

Hydrolyse et reconstitution des réserves de glycogène dans les types de fibres musculaires de taurillons ayant subi une injection sous cutanée d'adrénaline.

A. LACOURT, P.V. TARRANT*
Avec la collaboration technique de Paulette LACOURT

Station de Recherches sur la Viande - I.N.R.A. - THEIX - 63110 BEAUMONT - FRANCE
*Meat Research Department, Agricultural Institute, DUNSINEA RESEARCH CENTRE, CASTLEKNOCK CO DUBLIN, IRELAND

INTRODUCTION

Les muscles de bovin, comme ceux de la plupart des autres espèces animales, contiennent trois types principaux de fibres. Elles peuvent être caractérisées selon deux critères qui sont le type d'activité ATPasique myofibrillaire et l'équipement enzymatique dominant du catabolisme des sucres. Il est ainsi possible de les classer en fibres à contraction lente et oxydatives (slow oxydative = SO), en fibres à contraction rapide et glycolytiques (fast-glycolytique = FG) et en fibres à contraction rapide ayant une capacité également importante en aérobose et en anaérobose (fast-oxydative-glycolytique = FOG). Les cellules musculaires sont également riches en glycogène, ce qui est une nécessité essentielle à l'obtention d'une viande de qualité normale.

L'hydrolyse sélective du glycogène dans les différents types de fibres musculaires au cours de la contraction des muscles a été observé dans un nombre important d'espèces notamment chez l'homme (GOLLNICK et al, 1973), et pendant l'installation de la rigor mortis (SWATLAND, 1980). L'intensité et la durée du travail fourni déterminent la réponse des différents types de fibres musculaires. Des différences de comportement entre les types de fibres musculaires de boeuf sont intéressantes à étudier car elles donnent une indication sur le mécanisme de l'hydrolyse du glycogène musculaire dans une situation de stress spécifique, comme nous avons pu l'observer au cours d'un stress de comportement obtenu en mélangeant des taurillons, par lots de deux, avec un groupe de 10 jeunes taureaux qui ne leur étaient pas familiers (LACOURT and TARRANT, 1980). Il n'avait pas été possible d'établir une opposition entre l'importance relative d'une régulation endocrinale (adrénaline) et la glycogénolyse contrôlée au niveau intra cellulaire.

Il est également évident que les pertes en glycogène musculaire avant abattage peuvent se produire dans des muscles spécifiques des carcasses de boeuf commerciales, sources de viande à coupe sombre dans les parties correspondantes des carcasses (TARRANT and SHERINGTON, 1980). La composition en types de fibres varie considérablement avec les différents muscles individualisés. Il était intéressant d'examiner la réponse des trois principaux types de fibres à une injection sous cutanée d'adrénaline.

Le but de cette expérience était donc de déterminer le modèle de l'hydrolyse du glycogène musculaire et de sa resynthèse, après action de l'adrénaline, dans les différents types de fibres et d'établir si la réponse est significativement différente entre les types de fibres.

MATERIEL ET METHODES

1 - ANIMAUX - Huit taurillons de race Frisonne, âgés de 12 mois et pesant 350-400 kilogrammes de poids vif, étaient gardés en stabulation libre et nourris par 8.2 kilogrammes de matières sèches par jour. La ration quotidienne était composée de 2.2 kilogrammes de foin de prairies naturelles et de 6 kilogrammes d'un concentré contenant 88.3 % de pulpe de betteraves sèche, 4.4 % d'urée et 7.3 % de mélasse de canne à sucre.

2 - STRESS - Le stress a été provoqué par deux injections sous cutanées successives d'adrénaline, à la dose de 0.26mg d'adrénaline par kilogramme de poids vif, au temps 0h et 3h. La période théorique de stress a été de 5 heures et le temps de repos ultérieur a été étudié jusqu'à 12 heures. Au cours de cette période de récupération les animaux ont été replacés en stabulation libre et nourris ad libitum.

3 - ECHANTILLONNAGE - Les échantillons ont été obtenus à partir du muscle Longissimus dorsi en utilisant une aiguille à biopsie de Bergstrom ayant un diamètre interne de 5 mm. Les échantillons de sang ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire. Les prélèvements de contrôle ont été effectués 3 à 4 jours avant le stress. Deux biopsies ont été pratiquées au cours du stress à +3h et +5h et deux au cours du repos ultérieur +24h et +72h.

4 - TRAITEMENT - Quatre des huit animaux ont reçu un traitement destiné à élever le taux de glucose sanguin et à stimuler le captage de glucose par les muscles. Des perfusions intraveineuses de 250g (500ml) de glucose (solution de glucose injectable 50 % p/v, laboratoire Aguetant, Lyon, France) ont été effectuées trois fois deux jours après le début du stress. Les effets de ce traitement sur le sang et les constituants du muscle sera l'objet d'un rapport séparé (en préparation). Ce traitement n'a pas eu d'influence évidente sur la réponse au stress des types de fibres musculaires ni d'effet significatif sur la concentration en glycogène du muscle. Les données obtenues pour les huit animaux ont donc été rassemblées en un seul groupe et analysées en vue d'interpréter les résultats obtenus par histochimie.

5 - ANALYSES BIOCHIMIQUES - Le glycogène musculaire a été hydrolysé à l'aide d'amyloglucosidase d'Aspergillus niger (Boehringer, Mannheim). Le glucose ainsi libéré a été dosé par la glucose oxydase (type 5) et la péroxydase (type 2, Sigma Chemical Co, St Louis, USA). La concentration de glucose sanguin a été mesurée dans le plasma frais selon le même dosage.

6 - ANALYSES HISTOCHIMIQUES - Des coupes transversales sériées de 10µ d'épaisseur ont été préparées à partir des biopsies orientées et congelées. Les fibres ont été classées selon trois types en accord avec le schéma suivant

Le glycogène in d'amyloglycosida concentration re ainsi faite est

Afin d'obtenir coloration des calculée de la f été maintenue a électrique. La m les coupes coloré (10). La densité

7 - ANALYSE STA glycogène a été et le temps com formation arc-si

RESULTATS

Les taurillons fiévreux avec tr niveau des param pour la températ de 5 heures apr rectale, ce qui la concentration diminué à 24 heu

L'analyse quanti repos (58µ moles initiale à +5h

ultérieur la co valeur initiale

J. HALKJAER - l permet de quant vérifier nos co transmise à trav concentration en l'échantillon hi (r = 0.668, P < 0 comme dans le ca

Le pourcentage d de glycogène pou figure 4. Des d des fibres de t significative en l'interaction en fibres intermédi

Au cours de la pourcentage des intermédiaires e pourcentage de f accroissement du une perte plus i % pour les fibre négatives en con +5h) a été la p correspondante t (figure 4).

Au cours de la léger accroissem négatives et à u fibres de type S du pourcentage négatives en gly Après la phase f leur contenu en et intermédiaire

	FG	FOG	S0
ATPase après préincubation à pH 10.2	+	+	-
α glycérophosphate deshydrogénase	+	+	-
Succinate deshydrogénase	-	+	+

Le glycogène intracellulaire et un témoin obtenu par préincubation d'une coupe sériée dans une solution d'amyloglycosidase ont été colorés par la technique de SCHIFF après action de l'acide périodique (PAS). La concentration relative en glycogène de chaque fibre a ainsi été déterminée par répartition subjective en fibre à concentration positive en glycogène, intermédiaire en glycogène ou négative en glycogène (figure 1). L'analyse ainsi faite est basée sur l'examen d'une centaine de fibres pour chaque échantillon.

Afin d'obtenir une corrélation entre les dosages biochimiques du glycogène musculaire et la densité de coloration des coupes colorées par la technique PAS une densité optique des préparations histochimiques a été calculée de la façon suivante. Les coupes ont été placées sous un microscope Wild M20 et la source lumineuse a été maintenue aussi stable que possible. La lumière transmise a été mesurée à l'aide d'une cellule photo-électrique. La moyenne de trois champs différents a ainsi été déterminée dans le cas de chaque échantillon pour les coupes colorées par la technique PAS (I) et pour celles où le glycogène avait été hydrolysé auparavant (Io). La densité optique a ainsi été définie selon $DO = \log Io/I$

7 - ANALYSE STATISTIQUE - Le pourcentage de fibres à concentration positive, intermédiaire ou négative en glycogène a été analysé selon une analyse factorielle de variance en considérant les animaux, le type de fibres et le temps comme facteurs de variation. Les valeurs de pourcentage avaient au préalable subi une transformation arc-sinus.

RESULTATS

Les taurillons ayant reçu 2 injections successives d'adrénaline ont présenté plus ou moins vite un état fébrile avec tremblements et sudation intense. Dans le même temps une réponse importante a été observée au niveau des paramètres physiologiques mesurés. Des augmentations statistiquement significatives ont été relevées pour la température corporelle et le rythme cardiaque (tableau 1). Cet état a persisté au cours de la période de 5 heures après la première injection ; la durée s'est étendue jusqu'à + 24 heures pour la température rectale, ce qui semble indiquer une activité rémanente de l'adrénaline pendant 24 heures. La valeur moyenne de la concentration du glucose plasmatique (figure 2) a été significativement plus élevée à +5h ($P < 0.001$) mais a diminué à 24 heures pour retrouver la valeur initiale.

L'analyse quantitative du glycogène musculaire (figure 2) a présenté une diminution à 59 % de la valeur au repos (58 μ moles unités glucose/g de tissu frais) après 3 heures de stress ($P < 0.001$), 37 % de la valeur initiale à +5h ($P < 0.001$) et reste pratiquement à cette valeur jusqu'à +24h. En effet au cours du repos ultérieur la concentration en glycogène musculaire s'accroît seulement à 40 % après 1 jour et à 73 % de la valeur initiale après 3 jours.

J. HALKJAER - KRISTENSEN et T. INGEMANN-HANSEN (1979) ont montré que la coloration par la technique au PAS permet de quantifier la concentration de glycogène au niveau de coupes histochimiques de muscle. Afin de vérifier nos conditions expérimentales, les valeurs de la DO calculée à partir de la mesure de la lumière transmise à travers les coupes, colorées au PAS un an auparavant, ont été portées contre les valeurs de la concentration en glycogène, obtenues par dosage biochimique de biopsies entières prélevées simultanément à l'échantillon histologique (figure 3). Cette comparaison révèle une corrélation statistiquement significative ($r = 0.668$, $P < 0.001$) qui confirme la spécificité de la technique de coloration au PAS quand elle est utilisée, comme dans le cas présent, au dosage du glycogène de muscles squelettiques.

Le pourcentage de fibres jugées sur photographies comme positives, intermédiaires et négatives en concentration de glycogène pour chacun des trois types de fibre de muscle de boeuf (FG, FOG et S0) est présenté dans la figure 4. Des différences importantes sont apparentes entre la réponse des fibres de type S0 comparée à celles des fibres de type FG et FOG. L'analyse statistique de ces données (tableau 2) a confirmé une interaction significative entre le type de fibres et le taux de glycogène, dans tous les cas ($P < 0.001$). Toutefois, l'interaction entre le type de fibre et le temps (TF) et le taux de glycogène n'est significative que pour les fibres intermédiaires ($P < 0.001$) et négatives ($P < 0.05$) en concentration de glycogène.

Au cours de la première période de 5 heures les fibres de types FG et FOG ont montré une diminution du pourcentage des fibres positives en glycogène et une augmentation correspondante du pourcentage des fibres intermédiaires et négatives en glycogène. Au même moment les fibres S0 ont subi une importante diminution du pourcentage de fibres positives et intermédiaires en concentration de glycogène compensé par un très important accroissement du pourcentage de fibres négatives en glycogène. Au cours de la période s'étendant de +3h à +5h une perte plus importante de glycogène a été observée et le pourcentage des fibres de type FG et FOG chute à 20% pour les fibres positives en glycogène et atteint 40 % pour les fibres intermédiaires et 35 % pour les fibres négatives en concentration de glycogène. Le fait remarquable de la fin de cette période théorique de stress (à +5h) a été la presque totale absence de fibres de type S0 positives et intermédiaires en glycogène et la valeur correspondante très élevée qui atteint 85 % du pourcentage de fibres du même type négatives en glycogène (figure 4).

Au cours de la phase initiale de repos ultérieur (+24h) les fibres de types FG et FOG ont présenté un très léger accroissement de leur concentration en glycogène. Ceci était dû à une diminution du pourcentage de fibres négatives et à une augmentation correspondante du pourcentage de fibres positives en glycogène. Par contre, les fibres de type S0 ont subi une perte ultérieure de glycogène à +24h. Ceci s'est soldé par un déclin substantiel du pourcentage de fibres positives en glycogène (6 % → 1 %) et par une augmentation du pourcentage de fibres négatives en glycogène, pourcentage qui atteint alors 92 %.

Après la phase finale de reconstitution (24h → 72h) les trois types de fibres ont montré une égale élévation de leur contenu en glycogène. Ceci s'est manifesté par un léger accroissement des pourcentages de fibres positives et intermédiaires en glycogène pour les fibres de type rapide et par une augmentation plus importante pour les

fibres de type SO. Toutefois près de 20 % des fibres des trois types sont restées négatives en concentration de glycogène à 72 heures, ce qui confirme la reconstitution, seulement partielle des réserves de glycogène, mise en évidence précédemment par le dosage biochimique de la concentration en glycogène qui ne retrouvait que 73 % de la valeur au repos après 72 h.

CONCLUSIONS

Les trois principaux types de fibres des muscles de boeuf subissent des changements de leur réserve en glycogène lorsque l'animal a reçu de l'adrénaline par injection sous cutanée et au cours du repos ultérieur. Un épuisement sélectif du glycogène se produit entre les fibres SO et les deux autres types de fibres (FG et FOG). Les pertes en glycogène des fibres de type SO sont légèrement plus rapides et beaucoup plus profondes que celles qui ont lieu dans les fibres de type FG et FOG.

Ces résultats sont en parfaite opposition avec ceux que nous avons obtenus en analysant selon le même schéma des taurillons de race Frisonne au cours d'un stress comportemental et du repos ultérieur (A. LACOURT et P.V. TARRANT, 1980). Un recrutement massif des deux types de fibres rapides (FG et FOG) se produisait au cours du stress naturel auquel était associé un niveau intense d'activité physique. Lorsque les réserves en glycogène des fibres FG et FOG commençaient à être épuisées, les fibres SO étaient graduellement mobilisées. Ce modèle ressemblait à ce qui avait été observé chez l'homme au cours d'un travail musculaire d'une grande intensité (EDGERTON et al, 1973) et contrastait avec ce qui avait été observé au cours d'un travail musculaire modéré mais prolongé, où les fibres SO perdaient alors les premières leurs stocks de glycogène. Les pertes de glycogène par les fibres SO pendant le début du repos qui suivait la période de stress comportemental (A. LACOURT et P.V. TARRANT, 1980) n'avaient pas été expliquées.

Comme nous le montrons dans l'expérience présente, l'action de l'adrénaline seule provoque un recrutement général des fibres mais amène les fibres SO à perdre totalement leur glycogène et cela pendant 24 heures. Il est possible de penser que les animaux réagissent au cours d'un stress hormonal par une perte générale de glycogène mais avec une ampleur qui peut être liée au type de fibre. Une période de repos de l'ordre de 3 jours permet aux fibres de reconstituer partiellement leurs réserves.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Y. GEAY et D. LEVIEUX qui nous ont fourni les animaux utilisés dans cette étude et C. TOURAILLE pour les précieux conseils qu'il nous a donnés au cours de l'analyse statistique.

BIBLIOGRAPHIE

- EDGERTON V.R., ESSEN Brigitta, SALTIN B. and SIMPSON D.R., 1973. Glycogen depletion in specific types of human muscles fibres in intermittent and continuous exercise - In "Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise"; Proc. Second International Symposium on Biochemistry of Exercise, MAGGLINGEN - Editors : H. HOWALD and J.R. POORTMANS - Birkhauser Verlag Basel.
- GOLLNICK P.D. ARMSTRONG R.B., SEMBROWICH W.L., SHEPHERD R.E. and SALTIN B., 1973. Glycogen depletion pattern in human skeletal muscle fibres after heavy exercise. J. Appl. Physiol. 34 (5): 615-618.
- HALKJAER-KRISTENSEN J. and INGEMANN-WANSEN T., 1979. Microphotometric determination of glycogen in single fibres of human quadriceps muscle - Histochem. J., 5, 11: 629-638.
- LACOURT A. and TARRANT P.V., 1980. Selective glycogen depletion and recovery in skeletal muscles fiber types of young bulls subjected to a behavioural stress. In "The Problem in Dark Cutting in Beef". Proc. Seminar in the EEC programme of coordination of Research on Animal Welfare, Brussels - Editors D.E. HOOD and P.V. TARRANT. Martinus Nijhoff Publishers The Hague - Netherlands.
- SWATLAND H.J., 1980. Cytophotometry of post mortem glycogenolysis in quiescent bovin muscle fibres in relation to temperature succinate dehydrogenase activity and adenosine triphosphatase activity. Histochem. J. 12: 39-47
- TARRANT P.V. and SHERINGTON J., 1980. An investigation of ultimate pH in the muscles of commercial beef carcasses. Meat Science, 4: 287-297

Temps au repos : 0 h	Rythme cardiaque 95 + 2.5	Température corporelle 39.2 + 0.07
+ 3 h	120 + 5.4 P<0.0006	39.3 + 0.08 NS
+ 5 h	109 + 4.6 P<0.025	39.4 + 0.14 P<0.2
+ 24 h	101 + 3.0 P<0.2	39.6 + 0.11 P<0.01
+ 72 h	98 + 3.2 NS	39.2 + 0.14 NS

Tableau 1 - Rythme cardiaque et température corporelle de taurillons Frisons soumis à des injections sous cutanées d'adrénaline. Les valeurs moyennes + SEM sont présentées pour 8 animaux excepté pour le point + 3h = 4 animaux. Les différences des résultats par rapport à la valeur moyenne au repos ont été testées par le test t de student.

Source de variat

A
T
F
AT
AF
TF

Résiduel

Tableau 2 : A
positives (+),
(T) et le type
**



Figure 1 - An
photographies
début du stre
à activité AT
fier les fibr
Les photograp
différents ce
est : A, écha
EFGH après 72

Source de variation	Degré de liberté	Carrés moyens		
		Glycogène +	Glycogène ±	Glycogène -
A	7	259.9 ***	45.9 *	274.5 ***
T	4	466.9 ***	25.7 NS	409.3 ***
F	2	366.5 ***	151.6 ***	218.7 ***
AT	28	28.7 *	36.0 **	36.9 *
AF	14	51.3 ***	49.1 **	60.9 ***
TF	8	12.9 NS	70.5 ***	41.1 *
Résiduel	56	15.0	17.3	18.2

Tableau 2 : Analyse factorielle de variance utilisant la transformation arc-sinus des pourcentages fibres positives (+), intermédiaires (±) et négatives (-) en concentration de glycogène, avec les animaux (A) le temps (T) et le type de fibre (F) comme facteur de variation
 *** P<0.001 ** P<0.01 * P<0.05

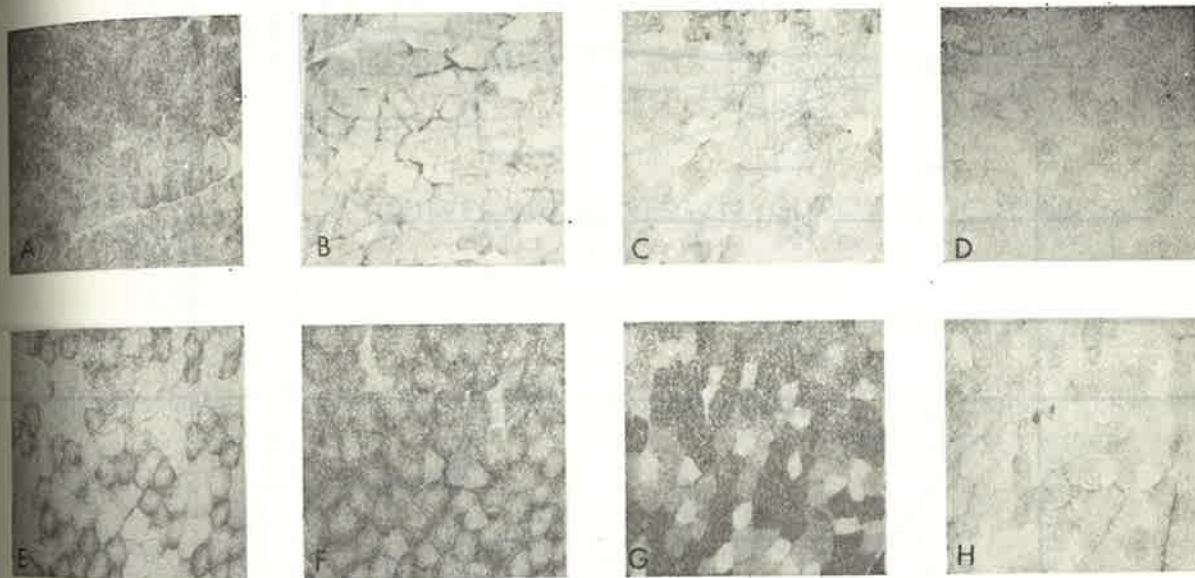


Figure 1 - Analyse histochimique des échantillons pris par biopsies du M. Longissimus dorsi de taurillons. Les photographies microscopiques de E à H représentent les coupes séries du même échantillons pris 72 h après le début du stress. E, activité de la succinate déshydrogénase ; F activité de glycerophosphate déshydrogénase ; G activité ATPasique après préincubation à pH 10.2 ; H, glycogène coloré au PAS. Ce procédé a permis d'identifier les fibres individuelles (E=G) et d'estimer leur teneur en glycogène (H). Les photographies microscopiques de A à D montre la teneur en glycogène musculaire dans les biopsies pris aux différents temps pour le même animal. La séquence complète d'hydrolyse et de resynthèse du glycogène musculaire est : A, échantillon contrôle, B après 3 h de stress, C après 5 h de stress, D après 24 h de reconstitution, EFGH après 72 h de repos (grossissement : x 80)

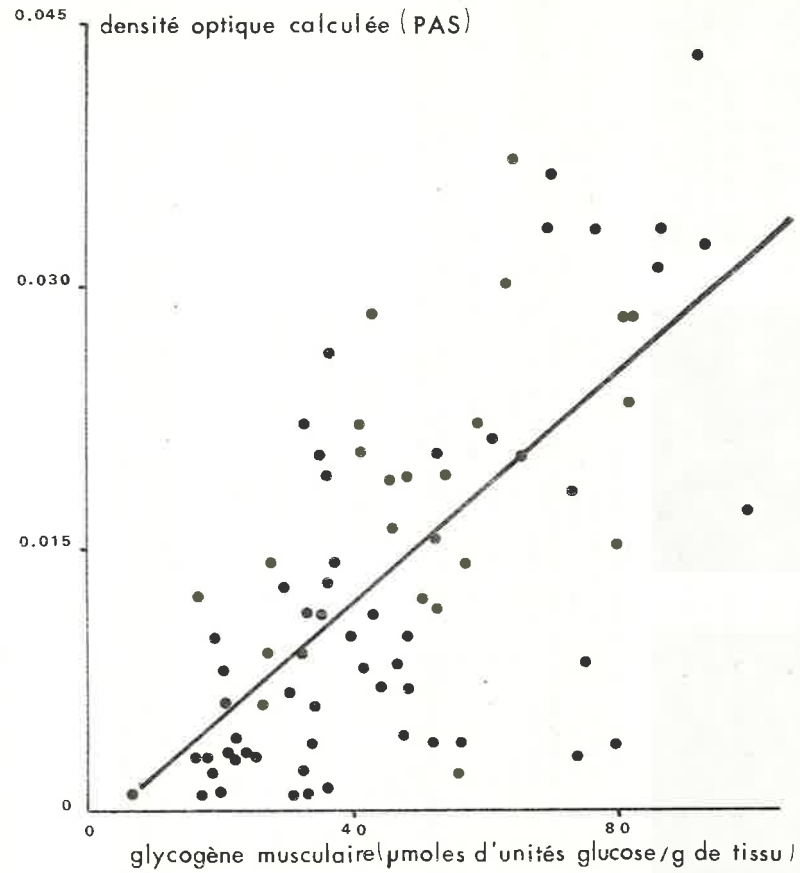


Figure 3 - Corrélation entre les concentrations en glycogène de biopsies du M. Longissimus dorsi de taurillons frisons mesurées par dosage biochimique et la DO calculée à partir des coupes histochimiques correspondantes colorées par la technique au PAS. ($r = 0.668$, $P < 0.001$)

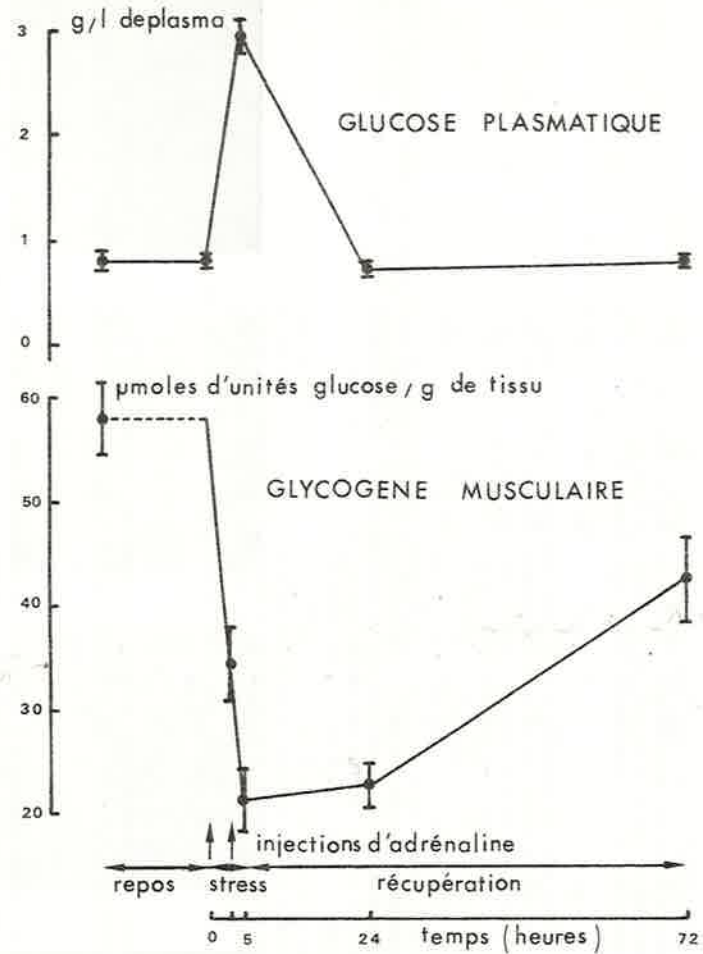


Figure 2 - Concentrations du glucose plasmatique et du glycogène musculaire de taurillons frisons au repos, après injection sous cutanée d'adrénaline et au cours de la récupération. Les valeurs moyennes et les erreurs standard sont présentées pour huit animaux.

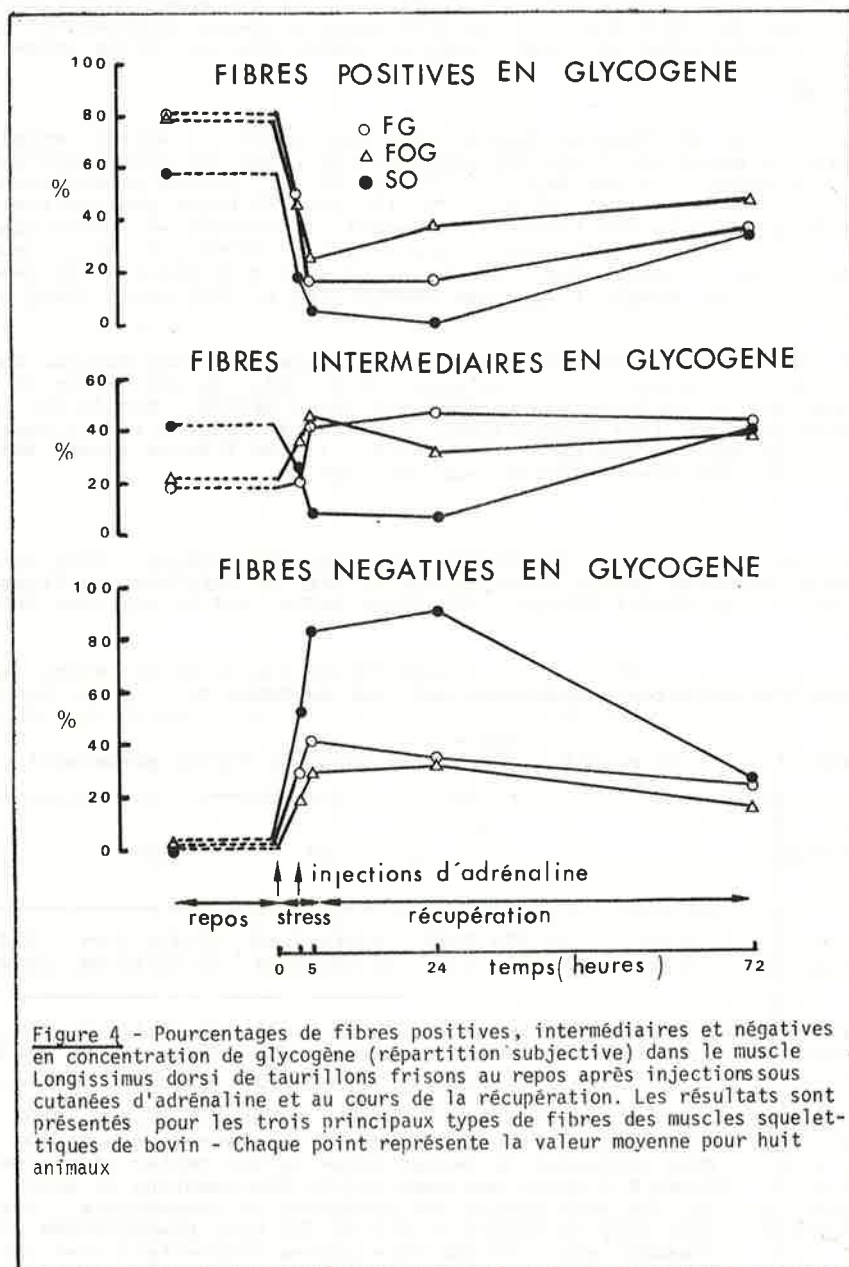


Figure 4 - Pourcentages de fibres positives, intermédiaires et négatives en concentration de glycogène (répartition subjective) dans le muscle Longissimus dorsi de taurillons frisons au repos après injections sous cutanées d'adrénaline et au cours de la récupération. Les résultats sont présentés pour les trois principaux types de fibres des muscles squelettiques de bovin - Chaque point représente la valeur moyenne pour huit animaux