

EFFECT OF A NEUTRAL MUSCLE PROTEINASE ON THE MYOFIBRILLAR STRUCTURE

AHMED OUALI - CHRISTIAN VALIN

I.N.R.A. - THEIX - 63110 BEAUMONT - FRANCE

The aim of the research was to specify the nature of the enzymatic process of meat aging during storage.

The study of the activity of the partially purified enzyme on myofibrils indicates an optimum pH of 7,6. The enzyme remains active during storage of meat but its activity at meat pH is only 20 % of the activity at pH 7,6.

The optimal temperature is + 34°C and the activation energy between + 15°C and + 35°C rises up to 10 700 Cal. gm<sup>-1</sup>.

The incubation of the enzyme with myofibrils impairs the Z line structure, releases some proteins of the thin filaments and more generally increases the solubility of the myofibrillar proteins in high ionic strength solutions.

The enzyme activity depends on the degree of contraction of the myofibrils.

The effect of this enzyme on meat aging during storage is discussed.

ETUDE DE L'ACTION D'UNE PROTEASE NEUTRE MUSCULAIRE SUR LA STRUCTURE MYOFIBRILLAIRE

AHMED OUALI - CHRISTIAN VALIN

I.N.R.A. - THEIX - 63110 BEAUMONT - FRANCE

L'action, sur la structure myofibrillaire, d'une protéase neutre musculaire activée par le calcium (CASF) a été entreprise dans le but de préciser la nature des mécanismes enzymatiques de la maturation de la viande en cours de conservation.

L'étude des caractéristiques de l'activité de l'enzyme partiellement purifiée sur des myofibrilles indique un pH optimum d'activité de 7,6. L'enzyme est stable dans la viande en cours de conservation à l'état réfrigéré mais son activité au pH de la viande ne dépasse pas 20 % de l'activité au pH optimum.

La température optimale d'activité est de 34°C. L'énergie d'activation entre 15 et 35°C s'élève à 10 700 Cal. gm<sup>-1</sup>.

L'incubation de l'enzyme avec des myofibrilles entraîne d'une part la solubilisation de certaines protéines du filament fin et d'autre part une augmentation de la solubilité en milieu de force ionique élevée des protéines myofibrillaires. Enfin l'activité de l'enzyme dépend du degré de contraction des myofibrilles.

## B 3:2

### WIRKUNG EINER NEUTRALEN MUSKELPROTEASE AUF DIE MYOFIBRILLARSTRUKTUR

AHMED OUALI - CHRISTIAN VALIN

I.N.R.A. - THEIX - 63110 BEAUMONT - FRANCE

Die Wirkung einer durch  $\text{Ca}^{++}$  beschleunigten neutralen Muskelprotease (CASF) wurde an Myofibrillen geprüft in Beziehung zur Fleischreifungsvorgänge während der Lagerung.

Der optimale pH-Wert für die Aktivität des teilweise gereinigten CASF an Myofibrillen bestimmt ist 7,6. Während der Fleischlagerung bleibt die Aktivität unverändert, liegt jedoch bei Fleisch-pH-Wert unter 20 % der bei optimalen pH-Wert-gemessenen Aktivität.

Die optimale Temperature für den CASF ist  $34^{\circ}\text{C}$ . Zwischen  $15^{\circ}\text{C}$  und  $35^{\circ}\text{C}$  steigt die Aktivationsenergie auf  $10700 \text{ cal/gm}$ .

Die Inkubation von Myofibrillen mit dem CASF bringt eine Erhöhung der Löslichkeit der Myofibrillarproteine während bestimmte Proteine der dünnen Faser ganz löslich werden.

Die Aktivität des CASF hängt endlich auch von der Sarcomerlänge ab (Muskel Verzerrungsgrad).

### ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НЕЙТРАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ ПРОТЕАЗЫ НА МИОФИБРИЛЯРНУЮ СТРУКТУРУ

Ахмед Уали, Кристиан Вален

Национальный научно-исследовательский агрономический институт / I.N.R.A. /  
THEIX - 63110 - Beaumont - FRANCE

Исследовано действие одной нейтральной мышечной протеазы, активированной кальцием /CASF/ на миофибрилярной структуре с целью уточнения природы энзиматических механизмов созревания мяса в процессе консервирования.

Изучение характеристики активности частично очищенного энзима на миофибрилях показывает, что оптимум его активности находится при  $\text{pH}=7,6$ . В мясе энзим является стабильным во время его хранения в охлажденном виде, но при этих условиях / pH мяса / его активность не превосходит 20 % активности при оптимальном pH.

Оптимальная температура действия -  $34^{\circ}\text{C}$ . Энергия активирования в температурном интервале с  $15^{\circ}\text{C}$  -  $35^{\circ}\text{C}$  повышается на  $10700 \text{ Cal. gm}^{-1}$ .

Инкубирование энзима с миофибрилями приводит с одной стороны к растворению некоторых протеинов тонких филаментов, а с другой стороны к повышению растворимости миофибрилярных протеинов в среде с повышенной ионной силой.

Активность энзима зависит еще от степени контрахирования миофибриля.

ETUDE DE L'ACTION D'UNE PROTEASE NEUTRE MUSCULAIRE SUR LA STRUCTURE MYOFIBRILLAIRE

AHMED OUALI - CHRISTIAN VALIN

I.N.R.A. - THEIX - 63110 BEAUMONT - FRANCE

Certaines transformations dont les muscles sont le siège après la mort des animaux provoquent un attendrissage progressif de la viande en cours de stockage. L'évolution de la structure musculaire durant cette période de maturation se traduit, entre autre, au niveau de la structure contractile, par une disparition des stries Z (DAVEY-GILBERT, 1967 ; STROMER et al., 1967 ; HENDERSON et al., 1970). La vitesse de dégradation de ces stries Z qui dépend de la température de conservation et du pH de la viande est stimulée par le calcium (NAKAMURA, 1972) et ralentie par l'EDTA (DAVEY-GILBERT, 1969). Réemment, BUSH et ses Collaborateurs (1972) ont isolé à partir de muscles de lapin une enzyme activée par les ions  $Ca^{++}$  à laquelle ils ont donné le nom de calcium-activated sarcoplasmic factor (CASF).

Afin d'essayer de préciser la nature des mécanismes enzymatiques de la maturation de la viande, nous avons entrepris l'étude des caractéristiques physico-chimiques du CASF et des modifications que subit le système contractile après incubation avec cette enzyme.

MATERIEL ET METHODESPréparation du CASF

L'extrait brut (crude CASF) est préparé selon la méthode de GOLL et al. (1973) par précipitation isoélectrique et fractionnement au sulfate d'ammonium à partir d'un extrait des muscles des pattes arrières et des longs dorsaux de lapin. Ces muscles sont prélevés très rapidement après la mort de l'animal et homogénéisés dans une solution d'EDTA 4 mM pH 7,6. L'enzyme est ensuite partiellement purifiée par filtration sur une colonne de Séphadex G 200. Des précisions concernant cette purification seront données ultérieurement.

Détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire du CASF est déterminé par filtration sur une colonne de Séphadex G 200 (2,5 cm x 96 cm). Cette colonne est étalonnée préalablement par chromatographie de 3 protéines de poids moléculaire connue qui sont : la  $\gamma$ -globuline de boeuf (PM : 140 000), la serumalbumine bovine fraction IV de NBC (PM : 68 000) et la myoglobine de muscle de cheval (PM : 18 000).

L'éluant est le même que celui utilisé pour l'éluion de l'enzyme lors de la purification. Il est composé d'EDTA 2 mM,  $KHCO_3$  2mM, MCE (Mercaptoéthanol) 0,1 %, pH 7,05.

Préparation des myofibrilles

Les myofibrilles sont préparées, pour des raisons de commodité, à partir du muscle "Rectus abdominis" de boeuf prélevé 24 heures post mortem. Après extraction, pendant 2 heures, des protéines sarcoplasmiques dans 5 volumes de la solution suivante : KCl 0,05 M, Imidazole 0,02 M, oxalate de potassium 0,01 M pH 7,4, les myofibrilles sont lavées 2 fois de suite dans 5 volumes de KCl 0,05 M. La suspension est passée dans un tamis pour éliminer le collagène et le culot de la dernière centrifugation est homogénéisé dans environ 3 volumes d'une solution de glycérol 50 %. La suspension myofibrillaire concentrée ainsi obtenue est conservée en chambre froide à - 10°C.

Mesure de l'activité enzymatique

Une aliquote de la suspension myofibrillaire précédente est repris dans du tampon tris-acétate 0,1 M, KCl 0,1 M, MCE 5 mM. Le pH de ce tampon sera précisé pour chaque expérience. A 2 ml de cette suspension, nous ajoutons 1 ml de la solution enzymatique plus ou moins diluée, du  $CaCl_2$  (dans le cas de l'essai) ou de l'EDTA (dans le cas du témoin) à la concentration finale de 5 mM et nous incubons pendant 3 mn à une température qui sera indiquée pour chaque expérience. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA. Le mélange réactionnel est centrifugé 6 mn à 5000 g puis filtré et nous mesurons la densité optique du surnageant à 280 nm. L'activité sera exprimée en  $\Delta DO$  à 280 nm, différence entre l'absorption du témoin et celle de l'essai.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'electrophorèse des protéines passées en solution après action du CASF est réalisée sur un gel de polyacrylamide 6 % contenant du SDS 0,1 %, du Tris 0,03 M et de l'acide borique 0,05 M à pH 8,5. Le tampon d'electrophorèse circulant composé de SDS 4 %, MCE 0,1 %, acide borique 0,05 M et tris 0,03 M permet la migration des protéines sous une intensité de 1,5 mA par tube. Une fois fixées dans une solution aqueuse d'éthanol 30 %, acide acétique 5 %, les protéines sont colorées au Bleu de Coomassie. Après décoloration, les gels sont lus à l'aide d'un photomètre Chromoscan muni d'un filtre de 620 nm.

Dosage des protéines

Le dosage des protéines myofibrillaires est réalisé par la méthode du biuret préalablement standardisée par celle de KJELDAHL. Pour les autres déterminations, nous avons utilisé la méthode de LOWRY et al. (1951).

RESULTATSPurification du CASF par filtration sur gel

A partir de l'extrait brut (crude CASF) concentré par pervaporation à + 5°C, l'enzyme est partiellement pu-

## B 3:4

rifiée par filtration sur une colonne de Séphadex G 200 de 2,5 x 96 cm. Deux cents à trois cents mg de protéines sont ainsi éluées par la solution suivante : EDTA 2mM,  $\text{KHCO}_3$  2 mM, MCE 0,1 % pH 7,05.

Comme nous le montre le profil d'élu-tion (figure 1), nous séparons ainsi 3 fractions. Le CASF qui correspond à la dernière fraction est élué à partir de 224 ml. Cette étape nous permet d'obtenir une solution enzymatique 2 à 3 fois plus active qu'au stade précédent. Cette préparation est ainsi conservée à pH 7,5 et à une température de + 2°C à + 4°C.

### Détermination du poids moléculaire

L'étalonnage de la colonne de Séphadex G 200 (2,5 x 96 cm) réalisé avec les substances standards citées précédemment nous a permis de tracer le diagramme reliant la valeur du rapport  $V_e/V_0$  où  $V_e$  est le volume d'élu-tion des différentes protéines et  $V_0$  le volume mort au logarithme du poids moléculaire (figure 2).

Pour le CASF, le rapport  $V_e/V_0$  est de 1,54. Cette valeur correspond à un poids moléculaire de 110 000 daltons ce qui corrobore les résultats de DAYTON et al. (1974).

### Propriétés catalytiques du CASF

#### Détermination de la concentration saturante de substrat

Nous voyons (Figure 3) que le substrat devient saturant à partir d'une concentration de 6 mg/ml. Pour les expériences qui suivent, nous avons choisi un rapport enzyme/substrat de 1/120, rapport pour lequel l'activité croît de façon linéaire lorsque la concentration d'enzyme augmente. Notons que pour l'extrait brut, nous arrivons à saturation pour une concentration en protéines myofibrillaires nettement plus faible (rapport enzyme/substrat) = 1/20).

Nous constatons par ailleurs que l'activité est relativement faible puisque la  $\Delta DO$  à 280 nm ne dépasse pas 0,050 unité. Cela est probablement lié à l'état du substrat utilisé pour cette expérience. En effet, il est très difficile d'obtenir des préparations de myofibrilles rigoureusement identiques d'une fois à l'autre même en respectant toujours les conditions de broyage et d'homogénéisation établies. Nous avons ainsi pu remarquer que l'activité variait en fonction de l'âge de la préparation et surtout de la taille des fragments de myofibrilles. Ainsi, il nous a été impossible de déterminer les constantes  $K_m$  et  $V_m$  de l'enzyme vis à vis de ce substrat puisque les valeurs obtenues n'étaient valables que pour une préparation donnée à l'instant précis de la manipulation et cela bien que les conditions expérimentales soient les mêmes d'une fois à l'autre.

#### Influence de la concentration du calcium sur l'activité protéolytique du CASF

La principale caractéristique du CASF est qu'il ne présente aucune activité protéolytique en l'absence d'ions  $\text{Ca}^{++}$  dans le milieu réactionnel. L'activité devient optimale dès que la concentration atteint 1 mM (Figure 4) ce qui confirme les résultats rapportés par différents auteurs (BUSH et al., 1972 ; SUZUKI et GOLL, 1974). Au-delà de cette concentration, l'activité ne semble plus évoluer contrairement aux résultats de SUZUKI et GOLL (1974). Nous reviendrons plus en détail sur ce dernier point mais signalons dès maintenant que le procédé employé pour arrêter la réaction est essentiel dans la mesure de cette activité protéolytique.

L'inhibition totale de l'activité protéolytique du CASF par des agents susceptibles de complexer le calcium comme l'EDTA ou l'EGTA laisse penser que cet ion bivalent intervient directement dans la liaison enzyme-substrat.

Pour éviter qu'il soit un facteur limitant, le calcium sera toujours présent dans les essais à la concentration finale de 5 mM.

#### Influence du pH

##### pH optimum d'activité

Le CASF présente un optimum d'activité à pH 7,6 (Figure 5). De part et d'autre de ce pH, l'activité décroît très rapidement contrairement aux résultats de SUZUKI et GOLL (1974). Pour ces auteurs, l'activité du CASF ne serait pas affectée par des modifications de pH intervenant entre pH 6 et pH 7,5.

Selon nos résultats, l'activité au pH de la viande en cours de conservation ne dépasse pas 20 à 30 % de l'activité au pH optimum. L'action du CASF sur la structure myofibrillaire sera donc dans ces conditions très ralentie.

#### Influence du pH sur la stabilité du CASF

L'enzyme purifiée est stockée à différents pH pendant 4 jours à + 4°C. L'activité est testée sur toutes les aliquotes pour deux temps de conservation (5 heures puis 4 jours).

Selon les résultats obtenus (Figure 6), à pH 7,5, l'activité du CASF ne paraît pas affectée par le vieillissement de la préparation. Par contre, au pH de la viande (pH 6) elle diminue très rapidement puisque, après 5 heures, l'activité ne dépasse pas 40 % de l'activité à pH 7,5. Au cours du temps, cette chute de l'activité semble s'estomper. En effet, après 4 jours de stockage, l'activité correspond à environ 30 % de la valeur trouvée au pH optimum de conservation.

Influence de la températureTempérature optimum d'activité

L'optimum d'activité se situe à une température de 34°C, ce qui corrobore les résultats de PENNY et al. (1974). En effet, ces auteurs testent l'enzyme à 35°C tandis que GOLL et al. (1973) d'une part et SUZUKI et GOLL (1974), d'autre part, travaillent à une température de 25°C (Figure 7)

Energie d'activation du CASF

L'énergie d'activation de cette enzyme a été déterminée graphiquement (Figure 8) pour des températures d'incubation variant entre 15°C et 35°C. Les vitesses d'hydrolyse du substrat sont portées dans le tableau 1.

Température °C	15	20	25	30	35
Vitesse $\Delta$ DO à 280 nm	0,110	0,130	0,176	0,240	0,320

Tableau 1 : Influence de la température sur la vitesse d'hydrolyse du substrat

Les myofibrilles (12 mg/ml) sont incubées avec l'enzyme (0,06 mg/ml) en présence de tampon tris-acétate 0,1 M, KCl 0,1 M, MCE 5 mM, pH 7,5 et de CaCl<sub>2</sub> 5 mM pendant 5 mn à 15°C, 20, 25, 30 et 35°C. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA (concentration finale 5 mM).

Nous trouvons pour le CASF une énergie d'activation de 10 700 cal gm<sup>-1</sup>. Cette valeur est 2,5 fois supérieure à celle trouvée pour la cathepsine D qui présente une énergie d'activation de 4000 cal-mole<sup>-1</sup> (DUCASTAING, 1975)

Action du CASF sur les protéines myofibrillairesNature des protéines libérées sous l'action du CASF

Les myofibrilles (15 mg/ml environ) sont incubées avec le CASF (0,1 à 0,2 mg/ml) pendant 4 heures à 30°C en présence de tampon tris-acétate 0,1 M, KCl 0,1 M, MCE 5 mM pH 7,5 et de CaCl<sub>2</sub> 5 mM. Après centrifugation du mélange réactionnel, nous procédons à l'analyse qualitative du surnageant par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Selon les résultats obtenus, l'action du CASF se traduirait par une libération d' $\alpha$ -actinine, de troponine T et de protéines qui pourraient être identifiées aux troponines I et C. En effet, nous constatons une augmentation très nette de l'intensité des bandes correspondantes aux troponines I et C ou à des composées de même poids moléculaire. La troponine T, pour sa part, semble plus affectée que les précédentes par l'action de l'enzyme puisque dans ces conditions d'incubation, elle n'apparaît pas ou en très faible quantité dans les témoins qui sont incubés en même temps que les essais en présence d'EDTA 5 mM.

Influence du CASF sur la solubilité des protéines myofibrillaires

Les myofibrilles sont incubées avec l'enzyme dans les mêmes conditions que précédemment. Après centrifugation et homogénéisation du culot dans 12 volumes d'une solution de phosphate bipotassique 0,266 M, pH 8,4, nous procédons à l'extraction des protéines myofibrillaires pendant 10 mn sous agitation. Le mélange est centrifugé pendant 20 mn à 20 000 g et les protéines sont dosées dans le surnageant. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 2.

	Protéines dans le culot en mg	Protéines extraites en mg	Protéines extraites en % des protéines de départ
Témoin	143,1	24,2	16,9 %
Essai	136,6	33,8	24,7 %

Outre la libération de certaines protéines, l'action du CASF se traduit également par une augmentation de la solubilité des protéines myofibrillaires à force ionique élevée.

Selon des critères différents, de nombreux auteurs avaient déjà mis en évidence la sensibilité des protéines myofibrillaires à l'action du CASF (GOLL et al., 1973 ; PENNY et al., 1974 ; PENNY, 1974 ; DAYTON et al., 1974 PARRISH et al., 1975).

DISCUSSION - CONCLUSION

La microscopie a permis de constater que le CASF dégradait spécifiquement les stries Z de myofibrilles ou de fibres musculaires dont la structure était intacte (EUSH et al., 1972). Rapidement, de nombreux auteurs ont rapproché l'action de cette enzyme avec la disparition des stries Z dans la viande en cours de conservation. Afin de mieux comprendre le mode d'action de celle-ci sur la structure myofibrillaire, il semblait nécessaire de mieux connaître les propriétés du CASF. Pour cela, il était indispensable de quantifier l'action de cette enzyme et ainsi de pouvoir mettre en évidence l'influence de divers facteurs déterminants dans le processus de maturation de la viande. Lors des premières expériences faites dans ce sens, nous arrêtons la réaction par addition d'EGTA qui complexe spécifiquement le calcium. L'utilisation de ce procédé conduisait à des résultats très incohérents. Nous nous sommes aperçus que l'addition d'EGTA entraînait un abaissement brutal et important du pH de 7,5 à 5,5 - 5,8 ceci, probablement à la suite d'un déplacement de l'équilibre ionique du milieu réac-

tionnel. Cette acidification provoquait la précipitation d'une partie ou de toutes les protéines libérées par l'action du CASF qui étaient éliminés ensuite lors de la centrifugation. La modification de la force ionique du tampon tris-acétate s'est révélée insuffisante de même que l'utilisation de solutions ayant un meilleur pouvoir tampon (Tampon phosphate et tris-maléate), puisque l'activité mesurée avec ces derniers était plus faible. Nous avons alors utilisé pour arrêter la réaction de l'EDTA, composé qui fixe les cations bivalents. Avec ce composé qui présente une affinité moins grande que l'EGTA pour le calcium, le milieu d'incubation s'acidifie également mais dans des proportions moindres dans les conditions de concentrations auxquelles sont utilisés le calcium et l'EDTA. Le pH atteint dans ce cas des valeurs de l'ordre de 6,7 - 6,8, valeur pour lesquelles il est possible de suivre et de quantifier avec suffisamment de précisions l'hydrolyse des myofibrilles par le CASF.

Au cours de cette investigation, nous avons constaté que pour être dans des conditions optimum d'activité, le CASF exige la présence dans le milieu d'ions  $Ca^{++}$  à une concentration de 1 mM au moins. A ce sujet, nous avons signalé que SUZUKI et GOLL (1974) rapportaient une diminution de l'activité pour des concentrations supérieures à 1 mM. Il est possible que l'abaissement du pH consécutif à l'addition d'EDTA à une concentration aussi élevée (10 mM) soit suffisamment important pour masquer en partie l'activité. Par ailleurs, à ce pH, le pouvoir tampon d'une solution de tris-HCl 0,05 M doit être faible. Le calcium jouant le rôle d'un activateur indispensable au fonctionnement de l'enzyme doit, en conséquence, être présent à une concentration saturante. Dans la cellule, il se trouve en très faible quantité puisque sa concentration ne dépasse pas 0,01 mM. Post mortem, la membrane du Reticulum sarcoplasmique perd sa capacité de fixer ce cation qui diffuse passivement en dehors des triades et la concentration intracellulaire d'ions  $Ca^{++}$  atteint 0,1 mM. A cette concentration, l'activité du CASF est très faible et ceci nous permet de penser que la dégradation des stries Z dans la viande en cours de conservation sera très lente. Toutefois, cette augmentation de la teneur en ions  $Ca^{++}$  suffirait pour que l'enzyme devienne active (DAYTON et al., 1974 ; SUZUKI et GOLL, 1974).

Parallèlement aux modifications des propriétés de la membrane du Reticulum sarcoplasmique, le muscle s'acidifie jusqu'à atteindre un pH de 5,5 - 5,6. La chute du pH sera plus ou moins rapide selon la vitesse de réfrigération du muscle qui dépendra des conditions de réfrigération mais aussi de la localisation des muscles sur la carcasse. Ce dernier point peut entraîner des variations considérables de la vitesse de la glycohydrolyse dans les carcasses de gros bovins (TARRANT, 1975). Pour le CASF, l'activité est optimale à pH 7,6 et décroît très rapidement de part et d'autre de cette valeur. Au pH de la viande, elle ne dépasse pas 20 à 30 % de l'activité au pH optimum. Nous avons vu par ailleurs que la stabilité de l'enzyme semble fortement affectée en cours de conservation à un pH voisin de celui de la viande en période de maturation. Toutefois, nous pouvons penser d'une part que l'abaissement assez progressif du pH entrainera, si c'est le cas, une perte d'activité peut être moins importante et certainement plus lente et d'autre part que le milieu intracellulaire assurera une meilleure protection à l'enzyme que la solution employée dans le cas présent. En ce qui concerne la température, l'optimum d'activité se situe à 34°C. Le CASF présente entre 24 et 34°C un coefficient de température ( $Q_{10}$ ) de 1,77. Au dessous de 25°C, ce coefficient semble constant et égal à 1 ce qui signifie que l'activité de cette enzyme ne sera pas considérablement affectée par les variations de température tout au moins entre 10 et 25°C. Nous n'avons pas mesuré l'activité à des températures inférieures à 10°C. Au cours de cette investigation, nous avons remarqué que l'activité du CASF variait selon le degré de contraction des myofibrilles. Post mortem l'état de contraction des fibres sera défini entre autre par la vitesse de réfrigération du muscle de sorte que la température pourra donc influencer indirectement l'activité de cette enzyme. Le CASF présente par ailleurs une énergie d'activation relativement élevée (2,5 fois celle de la cathepsine D) ce qui signifie que son activité sera très faible aux basses températures.

Finalement post mortem, l'activité du CASF, absolument dépendante de la présence d'ions  $Ca^{++}$  libre, ne pourra se manifester que dans un milieu dont les caractéristiques de pH et de température sont très éloignées des conditions optimales d'activité de l'enzyme. Ceci pourrait expliquer la disparition très lente des stries Z en cours de maturation. Compte tenu de la cinétique d'évolution du pH post mortem, l'action du CASF doit par ailleurs se manifester avant celle des enzymes lysosomales et rien n'empêche de penser qu'elle se poursuit en cours de conservation.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- EUSH W.A., STROMER M.H., GOLL D.E., SUZUKI A., 1972 J. Cell. Biol., 52, 367.
- DAVEY C.L. and GILBERT K.V., 1967 J. Fd Technol., 2, 57.
- DAVEY C.L. and GILBERT K.V., 1969 J. Fd Sci., 34, 69.
- DAYTON W.R., GOLL D.E., STROMER M.H., REVILLE W.J., ZERCE M.G. and RUBSON M.H., 1974 Proteases and Biological Control, in "Cold Spring Harbor Series on Cell Proliferation, vol. II", Cold Spring Harbor Laboratory, NEW YORK (in press).
- DUCASTAING A., 1975 Thèse n° 473, AO - Université de BORDEAUX (France).
- GOLL D.E., STROMER M.H., OLSON D.G., DAYTON W.R., SUZUKI A. and ROBSON M.H., 1973 Proceeding Meat Industry Research Conference, American Meat Institut Foundation, CHICAGO, ILLINOIS.
- HENDERSON D.W., GOLL D.E., STROMER M.H., 1970 Am. J. Anat., 128, 117.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J., 1951 J. Biol. Chem., 193, 265.
- NAKAMURA R.J., 1972 Agric. Fd Chem., 20, 1167.
- PARRISH F.C., OLSON D.G., GOLL D.E. and STROMER M.H., 1975 XXIe Réunion Européenne des Chercheurs en Viande BERNE - SUISSE.

PENNY I.F., 1974 J. Sci. Fd Agric., 25, 1273.

PENNY I.F., VOYLE C.A. and DRANSFIELD E., 1974 J. Sci. Fd Agric., 25, 703.

STROMER M.H., GOLL D.E. and ROTH L.E., 1967 J. Cell Biol., 34, 431.

SUZUKI A. and GOLL D.E., 1974 Agr. Biol. Chem., 38(11), 2167.

TARRANT P.J.V., 1975 XXIIe Réunion Européenne des Chercheurs en Viande, BERNE - SUISSE.

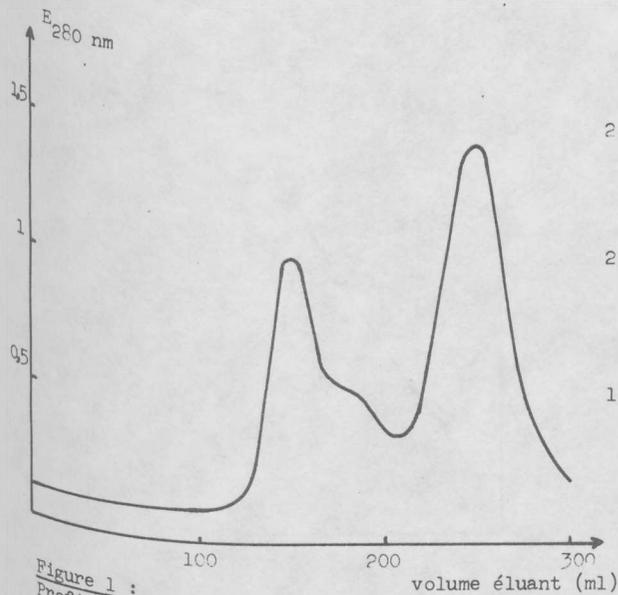


Figure 1 : Profil d'élution du CASF sur une colonne de Sephadex G 200 par une solution de  $\text{KHCO}_3$  2mM, EDTA 2mM, MCE 0,1 M pH 7,05 à 13,5 ml/h.

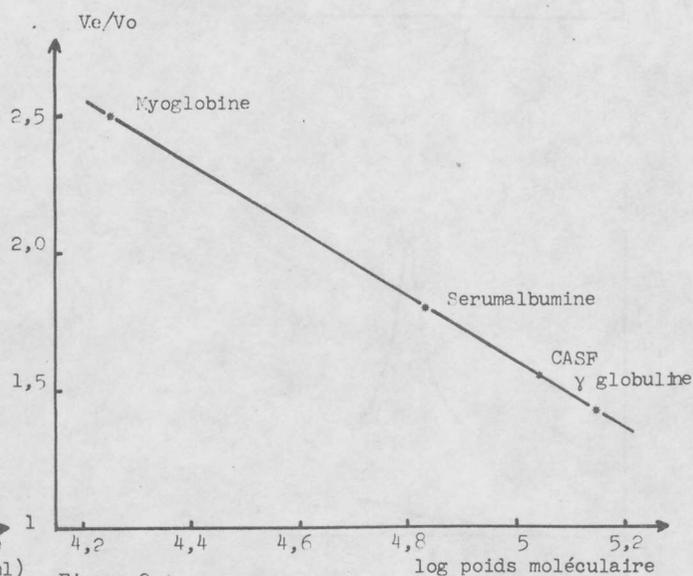


Figure 2 : Détermination graphique du poids moléculaire du CASF à partir de cette droite établie par étalonnage de la colonne de Sephadex G 200 (2,5 x 96 cm) avec les 3 protéines suivantes :  $\gamma$  globuline de boeuf (PM : 140 000), serumalbumine bovine (PM : 68 000) et myoglobine de cheval (PM : 18 000).

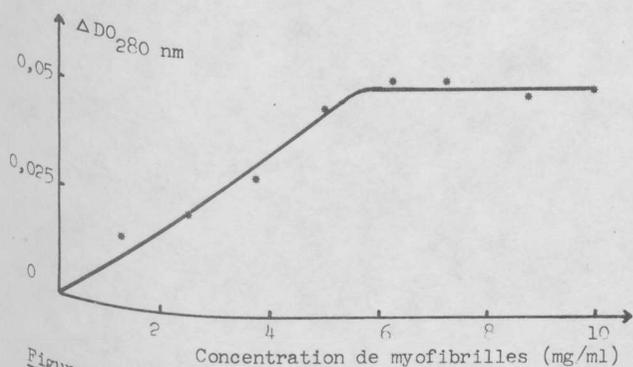


Figure 3 : Influence de la concentration de protéines myofibrillaires sur l'activité du CASF. Les myofibrilles sont incubées à différentes concentrations avec l'enzyme (0,06 mg/ml) en présence de tampon tris-acétate 0,1 M, KCl 0,1 M, MCE 5mM, pH 7,6 et de  $\text{CaCl}_2$  5mM pendant 3 mn à 30°C. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA (concentration finale 5mM).

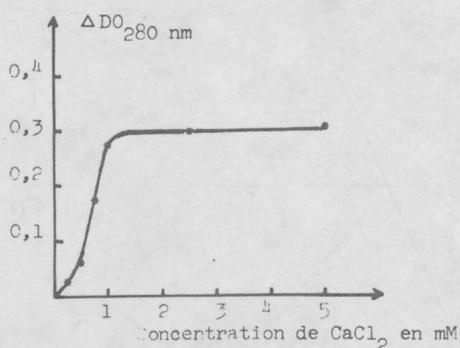


Figure 4 : Influence de la concentration en ion  $\text{Ca}^{++}$  sur l'activité du CASF. Les myofibrilles (11,4 mg/ml) sont incubées avec l'enzyme (0,08 mg/ml) en présence de tampon tris-acétate 0,1 M, KCl 0,1 M, MCE 5 mM, pH 7,5 et de différentes concentrations de  $\text{CaCl}_2$  pendant 5 mn à 30°C. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA (concentration finale 5 mM).

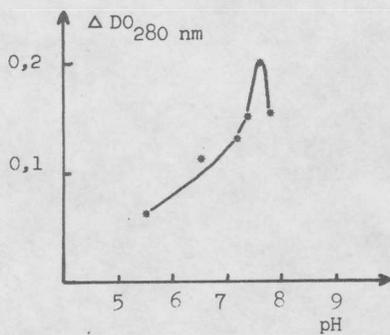


Figure 5 :

Influence du pH sur l'activité protéolytique du CASF. Les myofibrilles (12,1 mg/ml) sont incubées avec l'enzyme (0,1 mg/ml) en présence de tampon tris-acétate 0,1 M, KCl 0,1 M, MCE 5mM et  $CaCl_2$  5 mM aux pH indiqués pendant 3 mn à 30°C. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA (concentration finale 5 mM).

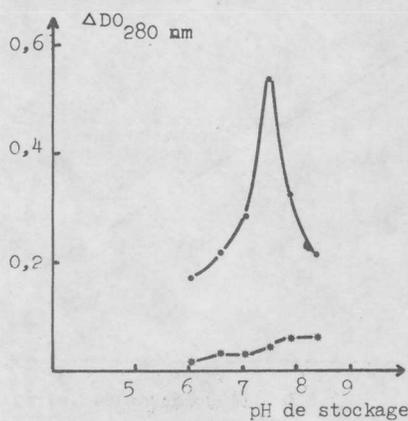


Figure 6 :

Influence du pH sur la stabilité du CASF. Les myofibrilles (10,7 mg/ml) sont incubées avec l'enzyme (0,09 mg/ml) stockée aux pH indiqués en présence de tampon tris-acétate 0,1 M, KCl 0,1 M, MCE 5 mM pH 7,6 et  $CaCl_2$  5 mM pendant 3mn à 30°C. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA (concentration finale 5 mM)

- Stockage pendant 5 h. à + 4°C
- Stockage pendant 4 jours à + 4°C

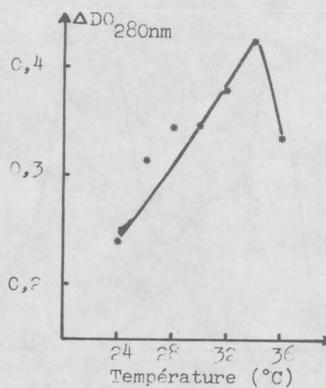


Figure 7 :

Influence de la température sur l'activité protéolytique du CASF. Les myofibrilles (12 mg/ml) sont incubées avec l'enzyme (0,1 mg/ml) à différentes températures en présence de tampon tris-acétate 0,1M KCl 0,1 M, MCE 5mM, pH 7,6 et de  $CaCl_2$  5 mM pendant 3 mn. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA (concentration finale 5mM).

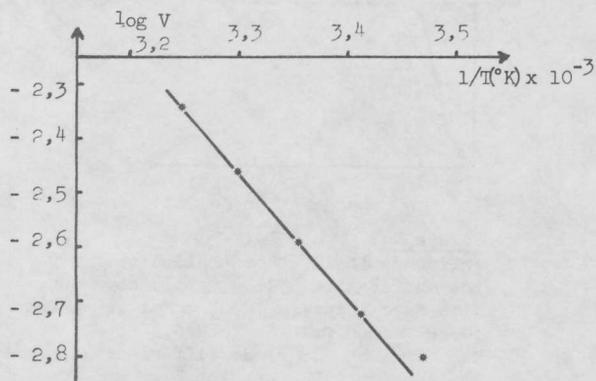


Figure 8 :

Représentation graphique de la loi d'ARRHENIUS pour des températures allant de 15 à 35°C