

RELATION ENTRE LE TYPE DE MUSCLE ET LE CATABOLISME POST MORTEM DU NAD DANS LE MUSCLE DE BOVIN

C. VALIN, F. CHAMPOMIER

Station de Recherches sur la Viande - INRA Theix - 63110 BEAUMONT - France

INTRODUCTION

Il existe peu d'informations relatives à l'évolution des nucléotides pyridiniques NAD et NADH dans le muscle post mortem. Pour l'essentiel, les études du catabolisme post mortem de ces composés sont limitées aux premières heures des post mortem et restreintes à l'étude du NAD total.

NEWBOLD et SCOPES (1967) ont étudié l'évolution post mortem du NAD dans le muscle sternomandibularis de boeuf en fonction de la température. A 37° C, l'hydrolyse est très rapide, à 5° C, 70 % du NAD sont hydrolysés en 72 h, 84 % à + 15° C.

Plus récemment, ces mêmes auteurs (NEWBOLD, SCOPES, 1971) rapportent que la vitesse d'hydrolyse du NAD est multipliée par un facteur 16 quand le muscle est broyé par rapport au muscle entier pour une même température de conservation.

ATKINSON, FOLLETT (1971) ont suivi l'hydrolyse du NAD dans le muscle semimembranosus de boeuf conservé entre 0 et 4° C pendant 3 jours. Ils rapportent qu'entre 5 et 48 heures post mortem la concentration de NAD décroît linéairement de 0,66 µmoles/g à 5 heures à 0,33 µmoles/g à 48 heures. Par la suite la vitesse d'hydrolyse du NAD diminuerait et au temps 72 heures ces auteurs observent une teneur résiduelle de 0,26 µmoles (g de muscles).

Selon SEVERIN et al. (1963), la NAD glycohydrolase est la principale enzyme responsable de la destruction du NAD dans le muscle post mortem. Il s'agit d'une enzyme liée, le broyage qui entraîne sa délocalisation accélérerait de ce fait la vitesse d'hydrolyse du NAD.

MATERIEL ET METHODES

Les muscles longissimus dorsi (LD) et gluteus medius (GM) ont été prélevés sur 7 animaux (Frisons et Charolais). Le catabolisme post mortem des nucléotides NAD et NADH totaux a été suivi sur tous les animaux, celui du NAD(H) sarcoplasmique libre et lié sur quatre animaux seulement.

Les prélèvements initiaux sont réalisés 20 minutes post mortem. Les carcasses sont désossées 4 jours post mortem. Les deux muscles LD et GM prélevés sont découpés en tranches de 2 cm d'épaisseur conservées sous film perméable à 0° C.

- Extraction de NAD et NADH

Le NAD est obtenu par une double extraction en milieu acide à 0° C. L'agent déprotéinisant est l'acide perchlorique que dont la concentration dans le milieu d'extraction est de 0,5 N. Puis l'extrait est neutralisé à la potasse à 0° C.

Une extraction alcaline permet d'obtenir le NADH, mais la détermination du NADH en milieu alcalin est délicate, nous avons aussi utilisé une méthode qui consiste à oxyder NADH en NAD dans l'extrait alcalin neutralisé, puis à doser le NAD qui est beaucoup plus stable. L'extrait alcalin est ramené à pH 7,8 à l'aide d'une solution de triéthanolamine hydrochloride 0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 M, α-cétoglutarate 5 mM NH<sub>4</sub>Cl 30 mM qui amène les substrats nécessaires à l'oxydation enzymatique du NADH par la déshydrogénase glutamique. L'oxydation est effectuée en 15 minutes à température ambiante, puis la réaction est arrêtée par HClO<sub>4</sub> 3 M. Les protéines précipitées sont centrifugées, le surnageant est ensuite ajusté à pH 7,2 avec de la potasse 3 N. KClO<sub>4</sub> est éliminé par précipitation à 0° C. Cette technique permet d'obtenir un taux de recouvrement du NADH de 78 % ± 2 % et améliore de 35 % le rendement de la méthode classique de détermination directe du NADH.

- Fractionnement du NAD(H) sarcoplasmique

Les protéines sarcoplasmiques sont extraites du muscle par homogénéisation dans 2 volumes d'une solution de tris 30 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM, EDTA 1 mM nicotinamide 30 mM pH 7,5. La nicotinamide est ajoutée pour inhiber l'action de la NADase.

Après centrifugation de 45 minutes à 24 000 g et à + 4° C le surnageant est filtré. La séparation NAD(H) lié et NAD(H) libre est réalisée par chromatographie sur Sephadex G50. La colonne (Ø 2,5 cm, hauteur 25 cm) est équilibrée dans le tampon d'extraction des protéines, la chromatographie est réalisée à + 10° C. Les formes liées du nucléotide sont associées aux protéines exclues puis les formes libres sont éluées. Le rendement de la chromatographie est de 98,8 %. Le dosage des NAD(H) est réalisé dès la sortie de la colonne de G75.

- Dosage des NAD(H)

Le dosage du NAD(H) a été réalisé à l'aide d'une méthode dite recyclage enzymatique (enzymatic cycling) qui permet de déterminer des quantités de nucléotides de l'ordre de la picomole. Nous avons utilisé une méthode dérivée de celle de BERNOFSKY et SWAN (1973) par CHAMPOMIER (1979).

RESULTATSI - Influence du type de muscle sur les teneurs initiales en NAD(H)

Les muscles étudiés présentaient des types différents tant au plan contractile que métabolique. Les muscles LD et GM sont de même type rouge rapide (HUNT et HEDRICK, 1977), les muscles RA et D étant plus rouges et plus lents (LACOURT, 1973).

Le tableau I rapporte les teneurs initiales en NAD et en NADH totaux des quatre muscles étudiés.

	NAD	NADH	$\frac{\text{NAD}}{\text{NADH}}$
LD	501 ± 41 <sup>a</sup>	147 ± 22 <sup>a</sup>	3,47 ± 0,69
GM	490 ± 42 <sup>a</sup>	148 ± 18 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,30
RA	366 ± 28 <sup>b</sup>	123 ± 12 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,15
D	248 ± 32 <sup>c</sup>	69 ± 15 <sup>b</sup>	3,66 ± 0,39

Tableau I - TENEURS INITIALES EN NAD ET NADH EXPRIMEES EN N.MOLES/G TISSU FRAIS

Les valeurs dans une colonne qui ont des indices lettres différents sont significativement différents ( $P < 0,01$ ).

D'après ces résultats on peut faire les remarques suivantes :

- les teneurs en NAD total sont nettement supérieures à celles en NADH,
- les quantités initiales de nucléotides totaux sont identiques dans les muscles LD et GM de même type métabolique et contractile. Ces teneurs décroissent dans les muscles plus rouges et plus lents,
- les rapports NAD/NADH sont très voisins quel que soit le type du muscle. Les rapports observés sont très différents de celui rapporté par BERNOFSKY et PANKOV (1973) pour le muscle de lapin. Ces auteurs rapportaient une teneur en NADH quatre fois plus faible que celle que nous mesurons dans le muscle de bovin.

#### II - Catabolisme post mortem des nucléotides NAD et NADH totaux

Les résultats sont regroupés dans le tableau II.

Temps pm	NAD total				NADH total			
	LD	GM	RA	D	LD	GM	RA	D
J 0	501±41	490±42	366±28	248±32	147±22	148±18	123±12	69±15
J 1	384	395	310±18	204±11	74	74±	51± 3	49± 6
J 6	88±19	86±23	-	-	16± 4	16± 6	-	-
J 7	89	79	77±22	117±14	12	11	12± 5	32± 5
J 11	-	-	52± 5	77±14	-	-	6± 2	19± 6
J 12	47±20	43± 5	-	-	9± 3	9± 1	-	-

Tableau II - CATABOLISME POST MORTEM DU NAD ET DU NADH DANS LES MUSCLES LD, GM, RA ET D

Teneurs exprimées en n mole tissu frais

On peut constater que l'hydrolyse du NAD et du NADH s'opère à la même vitesse dans LD et GM, est légèrement plus lente dans RA et beaucoup plus lente dans D qui à 7 jours post mortem possède des teneurs résiduelles nettement plus élevées que les trois autres muscles.

On constate par ailleurs que la vitesse de disparition du NADH est plus rapide que celle de la forme oxydée autant dans les muscles LD, GM et RA.

L'évolution du rapport NAD/NADH traduit bien les différences de vitesse d'hydrolyse des deux formes oxydée et réduite (tableau III).

Temps post mortem	NAD/NADH			
	LD	GM	RA	D
J 0	3,5	3,3	3,0	3,7
J 1	5,2	5,3	6,0	4,2
J 7	7,7	7,5	6,8	3,8

Tableau III - EVOLUTION DU RAPPORT NAD/NADH EN FONCTION DU TEMPS POST MORTEM

III - Catabolisme post mortem du NAD(H) sarcoplasmique des muscles LD, GM et D

Ce tableau IV regroupe l'ensemble des résultats sur les muscles LD, GM et D.

Animaux n°	Jours pm	LD			GM			Jours pm	D		
		NAD(H) total	NAD(H) lié	NAD(H) libre	NAD(H) total	NAD(H) lié	NAD(H) libre		NAD(H) total	NAD(H) lié	NAD(H) libre
1	0	(454) 100	20,5	81,7	(444) 100	15,2	81,9	0	(103) 100	18,2	73,6
	5	27,5	8,3	18,2	25,8	8,0	17,8	8	41,8	11,4	28,6
	12	10,7	3,0	7,6	6,2	1,4	5,2	10	22,3	5,9	15,5
2	1	(403) 100	18,9	79,4	(390) 100	21,5	68,6	0	(82) 100	27	77
	6	18,1	6,6	11,4	20	6,9	10,9	8	38	8,5	28
	13	3,5	1,0	2,6	3,1	0,8	2,6	10	19,5	4,9	13
3	0	(350) 100	23,7	79,9	(349) 100	18,3	81,9	1	(90) 100	23,0	71
	6	14,3	6,0	8,3	16,3	7,4	6,9	7	43,3	17	31
	12	11,1	4,0	6,6	8,9	3,2	5,6	11	30	7	21
4	1	(343) 100	19,8	82,9	(290) 100	24,5	77,1	1	(138) 100	19	79,7
	7	22	8,0	13,4	13,8	6,9	6,7	7	47	16	29
	13	7,9	2,5	4,2	7,1	2,4	4,8	11	23	11	13

Tableau IV - CATABOLISME POST MORTEM DU NAD(H) SARCOPLASMIQUE TOTAL ET DES FORMES LIBRES ET LIEES EXPRIME EN POURCENTAGE DE LA TENEUR INITIALE EN NAD(H) SARCOPLASMIQUE TOTAL DONT LA VALEUR EST EXPRIMEE ENTRE PARENTHESE EN N MOLE/G TISSU FRAIS

Dans les trois muscles étudiés nous observons qu'environ 20 % du NAD(H) sarcoplasmique sont liés à des protéines au temps 0. Ce chiffre est comparable à celui rapporté par BERNOFSKY et PANKOV (1973) pour le muscle de poulet.

Par ailleurs l'examen du rapport NAD(H) sarcoplasmique sur la somme NAD + NADH totaux aux temps J0 et J1 montre qu'il existe un pourcentage plus élevé de nucléotides dans le sarcoplasme des muscles LD et GM (71 % et 68 % respectivement) que dans celui du D (29 à 45 %) muscle très rouge et très riche en mitochondries.

Enfin, il apparaît que le catabolisme du NAD(H) sarcoplasmique est beaucoup plus rapide dans LD et GM que dans D. L'hydrolyse des fractions libres est également plus rapide que celle des fractions liées dans les trois muscles. Si nous n'observons pas de différence de vitesse d'hydrolyse entre LD et GM, par contre les teneurs en NAD(H) totaux et libres du LD sont toujours supérieures à celles du GM pour tous les temps de conservation, la différence est significative au seuil 5 % (test T par paire calculé sur les teneurs pour l'ensemble des animaux et pour tous les temps de conservation).

CONCLUSION

Les teneurs des muscles en nicotinamide adénine dinucléotide varie en fonction de leurs types, les teneurs paraissent d'autant plus faibles que les muscles sont plus rouges. Le type du muscle joue également un rôle fondamental sur la répartition intracellulaire à savoir la répartition entre le sarcoplasme et les mitochondries. Par contre, au niveau sarcoplasmique, le type de muscle ne paraît pas affecter les proportions relatives des formes libres et liées.

La vitesse du catabolisme post mortem de ces composés est d'autant plus lente que les muscles sont plus rouges. Pour deux muscles instables sur le plan de la couleur comme GM et D, on observe une différence fondamentale au plan du catabolisme post mortem de leur NAD(H). Par contre, la comparaison de deux muscles de même type LD et GM très différents sur le plan de la stabilité de la couleur, révèle des vitesses de catabolisme du NAD(H) très voisines, mais pour le muscle le plus stable sur le plan de la couleur (LD) on observe que la teneur en NAD(H) libre dans le sarcoplasme est significativement plus élevée. S'il est admis que le NAD peut être un facteur limitant post mortem à l'activité réductrice de la metmyoglobine, il n'en demeure pas moins vrai que les mécanismes responsables de la stabilité de la couleur en cours de conservation sont encore largement inconnus et les résultats que nous rapportons concernant le catabolisme post mortem des formes oxydées et réduites du NAD dans des muscles de types différents et de stabilité de la couleur différente contribuent à souligner la complexité de ce problème.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ATKINSON J.L., FOLLETT M.J. (1971). 17th Eur. Meet. Meat Res. Workers, BRISTOL (UK).
- BERNOWSKY C., PANKOV M. (1973). Arch. Bioch. Bioph. 156, 143.
- BERNOFSKY C., SWAN M. (1973). Anal. Biochem. 53, 452.
- CHAMPOMIER F. (1979). Thèse Doctorat 3e cycle Université de CLERMONT II.
- DEBET M.C., HEDRICK H.B. (1977). J. Food Sci. 42, 513.
- LACOURT A. (1973). 19th Europ. Meet. Meat Res. Workers, PARIS.
- BERGOLD R.P., SCOPES R.K. (1967). Biochem. J. 105, 127.
- BERGOLD R.P., SCOPES R.K. (1971). J. Food Sci. 36, 209.
- BEVERIN S.E., TSEITLIN L.A., DRUZHININA T.N. (1963). Biochemistry 28, 112.