

B8

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTION DE LA  
CATHEPSINE D SUR CERTAINES STRUCTURES MUSCULAIRES  
MYOFIBRILLES ET COLLAGENE

-----

KOPP J. et VALIN C.  
Station de Recherches sur la Viande  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
THEIX - 63 - SAINT-GENES-CHAMPANELLE

INTRODUCTION

L'importance et le rôle de la protéolyse au cours de l'évolution *post mortem* du muscle sont sujets à controverses (GOLL *et al.*, 1970).

En fait aucune preuve expérimentale ne semble avoir été apportée qui prouve une action des protéases musculaires sur les protéines myofibrillaires et le collagène au cours de la maturation de la viande. Ainsi PENNY (1968) a mis en évidence qu'en absence d'enzymes hydrolytiques (myofibrilles bien lavées) les dégradations caractéristiques qui affectent la strie Z au cours de la maturation ne se produisaient pas, alors que FUKAZAWA YASUI (1967) n'ont pas observé par microscopie électronique aucune altération des stries Z après incubation de myofibrilles avec des préparations partiellement purifiées de cathepsine D.

Nous rapportons ici les premiers résultats obtenus dans l'étude de l'action de la cathepsine D sur la structure myofibrillaire et le collagène du muscle de bovin.

°  
° °

TAB. I

MATERIEL ET METHODE

Préparation de la cathepsine D

La cathepsine D est préparée à partir de la rate et du muscle de bovin (Méthode de préparation à publier).

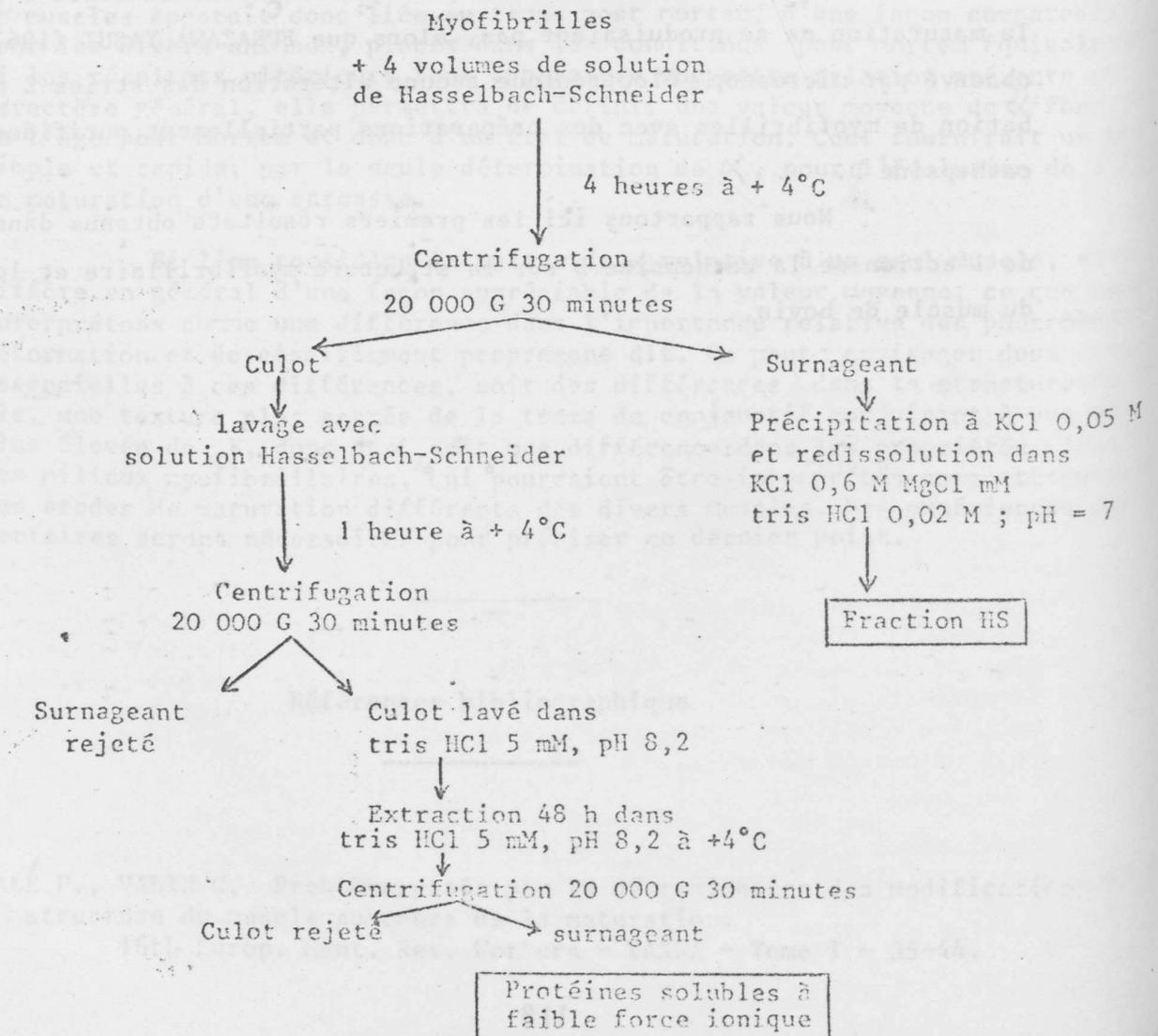
L'extraction de la cathepsine D de rate est effectuée à partir d'un homogénat de rate préalablement congelée-décongelée et la purification fait appel aux techniques de précipitation acide-précipitation acétonique, chromatographie sur carboxyméthylcellulose, DEAE Sephadex A 50 et filtration moléculaire.

La cathepsine D du muscle est préparée à partir d'un mélange mitochondries-"lysosomes". L'enzyme est libérée par incubation du mélange précédent à 37°C en présence de triton X 100. La purification fait appel aux mêmes techniques chromatographiques que dans l'extraction à partir de la rate.

Préparation des myofibrilles

Les myofibrilles sont préparées à partir du muscle *rectus abdominis* de boeuf selon la méthode de PERRY et GREY (1956).

Extraction des protéines myofibrillaires



Les protéines solubles à faible force ionique et pH 8,2 sont fractionnées selon la méthode de S. EBASHI, F. EBASHI (1965) par précipitation au sulfate d'ammonium en deux fractions, les protéines précipitables entre 0 et 22,5 g/100 ml et 22,5 à 32,5 g/100 ml de  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)$ .

#### Electrophorèse analytique

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines solubles à faible force ionique et pH alcalin est réalisée selon la méthode de RAMPTON *et al.* (1971).

#### Préparation du collagène

##### 1) Collagène musculaire total

Du collagène intramusculaire de *Longissimus dorsi* et *Pectoralis profundus* de veaux de 3 mois ainsi que du collagène épimysial du même muscle *Longissimus dorsi* ont été préparés selon une méthode précédemment décrite (KOPP, 1970).

##### 2) Collagène soluble

Deux types de fractions solubles ont été préparées :

- du collagène acido soluble extrait à + 4°C pendant 48 heures à pH 3,5 en présence de tampon acétate ( $\Gamma/2 = 0,5$ ) à raison de 200 ml pour 1 g de tissu sec.
- du collagène soluble dénaturé extrait à 65°C pendant 2h30 à pH 5, dans le même rapport d'extraction : 20 ml de tampon acétate ( $\Gamma/2 = 0,5$ ) pour 100 mg de tissu sec.

#### Solubilisation hydrothermique du collagène

L'action enzymatique sur le collagène intact est étudiée par la détermination du collagène solubilisé pendant la phase d'incubation (échantillons de 100 mg de substrat) puis par la solubilité hydrothermique du résidu d'incubation à la température de 80°C pendant 2 h 30 en présence de 40 ml de solution isotonique (0,9 % NaCl).

Les fractions solubles sont évaporées à sec et, de même que la fraction insoluble résiduelle, sont mises à hydrolyser en présence de 60 ml d'HCl, 6N en vue de la détermination de leur teneur en hydroxyproline par une méthode dérivée de celle de BERGMAN-LONLEY (1963).

#### Analyse électrophorétique du collagène soluble

L'étude qualitative des modifications du substrat soluble en présence d'enzymes est effectuée par électrophorèse sur gels de polyacrylamide selon la méthode de NAGAI (1964) modifiée par l'utilisation d'un gel unique à 7,5 % d'acrylamide. L'analyse quantitative des résultats a été réalisée par planimétrie des densitogrammes obtenus par la lecture des gels à 5500 Å après coloration à l'Anido-Schwarz).

I - ACTION DE LA CATHEPSINE D SUR LA STRUCTURE MYOFIBRILLAIRE

Pour mettre en évidence une action éventuelle de la cathepsine D sur la structure myofibrillaire, nous avons incubé des myofibrilles avec l'enzyme à différents pH et nous avons observé par rapport à des myofibrilles témoins les solubilités des différentes fractions myofibrillaires.

Le tableau I rapporte l'influence d'une incubation des myofibrilles avec la cathepsine D sur la solubilité des protéines extractibles par la solution de Hasselbach-Schneider (fraction H S).

ANIMAL N°	pH d'incubation des myofibrilles					
	5,0		5,2		5,5	
	Témoin	avec enzyme	Témoin	avec enzyme	Témoin	avec enzyme
1			241	331		
2			312	342		
3			450	510		
4	-	348			340	372
5	420	555			510	550
6					450	332
7					460	425

TABLEAU I - Solubilités exprimées en mg de protéine pour 10 g de muscle incubation des myofibrilles 40 heures à 18°C.

Les mesures ont porté sur des myofibrilles préparées *post rigor mortis* (animaux 1 à 4) et *ante rigor mortis* (animaux 5 à 7).

Quantitativement, l'incubation des myofibrilles en présence d'enzyme entraîne une augmentation de solubilité par rapport aux témoins dans le cas de myofibrilles préparées *post rigor mortis*. Dans le cas de myofibrilles préparées immédiatement après l'abattage (1 heure *post mortem*) et incubées à pH 5,5 il n'en est pas de même à l'exception de l'animal n° 5 pour lequel on enregistre des résultats analogues à ceux obtenus avec les 4 premiers animaux.

Parallèlement à ces différences quantitatives on enregistre des différences d'ordre qualitatif en ce qui concerne la nature des fractions extraites. D'une façon générale la fraction HS obtenue après incubation des myofibrilles avec l'enzyme contient un pourcentage très inférieur de protéines qui ne précipitent pas à KCl 0,15 M, pH 7.

Le tableau II rapporte les résultats des solubilités obtenues à pH 8,2 en milieu de faible force ionique (tris HCl 5 mM) après extraction avec la solution de Hasselbach-Schneider de la majeure partie de la myosine.

ANIMAL N°	pH d'incubation des myofibrilles					
	5,0		5,2		5,5	
	Témoin	avec enzyme	Témoin	avec enzyme	Témoin	avec enzyme
1			93	128		
2			104	127		
3			136	180		
4	278	313			275	305
5	242	247			278	247
6					206	175
7					233	200

TABLEAU II - Solubilités exprimées en mg de protéines pour 10 g de muscle

En ce qui concerne ce groupe de protéines on enregistre des résultats de solubilité différents selon que l'enzyme a été incubée avec des myofibrilles préparées *ante rigor mortis* ou *post rigor mortis*. Dans ce dernier cas on peut noter dans toutes les conditions de pH d'incubation utilisées une augmentation de solubilité. Le fractionnement par le sulfate d'ammonium de ces protéines nous a permis de constater que toutes les variations de solubilité enregistrées par rapport aux témoins semblent affecter essentiellement la fraction précipitée à 22,5 g/100 ml de  $SO_4 (NH_4)_2$ .

Qualitativement même dans le cas de myofibrilles *ante rigor mortis* l'incubation en présence d'enzymes affecte la composition des différentes fractions comme l'indique la figure I qui rapporte les électrophorogrammes de l'animal n° 6.

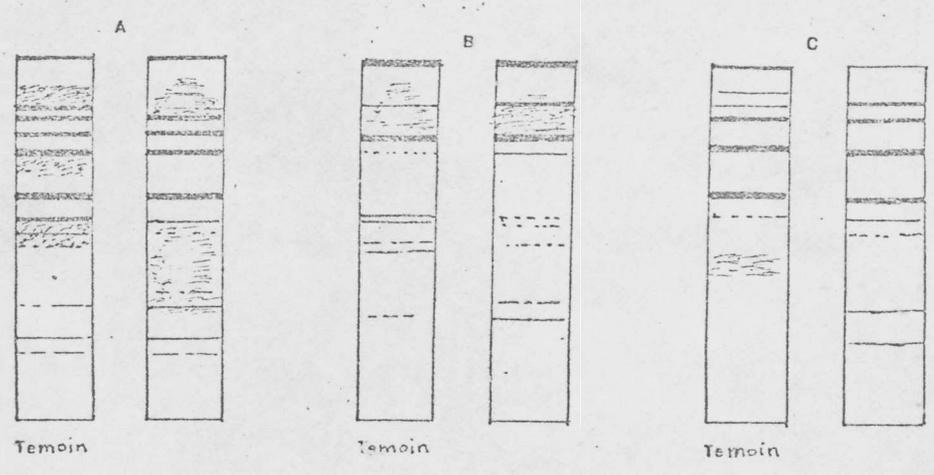


Fig. I - Electrophoregrammes :

- a) Protéines extractibles à pH 8,2, tris HCl 5 mM
- b) Fraction précipitée à 22,5 g/100 ml de  $SO_4 (NH_4)_2$
- c) Fraction précipitée entre 22,5 et 32,5 g/100ml  $SO_4 (NH_4)_2$

De plus il faut noter que les électrophorogrammes réalisés après incubation à pH 5 et 5,5 de myofibrilles *ante et post rigor mortis* présentent une grande analogie dans la répartition des bandes ce qui traduit une similitude dans l'action de l'enzyme même si quantitativement nous avons enregistré des différences de solubilité.

II - ACTION DE LA CATHEPSINE D SUR LE COLLAGÈNE

21 - Action des enzymes lysosomales musculaires sur le collagène total

L'activité spécifique cathepsine D du culot lysosomal aux pH d'incubation était respectivement de 0,098 et 0,051 à pH 5,5 et 3,5. 10 ml de ces solutions ont été mis à incuber avec 50 mg de collagène musculaire de veau de 3 mois pendant 40 h. à 37°C, à pH 5,5 et 3,5.

Les résultats portés sur le tableau III traduisent l'effet des enzymes lysosomales sur le collagène fibrillaire intact de différentes localisations anatomiques.

		pH 5,5			pH 3,5		
		37°C/40h	80°C/2h30		37°/40h	80°C/2h30	
			Filtrat	Soluble		Insoluble	Filtrat
<i>Longissimus dorsi</i> endomysium	Témoin	0	22.80	77.20	3.79	27.48	63.73
	+ Enzymes*	0	26.65	73.35	14.83	22.53	62.64
<i>Pectoralis prof.</i> endomysium	Témoin	0	19.64	80.36	2.16	19.57	78.27
	+ Enzymes*	0	22.51	77.49	13.11	10.37	76.52
<i>Longissimus dorsi</i> épimysium	Témoin	0.23	63.35	36.42	57.55	29.61	12.84
	+ Enzymes*	0.25	79.11	20.64	89.11	6.55	4.54

TABLEAU III - Action des enzymes lysosomales de muscle de bovin sur le collagène musculaire de veau de 3 mois : - Résultats exprimés en hydroxyproline soluble % de l'hydroxyproline totale.

Enzymes\* : Activité totale (cathepsine D) par échantillon de 100 mg de collagène : 1,07 à pH 5,5 et 0,60 à pH 3,5.

A pH 5,5 les filtrats d'incubation ne contiennent pas d'hydroxyproline et la présence d'enzymes entraîne une augmentation de la solubilité hydrothermique à 80°C de l'ordre de 3-4 % pour le collagène intramusculaire (endomysium) et de 15 % pour le collagène épimysial.

A pH 3,5 les filtrats d'incubation témoins contiennent de l'hydroxyproline, le collagène a subi une légère dénaturation pendant l'incubation, et il apparaît que le collagène épimysial est particulièrement sensible à cette dénaturation. Dans ces conditions, la présence d'enzymes accroît de 11 % la libération d'hydroxyproline pendant l'incubation pour les deux types de collagène endomysial et de 31 % dans le cas de l'épimysium. A l'inverse la solubilité du résidu d'incubation à 80°C est abaissée en présence d'enzymes mais le bilan global montre que l'hydroxyproline totale solubilisée à 37°C et à 80°C représente dans tous les cas une fraction plus importante du collagène total en présence d'enzymes par rapport aux témoins.

Il semble qu'une fraction importante du collagène solubilisé au cours de l'incubation avec enzymes à 37°C corresponde à la fraction labile à 80°C dans le témoin.

22 - Action de la cathepsine D de rate sur le collagène total

Lorsque le même substrat fibrillaire est mis à incuber en présence de cathepsine D purifiée (extrait de rate) à pH 5,5 et 3,5, il subit des modifications comparables à celles enregistrées en présence du culot de lysosomes à pH 5,5, mais comme il apparaît sur le tableau IV, les effets à pH 3,5 sont sensiblement moins importants.

		pH 5,5			pH 3,5		
		37°C/16h	80°C/2h30		37°C/16h	80°C/2h30	
		Filtrat	Soluble	Insoluble	Filtrat	Soluble	Insoluble
Témoin	-	0	27.70	72.30	1.50	26.20	72.30
	+ cystéine <sup>**</sup>	0	30.00	70.00	3.00	28.70	68.30
+ Cath.D <sup>z</sup>	-	0	29.09	70.91	1.50	28.58	69.92
	+ cystéine <sup>**</sup>	0	32.92	67.08	5.80	32.35	62.35

TABLEAU IV - Action de la cathepsine D (rate) sur le collagène intramusculaire de veau de 3 mois (*Pectoralis profundus*). Résultats exprimés en hydroxyproline soluble % de l'hydroxyproline totale.

Cath.D<sup>z</sup> : activité totale cath.D par échantillon de 100 mg de collagène : 7,56  
 cystéine<sup>\*\*</sup> : concentration : 5.10<sup>-3</sup>M.

La présence de cystéine (5.10<sup>-3</sup>M) dans le milieu d'incubation semble agir directement sur la stabilité hydrothermique du collagène puisque le résidu insoluble final est abaissé de 72,3 à 70,0 % à pH 5,5 et de 72,3 à 60,3 % à pH 3,5. L'action de la cathepsine D est peu affectée par la cystéine, celle-ci diminue de 1,5 % la fraction insoluble à pH 5,5 et de 3,5 % cette même fraction à pH 3,5. Il semble donc que la cystéine joue dans ce cas un rôle indirect en agissant sur la stabilité du substrat proprement dit.

23 - Action de la cathepsine D sur les formes solubles du collagène

Dans une première expérience nous avons étudié l'action de la cathepsine D extraite à partir de rate et de muscle sur le collagène soluble dénaturé.

Les résultats obtenus à pH 3,5 sont reproduits sur la figure 2(abc)

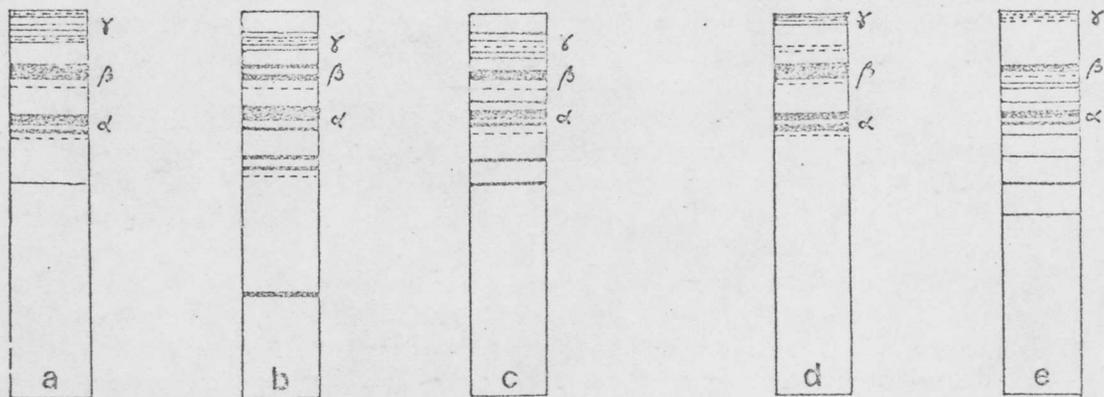


Fig. 2 - Action de la cathepsine D sur les formes solubles du collagène à pH 3,5.

Substrat : collagène épimysial de *Longissimus dorsi* de veau de 3 mois incubation 30°/16 h.

- Substrat dénaturé :
- a - témoin collagène
  - b - collagène + cath. D de rate (Activité totale 0,59/mg de collagène)
  - c - collagène + cath. D de muscle (Activité totale 0,13/mg de collagène)
- Substrat natif :
- d - témoin collagène
  - e - collagène + cath. D de rate (Activité totale = 0,05/mg de collagène).

BS

Il apparaît qu'à pH 3,5 la présence de cathepsine D entraîne une importante dépolymérisation du substrat dénaturé qu'il s'agisse de cathepsine de rate ou de muscle. Les résultats quantitatifs obtenus par planimétrie des densitogrammes correspondant aux échantillons a et b de la figure 2 sont rapportés dans le tableau V.

FRACTIONS	$\gamma$	$\beta$	$\alpha$	Pré $\alpha$
Témoin	45,25	28,13	21,85	2,00
+ Cath. D <sup>x</sup>	10,95	20,00	30,60	38,45

TABLEAU V - Action de la cathepsine D (rate) sur le collagène soluble dénaturé à pH 3,5 (fractions en % du total soluble)

Cath. D<sup>x</sup> : activité totale/mg collagène soluble = 0,59.

Outre une dépolymérisation du substrat, il apparaît des composés migrant plus rapidement que les éléments constitutifs du substrat témoin. La cathepsine musculaire, en dépit d'une activité totale plus faible dans nos échantillons entraîne des modifications du substrat dénaturé (figure 2, c) et en particulier une dépolymérisation au niveau des  $\gamma$  et  $\beta$ .

Lorsque la cathepsine D est mise en présence de substrat natif, non dénaturé, à pH 3,5 la composition qualitative du substrat est également altérée (fig. 2, d et e), il apparaît en particulier une série de composés migrant plus rapidement que les  $\alpha$ . L'action de la cathepsine D s'avère moins importante dans nos conditions d'étude, sur le substrat natif par rapport à un substrat dénaturé. Cependant l'apparition de composés dont la migration électrophorétique est plus importante que celle des  $\alpha$  montre que les chaînes polypeptidiques du collagène présentent des sites sensibles à la cathepsine D.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Le but de ce travail préliminaire était de vérifier si potentiellement la cathepsine D pouvait avoir une action aux pH de la viande sur certains éléments de la structure du muscle. Jusqu'à présent aucune action de la cathepsine D n'a pu être mise en évidence, au niveau des constituants de l'appareil myofibrillaire (BODWELL, PEARSON, 1964) (MARTINS, WHITAKER, 1963). Contrairement à ces auteurs et compte-tenu des observations de PENNY (1969) nous avons étudié l'action de cette enzyme, non sur des protéines purifiées, mais sur la structure myofibrillaire intégrale et dans ces conditions les résultats obtenus prouvent la possibilité d'une action de cette enzyme sur ces structures. Il convient de noter que dans nos conditions d'incubation l'activité cathepsine D totale utilisée était selon les incubations 5 à 10 fois supérieure à l'activité totale existant dans le poids de muscle équivalent à la quantité de myofibrilles utilisées comme substrat. De plus dans le muscle un pourcentage relativement faible de l'activité totale est libéré *post mortem*. Par contre dans le cas des incubations du complexe hydrolytique total avec le collagène l'activité totale utilisée était du même ordre de grandeur que l'activité totale présente dans la quantité de muscle correspondant à la masse de collagène utilisée comme substrat.

Les études de la maturation *post mortem* du collagène de SHARP (1963) et HERRING *et al.* (1967) aboutirent à des conclusions présentant une grande analogie avec nos premiers résultats. En effet SHARP (1963) montre que l'extractibilité de l'hydroxyproline à 37°C du muscle de bovin ne varie pas au cours d'une très longue maturation aseptique à cette température. Or à pH 5,5 avec la cathepsine D ou le complexe hydrolytique total, nos filtrats d'incubation ne contiennent pas d'hydroxyproline. Comme HERRING *et al.* (1967) nous avons enregistré une augmentation de la solubilité hydrothermique en présence d'enzyme.

Lorsque le pH est abaissé à 3,5, la température de dénaturation du substrat est abaissée et l'action de la cathepsine D et du complexe hydrolytique total est sensiblement plus importante qu'à pH 5,5. Les résultats obtenus

avec le substrat soluble montrent également que sa dénaturation facilite sa dégradation.

Enfin, bien que la cathepsine D présente une activité sur les fractions faiblement polymérisées du collagène à pH 3,5, lorsque nous comparons son action à celle du complexe hydrolytique total, il semble que le potentiel hydrolytique du culot lysosomal soit plus important que celui de la cathep. D seule à l'égard du collagène.

° °

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- BERGMAN I., LOXLEY R., 1963 Anal. chem. 35, 12
- BODWELL C.E., PEARSON A.M., 1964 J. Food Sci., 29, 602-606.
- EBASHI S., EBASHI F., 1965 The journal of biochem. 59, 7-12.
- FUKAZAWA T., YASUI T., 1967 Biochem. Biophys. acta, 140, 534.
- GOLL D.E. *et al.*, 1970 in the Physiology and Biochemistry of muscle as a food. The University of Wisconsin Press.
- HERRING H.K., CASSENS R.G., BRISKEY E.J., 1967 J. Food Sci., 32, 534
- KOPP J., CHARPENTIER J., SALE P., 1970 XVth European Meeting Of Meat Research Workers. VARNA : August 30/September 30, 1970.
- MARTINS C., WHITAKER J.R., 1968 J; Food Sci., 33, 59-69.
- NAGAI Y., GROSS J. PIEZ K.A., 1964 Anal. N.Y., Acad.Sci. 121 (2) 494.
- PENNY I.F., 1968 J. Sci. Food. Agric. 19, 513-523.
- PERRY S.V., GREY T.C., 1956 Biochem J; , 64, 181.
- RAMPTON *et al.*, 1970 J. Food Sci., 35, 510-513
- SHARP J.G., 1963 J. Sci. Food Agr. 7, 468.