

RELATION ENTRE TYPE METABOLIQUE ET RESPIRATION MUSCULAIRE

M. RENERRE, A. TALMANT.

Avec la collaboration technique de R. LABAS

Institut National de la Recherche Agronomique - THEIX - 63110 BEAUMONT - FRANCE

La consommation d'oxygène de la viande en état de post-rigor mortis est la résultante de plusieurs facteurs que sont :

- la respiration tissulaire due aux mitochondries
- l'oxygénation du pigment de la viande pour former l'oxymyoglobine
- la dissolution de l'oxygène dans les fluides tissulaires à faible pression d'oxygène
- l'oxydation des lipides
- et/ou la contamination bactérienne

La consommation d'oxygène par les mitochondries est fonction essentiellement de l'état de fonctionnement des différents systèmes enzymatiques de la chaîne respiratoire et de la disponibilité des substrats et des intermédiaires intervenant dans la réaction. On ignore encore actuellement quelle est l'importance des différents facteurs impliqués dans la diminution de la consommation d'oxygène au cours du temps p.m. (ATKINSON, 1969 - BENDALL, 1970 - DE VORE, 1974 - GIDDINGS, 1977). Cependant il est bien établi, depuis les premières observations de BROOKS (1929) et de GEORGE et STRATMAN (1952), que la diminution de la consommation d'oxygène au cours du temps post-mortem explique, pour une part importante, l'accroissement de la couche d'oxymyoglobine en surface de la viande conservée en présence d'air ou d'oxygène, et qui donne à celle-ci sa couleur rouge vif attrayante pour l'acheteur. BENDALL (1972) a calculé l'épaisseur de cette couche de myoglobine oxygénée qui varie avec le muscle étudié.

Nous avons mesuré la consommation d'oxygène à partir d'homogénats musculaires de mouton, en ramenant celle-ci à une quantité connue de mitochondries, et le type métabolique des muscles a été déterminé.

Le but de notre travail était de vérifier si la consommation d'oxygène appréciée par ce biais permettait une identification des muscles similaire à celle obtenue à l'aide des tests biochimiques couramment utilisés.

I - MATERIELS ET METHODES1 - Matériel animal

Six moutons de race Limousine ont été abattus au C.R.Z.V. à l'âge de onze mois.

Trois muscles ont été choisis : Longissimus dorsi, Tensor fasciae latae, Supra spinatus, à la fois d'après leur site, leur fonction et leurs différences présumées du point de vue types métaboliques.

2 - Mesure de la teneur en pigments héminiques

Elle a été réalisée selon la méthode d'HORNSEY (1956).

3 - Mesure de la teneur en cytochromes (a + a₃)

Cette méthode a été mise au point par CHANCE en 1954 et développée par CHEAH (1971). 5 g de muscle sont hachés finement aux ciseaux dans quelques cm³ de KCl 150 mM au froid. Après homogénéisation au Potter on centrifuge à 10 000 g pendant dix minutes à + 4°C. Le résidu est récupéré, lavé avec du KCl 150 mM, homogénéisé et centrifugé. Après centrifugation le résidu est homogénéisé dans du tampon servant à la consommation d'oxygène et le volume final est de 25 ml.

- Par la technique du spectre de différence, entre l'état réduit et l'état oxydé, on dose la quantité de cytochromes a + a₃, à partir de cet homogénat, à la longueur d'onde de 602 nm à l'aide du spectrophotomètre Aminco double faisceau - double longueur d'onde DW 2A.

4 - Mesure de la respiration d'homogénéats musculaires

5 grammes de viande sont broyés pendant 30 secondes au Polytron dans 20 ml de tampon. La composition du tampon est la suivante : saccharose 0,25 M, tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, KCl 0,15 M, MgCl₂ 0,005 M, EDTA 0,5 mM, tampon phosphate de sodium 0,025 M pH 7,5.

La mesure de la consommation d'oxygène se fait par polarographie à l'aide d'une électrode de CLARK, branchée à un appareil Radiometer, à la température de 35°C sous agitation constante. On introduit dans la cellule de mesure 0,5 ml d'homogénat musculaire + 7 ml de tampon pH 7,5 décrit précédemment. Différents substrats ont été testés : Pyruvate + Malate (1 M), succinate (1 M) et ascorbate + TMPD (0,5 M).

5 - Mesures de l'activité glycolytique

L'activité glycogène phosphorylase (a + b) est mesurée en présence d'AMP par la technique de SATO et al. (1973).
L'activité lactico-déshydrogénase est mesurée d'après la méthode décrite par ANSAY (1974).

II - RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Respiration des homogénats musculaires

La respiration des homogénats musculaires est mesurée entre trois et six heures après la mort de l'animal. La température utilisée est de 35°C car nous sommes au voisinage de la température physiologique et BENDALL (1972) a montré que la réaction à 35°C était beaucoup plus importante qu'à 25°C du fait d'une enthalpie d'activation élevée. Le pH de l'homogénat est voisin de 7,0, valeur qui correspond à une oxydation maximum du substrat (BENDALL, 1972). CHEAH en 1971 a montré que le passage du pH de 5,7 à 7,2 entraînait une augmentation des oxydations mitochondriales de 50 à 75 %.

En présence de succinate, le contrôle respiratoire est voisin de 2 tandis qu'il n'est que légèrement supérieur à 1 en présence d'ascorbate (Figure 1). Ceci pourrait être dû en particulier à la présence dans l'homogénat musculaire de lipides et d'acides gras insaturés (SCHEWE et al., 1974) ou à l'absence d'ATP ou de BSA dans le milieu d'extraction (MAKINEN et al., 1968). BENDALL en 1972, à partir de broyats de muscles de bovins a montré également que l'addition d'ADP seul n'avait pratiquement aucun effet sur le contrôle respiratoire mesuré par la méthode au WARBURG.

L'addition de pyruvate + malate, substrats agissant au niveau du site I, n'entraîne aucune augmentation de la respiration. Cette observation corrobore celle que nous avons faite à partir de mitochondries de bovins partiellement purifiées (Résultats non publiés). Ce phénomène pourrait s'expliquer par un mauvais état de la membrane mitochondriale (DURAND, communication personnelle).

Quel que soit le muscle étudié, la consommation d'oxygène des homogénats musculaires est beaucoup plus importante en présence d'ascorbate + TMPD qu'en présence de succinate. Cela pourrait être dû au fait que l'ascorbate est accessible au niveau du site III et que le succinate traverse moins facilement la membrane mitochondriale et pourrait subir une dismutation comme c'est le cas en anaérobie (GIDDINGS, 1977).

Quand on compare la consommation d'oxygène des différents homogénats, on observe toujours, quel que soit le substrat utilisé, le classement suivant : Longissimus dorsi > Supra spinatus > Tensor fasciae latae. Le test t par paires montre que le muscle Longissimus dorsi consomme plus que le muscle Supra spinatus ($t = 3,16$; $n = 9$; $S < 2\%$) (Tableau 1).

	Longissimus dorsi	Supra spinatus	Tensor fasciae latae
(a + a ₃) en nmoles/g. viande	8,38 ± 2,04 n = 4	6,47 ± 0,15 n = 4	3,93 ± 0,22 n = 4

Tableau 2 : Quantité de cytochromes (a + a₃) des muscles étudiés
Content in Longissimus dorsi, Supra spinatus and Tensor fasciae latae muscles cytochromes (a + a₃)

La quantité de cytochromes (a + a₃) des muscles Longissimus dorsi et Supra spinatus, est voisine bien que le test t par paires indique une différence significative ($S < 2\%$).

Comme l'indique le tableau 3 il existe une corrélation assez étroite entre la respiration des homogénats musculaires et la quantité de cytochromes (a + a₃). Ces résultats sont en bon accord avec ceux de BRIAND (1979) qui avait montré, à partir de muscles d'agneaux, des différences d'activité cytochrome oxydase et un classement des muscles similaire au nôtre.

Succinate	Succinate + ADP	Ascorbate	Ascorbate + ADP
r = 0,60	r = 0,85	r = 0,68	r = 0,76
n = 11	n = 11	n = 11	n = 11

Tableau 3 : Corrélation respiration / (a + a₃)
Correlation coefficients between oxygen uptake and quantity of cytochromes (a + a₃)

Si nous ramenons la consommation d'oxygène des homogénats musculaires à la teneur en cytochromes (a + a₃) correspondante, le classement entre muscles se transforme : Tensor fasciae latae > Supra spinatus > Longissimus dorsi.

Ceci pourrait laisser supposer que les mitochondries des muscles n'ont pas toutes la même activité et qu'en particulier celles du muscle Tensor fasciae latae (muscle présumé blanc rapide) respirent plus que celles du muscle Longissimus dorsi (muscle présumé rouge rapide). Des études par microscopie électronique pourraient fournir des renseignements utiles quant à des différences éventuelles dans l'ultrastructure des mitochondries considérées.

	Longissimus dorsi	Supra spinatus	Tensor fasciae latae
Succinate	815 ± 228 n = 6	648 ± 156 n = 6	526 ± 155 n = 6
Ascorbate + TMPD	1627 ± 228 n = 6	1420 ± 209 n = 6	1019 ± 188 n = 6

Tableau 1 : Consommation d'oxygène des homogénats musculaires en $\text{nMO}_2/\text{min.}/\text{g. viande}$
oxygen uptake of muscle homogenates in $\text{nMO}_2/\text{min.}/\text{g. meat}$

A l'aide de mitochondries isolées à partir de muscles d'agneaux, en utilisant le glutamate comme substrat, BRIAND (1979) trouve un classement des muscles identique au nôtre.

LAWRIE (1953) et MAKINEN (1968) ont mis en évidence des différences d'activité mitochondriale, pour un muscle donné, qui sont fonction de l'espèce animale étudiée. A partir de trois muscles (Longissimus dorsi, Supra spinatus, Tensor fasciae latae) de l'espèce bovine, nous observons un classement de leur activité mitochondriale différent de celui de l'espèce ovine qui semble relié à la stabilité de la couleur de la viande (Résultats à publier).

2 - Dosage de la quantité de cytochromes ($a + a_3$)

LAWRIE (1953) a montré les relations existant entre la consommation d'oxygène, l'activité cytochrome-oxydase et la quantité de cytochromes dans le muscle.

Pour CHEAH (1971) le dosage des cytochromes ($a + a_3$) permet de mieux apprécier la quantité de mitochondries dans l'homogénat que le dosage du cytochrome c qui est très sensible à la dénaturation engendrée surtout par la baisse du pH post mortem.

Comme l'indique le Tableau 2, la quantité de cytochromes ($a + a_3$) varie proportionnellement à la consommation d'oxygène des muscles étudiés, résultat qui corrobore nos observations antérieures faites à partir de muscles d'espèces différentes (RENERRE, 1978) ainsi que les observations de BALDWIN et al. (1972) faites à partir du cytochrome c.

3 - Quantité de pigments héminiques

Le dosage des pigments héminiques par la méthode d'HORNSEY donne les résultats consignés dans le tableau 4.

Longissimus dorsi	Supra spinatus	Tensor fasciae latae
15,7 ± 2,0 n = 6	14,1 ± 0,6 n = 6	8,7 ± 1,3 n = 6

Tableau 4 : Quantité de fer héminique en $\mu\text{g/g. viande fraîche}$
haeminic iron level in $\mu\text{g/g. fresh meat}$

On note une corrélation étroite entre, d'une part, la teneur en pigments héminiques et la teneur en cytochromes ($a + a_3$) : ($r = 0,91$; $n = 12$), voisine de celle signalée par LAWRIE ($r = 0,89$) ou MAKINEN et, d'autre part, la teneur en pigments et la respiration des homogénats musculaires (Tableau 5).

Succinate	Succinate + ADP	Ascorbate	Ascorbate + ADP
$r = 0,82$	$r = 0,75$	$r = 0,68$	$r = 0,75$
$n = 22$	$n = 18$	$n = 18$	$n = 18$

Tableau 5 : Coefficients de corrélation entre la respiration d'homogénats musculaires et la teneur en fer héminique.
Correlation coefficients between oxygen uptake and haeminic iron level

Il existe une relation étroite mais complexe entre consommation d'oxygène - quantité de pigments héminiques du muscle et épaisseur de la couche d'oxymyoglobine en surface de la viande, du fait en particulier de l'aptitude de la myoglobine à faciliter le courant d'oxygène dans les tissus musculaires (DE VORE, 1974)

4 - Mesure des activités glycolytiques

	Longissimus dorsi	Supra spinatus	Tensor fasciae latae
Phosphorylase a + b	341 ± 49	149 ± 16	260 ± 40
LDH basse	2941 ± 652	578 ± 108	2457 ± 436

Tableau 6 : Activités de la phosphorylase (a + b) et LDH (basse) en u.I/g de protéine phosphorylase (a + b) and LDH (low) activities in u. I/g protein

Le tableau 6 indique les activités de la phosphorylase (a + b) et de la Lactico-déshydrogénase inhibée par de basses concentrations en pyruvate. On note des valeurs élevées pour les muscles Tensor Fasciae latae et Longissimus dorsi ce qui traduit un type glycolytique (KAPLAN, 1964 ; CASSENS, 1971). On a montré par ailleurs que le muscle Tensor fasciae latae avait une faible teneur en pigment contrairement au muscle Longissimus dorsi. On peut donc en déduire que le muscle Tensor fasciae latae est un muscle blanc à contraction rapide tandis que le muscle Longissimus dorsi est un muscle rouge à contraction rapide corroborant les observations de PETER et al. (1972). LACOURT (1974), par mesures histochimiques, avait déterminé le type métabolique des muscles Longissimus dorsi et Tensor fasciae latae d'agneaux et avait abouti à des conclusions similaires. Pour le muscle Supra spinatus, l'activité des enzymes de type glycolytique est très faible tandis que la teneur en pigment est élevée : le muscle Supra spinatus est un muscle rouge à contraction lente.

Le type aérobie d'un muscle peut être représenté par sa teneur en pigments, comme l'a montré LAWRIE en 1952 ou par sa teneur en cytochromes. Par ailleurs, nous avons montré la relation étroite existant entre ces deux paramètres et la respiration des homogénats musculaires. Si nous représentons en coordonnées rectangulaires, d'une part, les activités glycolytiques et, d'autre part, les caractéristiques aérobies de ces muscles nous constatons que ceux-ci se répartissent sous forme d'un triangle caractéristique (Figures 2 et 3).

Ces résultats corroborent ceux de TALMANT et al. (1980), effectués à partir de muscle d'agneaux de différents âges, de race Limousin x Romanov x Ile de France, où l'activité métabolique musculaire avait été appréciée à l'aide de l'activité ATPasique (mode de contraction) et de la teneur en myoglobine.

CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer que la consommation d'oxygène effectuée à partir d'homogénats entiers de muscles, technique de mise en oeuvre facile, donnait des résultats très voisins de ceux obtenus à partir de mitochondries isolées.

Du fait des corrélations étroites existant avec les teneurs en fer héminique et en cytochromes ($a + a_3$), la consommation d'oxygène d'homogénats musculaires semble être un critère représentatif du type du muscle.

Nous avons confirmé les travaux précédents (TALMANT, 1979) quant à la mise en évidence d'une représentation originale des différents types métaboliques des muscles de mouton.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANGAY M., 1974 - Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 14, 171.
 ATKINSON J.L., 1974 - Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 14, 171.
 BULLWIN J.L., FOLLETT M.J., RATCLIFF P.W., 1969 - Nature 223, 5213.
 BENDALL K.M., KLINKERFUSS G.M., TERJUNG R.L., MOLE P.A., HOLLOSZY J.O., 1972 - Amer. J. Physiol. 222 (2), 373-374.
 BERTLAND J.R., TAYLOR A.A., 1972 - J. Sci. Fd Agric. 23, 707-719.
 BROOKS J., 1979 - Thèse de Docteur-Ingénieur. Université de CLERMONT-FERRAND.
 CHANCE B., 1929 - Biochem. J., 23, 1391.
 CHEAH K.S., 1954 - Science 120, 767.
 CHEAH K.S., 1971 - FEBS LETT. 19(2), 105-108.
 DE VORE D.P., 1971 - Bioenerg. 2, 85-92.
 GEORGE P., SOLBERG M., 1974 - J. Food Sci. 39, 22.
 GIDDINGS G.G., STRATMANN C.J., 1952 a - Biochem. J., 51, 103.
 HOBANSEY G.G., 1977 - C.R. Food Sci. Nut. 9(1), 81.
 JACQUET H.C., 1956 - J. Sci. Food Agric. 7, 534.
 LAMPIE A., ARNAL M., 1974 - 20th Eur. Meet. Meat Res. Wor. DUBLIN (15-20/9).
 LAMPIE R.A., 1953 - Biochem. J. 55, 298.
 PETER J.B., CHUAN-PU LEE, 1968 - Arch. Biochem. Biophys. 126, 75.
 SAITO K., BARNARD R.J., EDGERTON V.R., GILLESPIE C.A., STEMPER K.E., 1972 - Biochem. 11, 2627.
 SCHWE T., WEINHOUSE S., MORRIS H., 1973 - Adv. Enz. Res. 11, 343.
 TALMANT A., LUDWIG P., RAPOPORT S., 1974 - FEBS LETTERS 46(1), 39.
 TALMANT A., 1979 - Thèse d'Université. Université de CLERMONT-FERRAND.
 TALMANT A., BRIAND M., MONIN G., DURAND R., 1980 - 26th Eur. Meet. Meat Res. Wor. COLORADO SPRINGS

CONSOMMATION D'OXYGÈNE

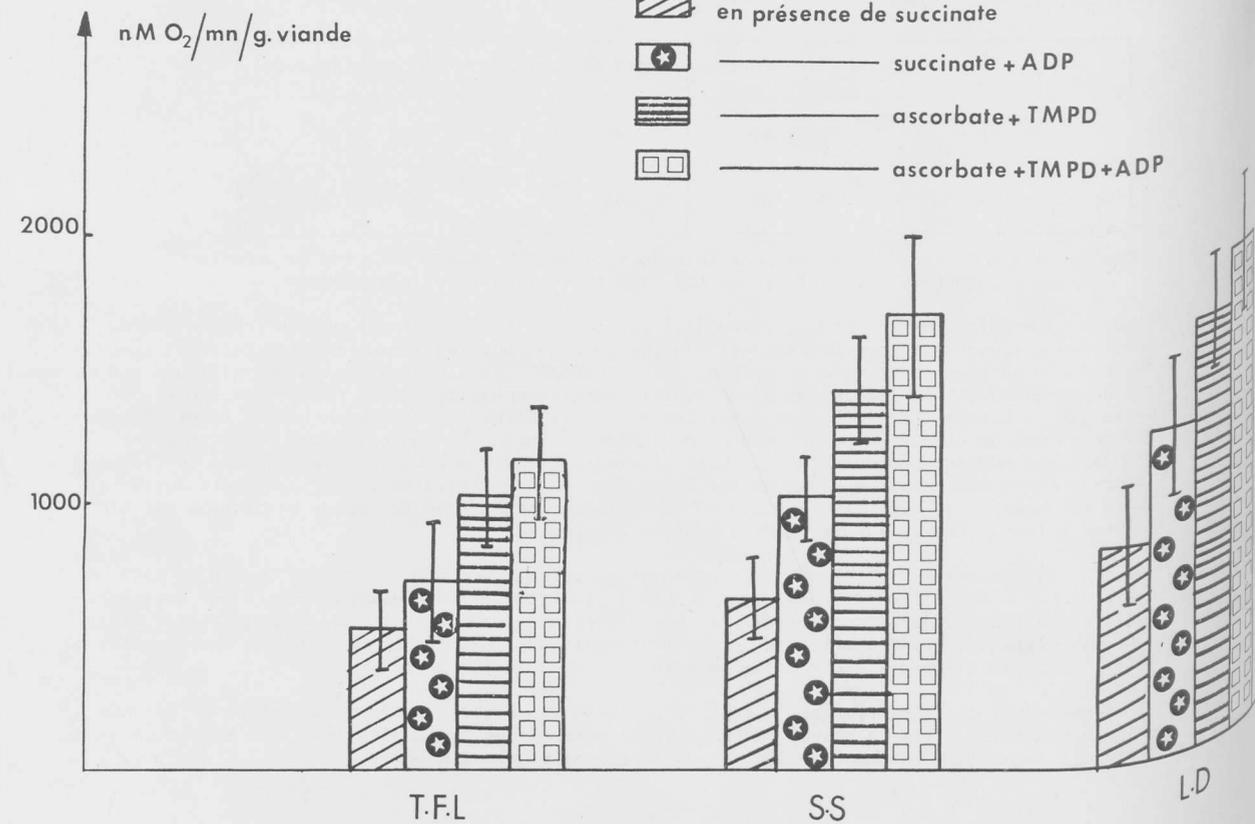


Figure 1 : Consommation d'oxygène des homogénats musculaires en présence de différents substrats
Oxygen uptake of muscle homogenates with different substrates

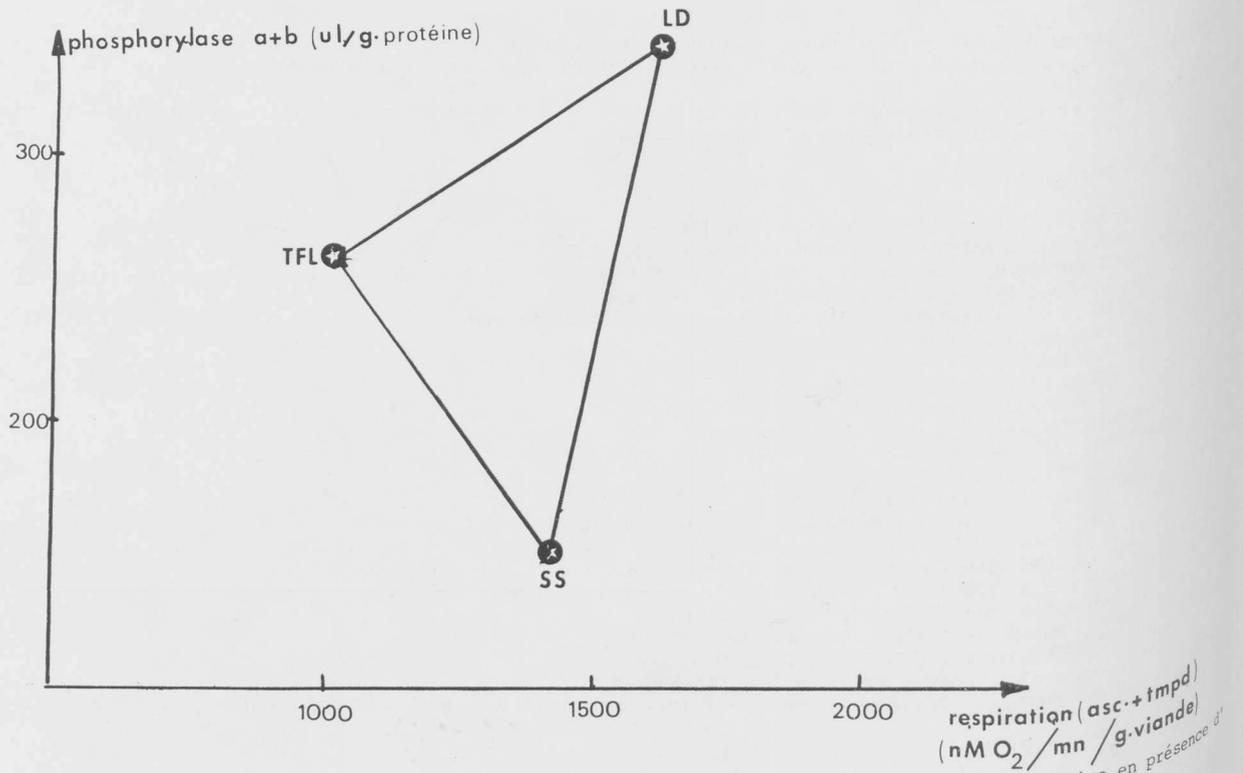


Figure 2 : Relations entre l'activité de la phosphorylase (a + b) et la respiration musculaire en présence d'ascorbate + TMPD
Relationships between phosphorylase (a + b) activity and oxygen uptake (ascorbate + TMPD) of muscle homogenates

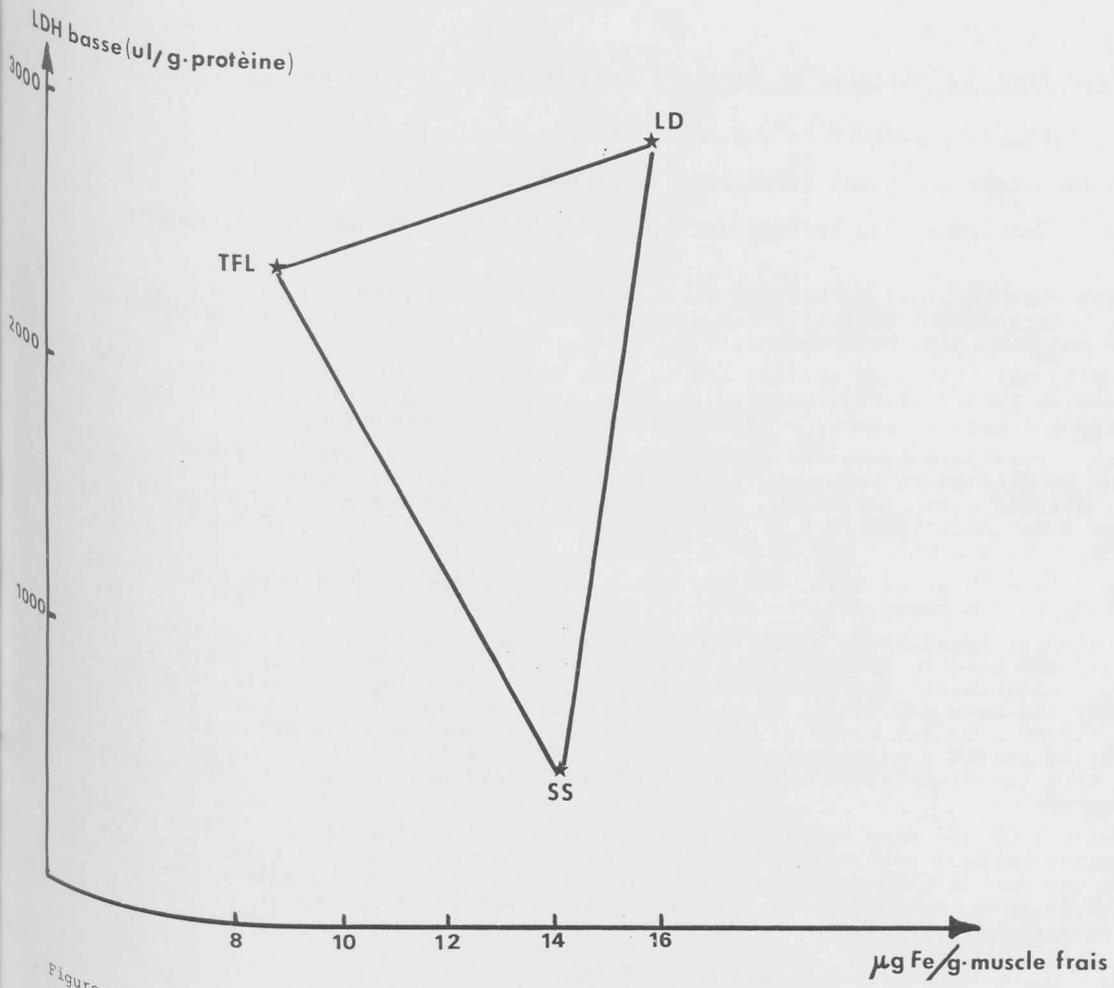


Figure 3 : Relations entre l'activité de la LDH (basse) et la teneur en fer héminique des muscles
Relationships between LDH activity (slow) and haeminic iron levels