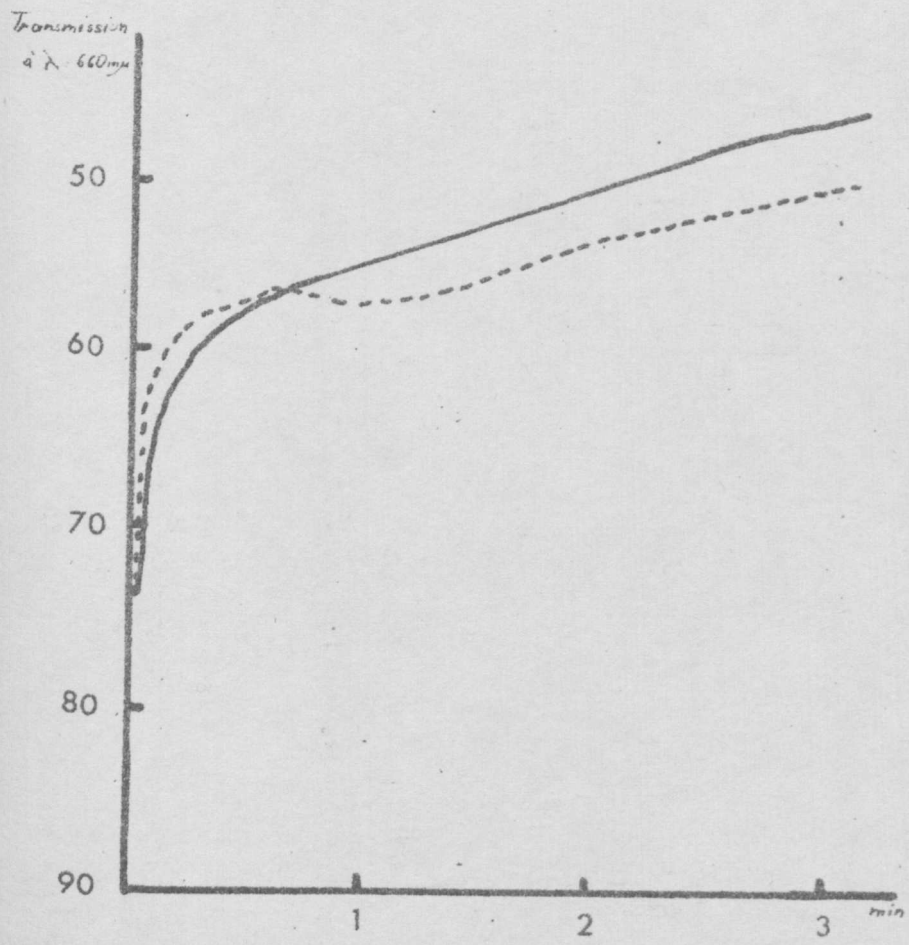


Fig IV: Superprécipitation de  
 solution d'actomyosine en milieu  $\text{KCl } 0,06\text{M}$   
 Tris  $\text{HCl } 0,02\text{M}$   $\text{pH: } 7,2$   $\text{MgCl}_2$   $10^{-3}\text{M}$   $\text{ATP } 2 \cdot 10^{-4}\text{M}$   
 — 2 jours post mortem  
 ---- 8 " " "

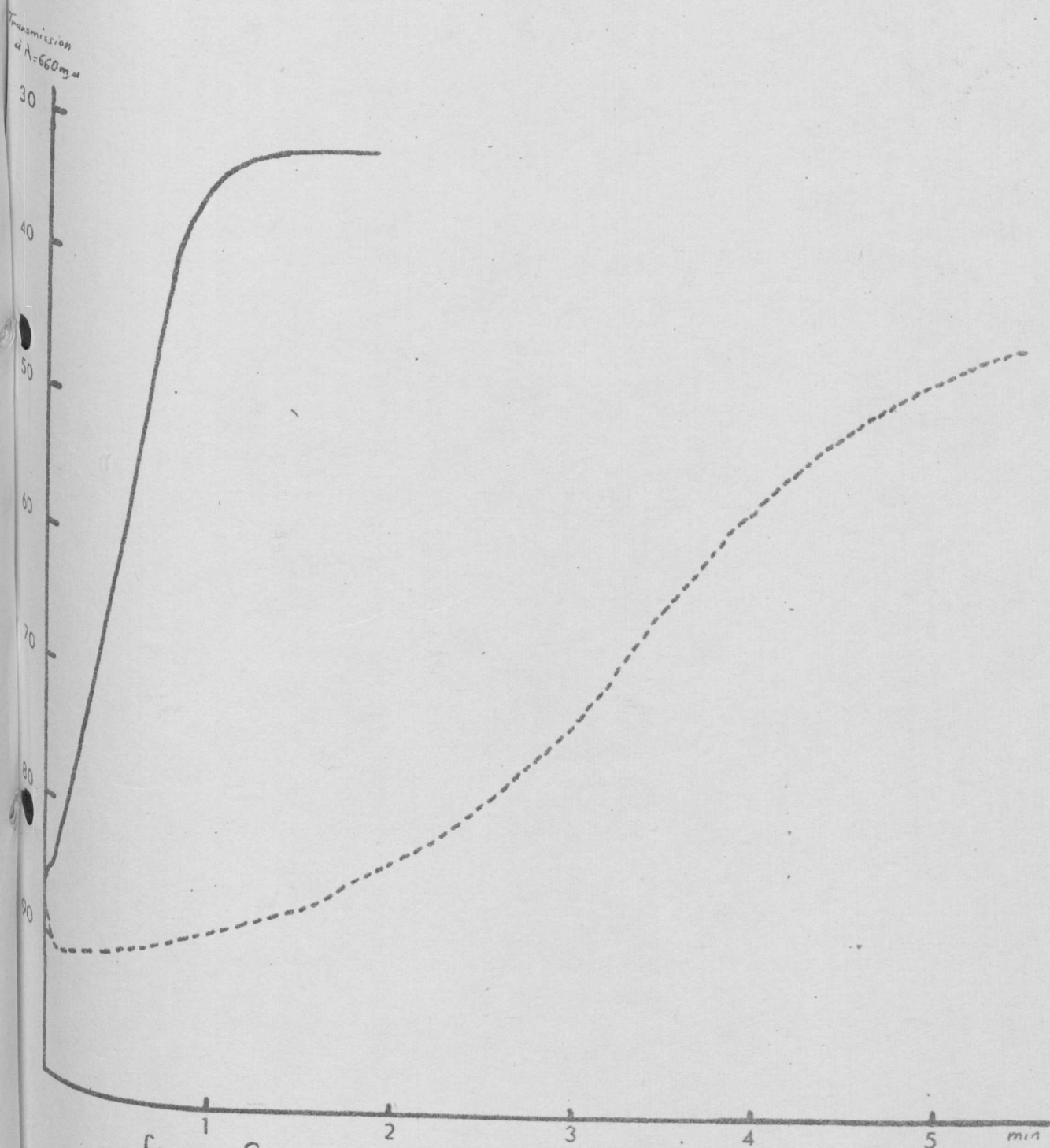


Fig V: Superprécipitation de solution d'actomyosine en milieu  
 KCl 0,15M Tris HCl 0,02M pH: 7,2 MgCl<sub>2</sub> 10<sup>-3</sup>M ATP 2.10<sup>-6</sup>M  
 — 2 jours post mortem  
 - - - 8 " " "