A:30

STABILITE THERMIQUE ET CHIMIQUE DU COLLAGENE DE BOVINS NORMAUX ET CULARDS DE 2 ANS

J. KOPP et M. BONNET

Institut National de la Recherche Agronomique, Theix, 63110 BEAUMONT, France

INTRODUCTION

Il est actuellement bien admis que la caractéristique la plus marquée des bovins culards est leur déficit généralisé en collagène dans tous les tissus et compartiments conjonctifs, en particulier au niveau des muscles (LAMOUROUX et al., 1964, BOCCARD et al., 1967...) ce qui confère à la viande de ces animaux une tendreté supérieure à celle des animaux normaux. Si l'on considère l'âge des animaux, il apparaît que si les différences quantitatives de collagène sont déjà significatives chez le veau de 3 mois, les propriétés de stabilité ne diffèrent pas sensiblement comparées aux animaux témoins de même âge (TALMANT, 1972). A l'âge de 3 ans et pour des animaux de même race (Charolais), BOCCARD et al. (1967) ont mis en évidence une plus grande solubilité thermique du collagène intramusculaire chez les culards.

Les observations concernant les autres tissus conjonctifs de ces bovins culards ont porté essentiellement sur la peau qui est plus fine et représente une masse totale significativement moins importante chez le culard qui est aussi connu pour la plus grande fragilité de son squelette et de ses articulations.

Pour préciser les différences qualitatives du collagène nous avons étudié, sur 2 lots d'animaux correspondant à un type de production classique à savoir des mâles de 24 mois, le comportement du collagène musculaire (intramusculaire et epimysium) et celui de tissus riches en collagène comme le tendon et le derme pour déterminer si la différence de stabilité déjà décrite au niveau des muscles se retrouve également dans d'autres tissus. Cette étude a fait partie d'un travail pluridisciplinaire couvrant des aspects zootechniques, métaboliques et biochimiques dont quelques résultats ont été présentés au séminaire organisé par la CEE du 10 au 12 Juin à Toulouse (France) et en particulier les premières études concernant les liaisons de réticulation du collagène musculaire (BAILEY et al., 1980). Ces analyses ont été effectuées sur les mêmes échantillons que ceux utilisés dans cette étude.

I - MATERIEL ET METHODES

- les animaux expérimentaux

Deux lots d'animaux charolais mâles, un lot à conformation normale que nous appellerons témoins et un lot à musculature hypertrophiée que nous appellerons culards, ont été sélectionnés sur la base de leurs caractéristiques zootechniques et anatomiques : poids, âge, vitesse de croissance, développement musculaire ; le but recherché étant la plus grande homogénéité possible dans les 2 lots. Finalement, 5 animaux ont été retenus dans le lot témoin d'un âge moyen à l'abattage de 756 jours (valeurs extrêmes 743 et 767 jours) et d'un poids moyen des carcasses froides de 432,6 ± 31,0 kg.

Le lot culard comprenait 6 animaux abattus à 753 jours (valeurs extrêmes 738 et 772 jours) d'un poids moyen de carcasses froides de 446, 7 ± 51,2 kg. Les tissus ont été prélevés 48 heures post-mortem, conservés à + 2° jusqu'au stade 7 jours post mortem, puis préparés et analysés.

- préparation des tissus conjonctifs

L'étude a porté sur 5 tissus : deux tissus intramusculaires préparés à partir de 500 g de muscle longissimus dorsi au niveau de la 3e vertèbre lombaire et de 500 g de muscle pectoralis profundus (partie sternale), le tissu épimysial correspondant du long. dorsi, le derme isolé à partir de la peau du flanc (au niveau du muscle pectoralis prof.) et le tendon d'Achille (15 cm de part et d'autre de l'articulation).

Pour les tissus intramusculaires, après un parage de l'epimysium, la préparation a consisté essentiellement en une séparation des fibres par broyage au Waring Blendor muni de la tête Brix en présence d'eau à + 10° C (rapport muscle/eau : 1/50) les fibres étant recueillies par tamisage. Après des lavages répétés sous l'eau à + 10° C le tissu est délipidé par passages successifs dans des bains d'acétone R.P. et finalement séché à l'air.

Le derme isolé de l'épiderme, le tendon et l'epimysium sont coupés en dés d'environ 5 mm de côté puis lavés et dilacérés par broyage dans un traitement identique à celui du collagène intramusculaire et séchés après les bains d'acétone.

Des fibre épimysiales destinées à l'étude de la contraction thermique sont prélevées avant broyage et sont délipidées à l'acétone puis séchées.

Les différentes fractions ainsi préparées ont été analysées au cours du mois suivant leur extraction.

- stabilité thermique

Les tissus secs sont réhydratés pendant 30 mn en présence de 40 ml de tampon Tris-HCl 0,02 M contenant 0,23 M NaCl (pH 7,4) pour 40 mg de tissu. Les échantillons sont portés à 90° C (+ 0,5° C), et à 70° C pour l'épimysium, pendant 120 mn dans un bloc thermostaté à sec. Après filtration et rinçage du résidu la phase soluble est évaporée à sec à 55° C (évaporateurs rotatifs sous vide), les fractions solubles et insolubles sont alors hydrolysées sous reflux en présence de 60 ml d'HCl 6N à 120° C pendant 8 heures 30 minutes.

La teneur en hydroxyproline (Hypro) est déterminée par la méthode de BERGMAN et LOXLEY (1963) adaptée à l'autoanalyseur et la stabilité thermique est exprimée en % de l'Hypro soluble par rapport à l'Hypro totale. Pour chaque tissu 4 solubilisations sont effectuées et une valeur moyenne par animal et par tissu est ainsi déterminée.

- stabilité chimique

Les mêmes tissus sont mis en suspension dans des pots de centrifugation par agitation dans 40 ml d'acide acétique 0,5 M pour 40 mg de tissu. Après un séjour de 60 mn à température ambiante assurant une imbibition homogène, les échantillons sont portés à 40° C pendant 24 heures dans un bain Marie régulé à ± 0,5° C. Une centrifugation effectuée à + 30° C et à 15 000 g permet la séparation des fractions solubles et insolubles et finalement après un traitement identique à celui décrit ci-dessus (évaporation, hydrolyse) la teneur en collagène des fractions est déterminée. La stabilité chimique est exprimée par le pourcentage d'hypro extractible sur la base de la valeur moyenne de 4 extractions réalisées par tissu.

- contraction thermique

La section des fibres d'epimysium est calculée en tenant compte du poids sec, de la longueur et de la densité des fibres (d = 1,33). Les fibres sont fixées à l'état sec, rehydratées à pH 7,4 pendant 30 mn dans le tampon utilisé pour déterminer la stabilité thermique puis fixées isométriquement dans le contractomètre déjà décrit (KOPP et al., 1977). Une tension initiale de 2 daN.cm^{-2} est appliquée à l'aide de la vis micrométrique puis un chauffage à 4° C.mn^{-1} est réalisé entre 10 et 96° C, la force de contraction étant enregistrée en fonction de la température (enregistreur XY). Quatre mesures sont faites pour chaque tissu et la valeur moyenne de 3 paramètres caractéristiques est calculée :

- θ_C : température de début de contraction (° C)
- θ_M : température correspondant à la tension maximale (° C)
- T_M : tension maximale développée à θ_M (daN.cm^{-2})

II - RESULTATS

Les tissus préparés selon la méthode simplifiée décrite contiennent entre 9,2 et 12,0 mg d'Hypro pour 100 mg c'est-à-dire entre 70 et 90 % de collagène sur la base d'une teneur moyenne en Hypro du collagène de 13 %. Nous n'avons pas enregistré de différences significatives entre animaux témoins et culards sauf pour les aponévroses (epimysium) pour lesquelles le tissu sec contenait 2,5 % de collagène en plus chez les culards.

Les résultats concernant la stabilité thermique appréciée par la solubilisation en milieu neutre à 90° C sont rapportés dans le tableau I. Il apparaît que les tissus présentent une large gamme de variation de solubilité, le tissu le plus instable étant l'epimysium du muscle longissimus dorsi qui, contrairement aux autres tissus manifeste déjà une instabilité nette à 70° C. La stabilité des tissus intramusculaires est intermédiaire entre celles du derme et du tendon et le collagène du muscle pectoralis profundus est plus insoluble que celui du longissimus dorsi.

TISSUS		intramusculaire *intramuscular*		epimysium long. dorsi		derme *derm*	tendon
		Long. dorsi	Pect. prof	70° C	90° C		
Témoins (N=5 ; n=20) *Control*	M	25.60	19.46	43.79	74.35	38.82	15.51
	σ_N (σ_n)	4.80 (4.68)	3.77 (3.66)	5.84 (5.66)	4.56 (4.80)	4.30 (4.55)	3.47 (3.33)
Culards (N=6 ; n=24) *double muscled*	M	27.56	21.30	49.79	77.25	48.30	19.13
	σ_N (σ_n)	3.84 (3.68)	3.42 (3.39)	3.26 (3.29)	5.74 (5.88)	2.99 (3.17)	3.31 (3.47)
Différence	a(b)	NS(NS)	NS(NS)	+(xxx)	NS(NS)	++(xxx)	+(xx)

Tableau I - *STABILITE THERMIQUE DU COLLAGENE : SOLUBILITE (en %) à pH 7.4 après 2 heures à 90° C*
THERMAL STABILITY OF COLLAGEN : SOLUBILITY (in %) at pH 7.4 at 90° C (2 hours)

M : moyenne par tissu et par lot - Mean per tissue and group
σ_N(σ_n) : écart type des N moyennes et de l'ensemble des n mesures standard deviation of the N means and of total number of samples analysed (n)
a : différence testée sur la base des moyennes (+) - difference test on a mean basis (+)
b : difference testée pour l'ensemble des n mesure effectuées (x) - difference test taking in account the total number of observations
(NS) non significatif ; (+ x) $p < 0.05$; (++ xx) $p < 0.01$; (+++ xxx) $p < 0.001$

Pour les 5 tissus considérés la solubilité thermique du collagène est plus importante chez les culards, la différence est marquée pour le derme et le tendon et également pour l'epimysium à 70° C, c'est-à-dire pour les tissus normalement riches en fibres de collagène par opposition aux muscles pour lesquels on note cependant une différence de l'ordre de 2 points. Les résultats individuels non rapportés ici mettent en évidence une variation individuelle importante, certains animaux présentant des écarts systématiques pour tous les tissus que l'on peut attribuer à des différences de maturité physiologique à un âge chronologique donné (HILL, 1966).

Pour apprécier la stabilité chimique des tissus nous avons d'abord procédé à des extractions à 4° C pendant 60 h. Dans ces conditions, seul le tissu épimysial et le derme présentaient une solubilité suffisante pour l'exploitation des résultats (8,1 et 3,1 % respectivement), les autres tissus étant totalement insolubles. Les extractions ont alors été effectuées à 40° C ; les résultats apparaissent sur le tableau II.

TISSUS		intramusculaire *intramuscular*		Epimysium L. dorsi	Derme *derm*	Tendon
		Long. dorsi	Pect. prof			
Témoins (N=5 ; n=20) *Control*	M	5.22	1.99	71.59	20.07	0.62
	σ_N (σ_n)	1.28 (1.22)	0.45 (0.48)	5.43 (5.22)	3.04 (3.02)	0.60 (0.60)
Culards (N=6 ; n=24) *Double muscled*	M	7.02	3.09	70.51	28.95	1.42
	σ_N (σ_n)	2.99 (2.88)	0.85 (1.30)	7.27 (7.18)	2.51 (3.16)	1.12 (1.15)
Différence	a(b)	NS (x)	+ (xx)	NS (NS)	+++ (xxx)	NS (xx)

Tableau II - *STABILITE CHIMIQUE DU COLLAGENE : EXTRACTIBILITE EN MILIEU ACIDE ACETIQUE 0.5 M (40° C, 24 h) EN % ; cf. légence du tableau I pour les symboles*
CHEMICAL STABILITY OF COLLAGEN : EXTRACTIBILITY IN 0.5 M ACETIC ACID (40° C, 24 h) IN % ; same symbols as in table I

La différence entre tissus est encore plus marquée qu'au niveau de la solubilité hydrothermique : les collagènes intramusculaires et de tendon sont particulièrement stables en milieu acide contrairement à l'epimysium. La différence entre les 2 types d'animaux constatée au plan de la stabilité thermique est également vérifiée pour le derme et à un degré moindre pour le tendon et le tissu intramusculaire du muscle Pectoralis prof. ; par contre, le collagène épimysial très soluble n'est pas significativement différent dans les 2 lots. Là encore, le collagène du muscle le plus riche en tissu conjonctif (Pectoralis profundus) est plus stable que celui du muscle Longissimus dorsi.

L'analyse des diagrammes de contraction des fibres d'epimysium rapportés à une même section de fibres permet de comparer les cinétiques de développement de la tension générée par la dénaturation thermique des fibres au-delà de la température de contraction Θ_S. Cette température est une constante biologique ne variant pas sensiblement avec l'âge des animaux. Les résultats concernant les paramètres de cette contraction isométrique (tableau III) montrent que la température Θ_S n'est pas différente pour ce tissu dans les 2 lots d'animaux.

La température Θ_M correspondant à la tension maximale, c'est-à-dire à un équilibre entre phénomènes de contraction et de relaxation, est liée à la stabilité thermique des liaisons de réticulation intermoléculaires assurant la continuité longitudinale des fibres ; elle varie, comme la tension maximale, avec l'âge des animaux.

PARAMETRES →		Θ_S (° C)	Θ_M (° C)	T_M (daN.cm^{-2})
Témoins (N=5 ; n=20) *Control*	M	56.5	80.1	38.61
	σ_N (σ_n)	0.6 (0.7)	1.5 (1.6)	4.71 (4.77)
Culards (N=6 ; n=24) *Double muscled*	M	56.8	81.2	31.71
	σ_N (σ_n)	0.3 (1.0)	1.4 (1.8)	5.67 (5.96)
Différence	a(b)	NS (NS)	NS (NS)	+ (xx)

Tableau III - *PARAMETRES DE LA CONTRACTION THERMIQUE ISOMETRIQUE A pH 7.4 ; VITESSE DE CHAUFFAGE 4° C.mn^{-1} ENTRE 10 ET 96° C*
THERMAL CONTRACTION PARAMETERS AT pH 7.4 ; HEATING RATE 4° C.mn^{-1} BETWEEN 10 AND 96° C

Θ_S : température de début de contraction - shrinkage temperature
Θ_M : température de contraction maximale - temperature at maximum tension
T_M : tension maximale développée à Θ_M (cf. légende du tableau I pour les symboles) maximum tension (symbols as in table I)

La valeur 80° C pour Θ_M est caractéristique d'animaux de 2 ans (KOPP, 1971), elle n'est pas significativement différente entre témoins et culards. La tension maximale T_M est par contre moins importante chez les culards pour lesquels les fibres sont en outre plus riches en collagène. La différence de tension serait donc plus grande sur la base d'une même teneur en collagène.

Le comportement des fibres à la contraction peut être interprété (BAILEY et LISTER, 1968) comme traduisant une moindre réticulation des fibres chez l'animal culard. Lorsque la température de 96° C est atteinte dans le cycle de chauffage, la tension développée est inférieure à 10 daN.cm^{-2}, les liaisons de ce type de tissu sont donc particulièrement labiles à un âge où le collagène intramusculaire est déjà thermiquement très stable.

III - DISCUSSION ET CONCLUSION

La quantité de collagène dans les muscles d'animaux culards est inférieure à celle des animaux non hypertrophiés pour une large gamme d'âge et dans diverses races comme cela a été montré chez des veaux charolais de 3 mois (TALMANT, 1972), des génisses frisonnes de 9-10 mois (LAWRIE et al., 1964), des taurillons charolais de 10-20 mois (BOCCARD et al., 1974), les animaux de 2 ans de cette expérience (BOCCARD, 1980) et des taureaux charolais de 3 ans (BOCCARD et al., 1967).

La différence moyenne de teneur en collagène entre les 2 lots expérimentaux au niveau des muscles était respectivement de 20 % et 41 % pour les muscles longissimus dorsi et pectoral prof. Pour les autres tissus conjonctifs, il est également bien établi que la masse totale de peau des culards est inférieure à celle des témoins de même âge, ce déficit quantitatif était de 20 % dans nos 2 lots (56,9 ± 8,9 kg pour le lot témoin et 46,0 ± 4,1 pour les culards). Le développement pondéral des tendons ou des tissus épimysiaux n'a pas fait l'objet d'études particulières à ce jour.

Nos résultats confirment, pour des animaux de 2 ans, ceux de BOCCARD et al. (1967) obtenus pour des bovins de même race de 3 ans en ce qui concerne la plus grande labilité du collagène intramusculaire des culards qui est plus nette à cet âge qu'à 3 mois (TALMANT, 1972). Ces résultats montrent également que cette plus grande instabilité se retrouve plus marquée dans d'autres compartiments conjonctifs en particulier dans le tissu cutané moins développé chez le culard. La stabilité en milieu acide confirme globalement les différences enregistrées dans la solubilité thermique, la faible solubilité du collagène musculaire étant à souligner.

Dans les muscles, DUMONT et SCHMITT (1973) ont montré histologiquement que le tissu conjonctif apparaît plus lâche chez le culard en particulier au niveau du perimysium constitué essentiellement de collagène de type III (DUANCE et al., 1977). Cette plus grande finesse du perimysium du longissimus dorsi est confirmée par les premiers résultats de BAILEY et al. (1980) sur les animaux de cette expérience, l'endomysium (types IV et V) étant sensiblement identique pour les 2 types d'animaux. Les mêmes auteurs montrent également que le rapport des types I/III du collagène intramusculaire n'est pas modifié chez le culard mais que ce collagène contient plus de liaisons intermoléculaires réductibles c'est-à-dire plus labiles : le collagène musculaire apparaît ainsi légèrement moins mature chez le culard.

Le tissu épimysial contenant essentiellement du collagène de type I comme le tendon et la peau (DUANCE et al., 1977, BAILEY et al., 1980), diffère de ceux-ci de manière marquée par sa plus grande labilité thermique et chimique au même âge qui peut correspondre à une proportion plus importante de liaisons de réticulation thermolabiles dans l'epimysium (confirmée par la faible tension développée en condition isométrique). Des mesures de contraction effectuées sur des fibres isolées à partir du tendon d'Achille de ces mêmes animaux montrent que la tension maximale développée est de l'ordre de 100-110 daN.cm^{-2} pour une température de 96° alors que le phénomène de relaxation n'apparaît pas encore à cette température.

Il semble par ailleurs exister une relation étroite entre stabilités chimique et thermique pour tous les tissus étudiés sauf pour l'epimysium : les tissus thermiquement instables sont également les plus labiles en milieu acide. Dans les deux cas, la différence la plus marquée entre témoins et culards se situe au niveau du derme et du tendon. En ce qui concerne d'autres tissus conjonctifs que ceux envisagés dans ce travail, signalons que HENDRICKS et al. (1973) n'ont pas observé de différence de rigidité des os pour des taurillons Angus âgés de 13-15 mois malgré une différence significative de la longueur de ces os. La généralisation des résultats obtenus ici ne semble donc pas possible pour l'ensemble des compartiments conjonctifs des bovins.

En conclusion, il apparaît que les tissus conjonctifs étudiés, bien que constitués des mêmes types de collagène présents dans des rapports sensiblement identiques tout au moins pour les tissus musculaires, manifestent à un degré variable une moindre stabilité thermique et chimique chez le culard. Les différences les plus nettes ont été enregistrées pour le derme et le tendon ; on peut penser qu'elles résident dans la stabilité des liaisons intermoléculaires et dans l'importance relative des liaisons réductibles présentes dans les collagènes de type I et III. Les observations faites sur le derme permettent de souligner des conséquences possibles dans l'utilisation des peaux des animaux culards dans l'industrie du cuir.

Au plan de la qualité de la viande et plus particulièrement de la tendreté l'ensemble des travaux réalisés à ce jour permet d'affirmer que c'est le déficit de collagène dans la majorité des muscles de la carcasse d'animaux culards qui est largement responsable de la moindre dureté de ces muscles. L'effet additionnel de la plus grande instabilité se traduisant par une solubilisation plus importante et une réduction des forces de contraction au cours de la cuisson de la viande, vraisemblablement faible par rapport à l'effet quantitatif, mériterait cependant d'être exploré plus avant, par exemple sur des muscles pour lesquels le déficit en collagène entre normal et culard est minimum.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAILEY A.J., LISTER D. (1968). Nature 220, 280.

BAILEY A.J., ENSER M.B., DRANSFIELD E., RESTALL D.Y., AVERY N.C. (1980). Séminaire CEE "hypertrophie musculaire des bovins", 10-12 Juin 1980, TOULOUSE (France).

BERGMAN I., LOXLEY R. (1963). Anal. Chem. 35, 1961.

BOCCARD R., DUMONT B.L. (1974). Ann. Génét. Sél. Anim. 6, 177.

BOCCARD R., DUMONT B.L., SCHMITT O. (1967). 13e Congrès Européen des Chercheurs en Viande, ROTTERDAM, 20-26 Août 1967 (D9).

DUANCE V.C., RESTALL D.J., BEARD H., BOURNE F.J., BAILEY A.J. (1977). FEBS Let. 79, 248.

DUMONT B.L., SCHMITT O. (1973). Ann. Génét. Sél. Anim. 5, 499.

HENDRICKS H.B., ABERLE E.D., JONES D.J., MARTIN T.G. (1973). J. Anim. Sci. 37, 1305.

HILL F. (1966). J. Food Sci. 31, 161.

KOPP J. (1971). Bull. Techn. CRZV-INRA, 5, 47.

KOPP J., SALE P., BONNET Y. (1977). Can. Inst. Food. Sci. Technol. J. 10, 69.

LAWRIE R.A., POMEROY R.W., WILLIAMS D.R. (1964). J. Agric. Sci. 62, 89.

TALMANT A. (1972). Thèse (DES) : contribution à l'étude de l'hypertrophie musculaire des bovins.