## 8.7 <u>Italiements aux hormones anabolisantes et qualités de la viande</u>

G. DEGAND, P. EVRARD, J.P. DUCHATEL et G. MAGHUIN-ROGISTER

laboratoire d'analyse des denrées alimentaires d'origine animale Paculté de Médecine vétérinaire, 45, rue des Vétérinaires, 1070 Bruxelles, Belgique.

## Introduction

Les agents anabolisants augmentent la rétention azotée et le dépôt de protéines au fiveau musculaire chez les animaux traités. La régulation de la synthèse des protéines par les hormones anabolisantes chez les animaux de boucherie 1976, 1930. A côté de cet effet positif qui permet aux fermiers de produire 1976, 1930. A côté de cet effet positif qui permet aux fermiers de produire doit produire de viande, plus rapidement, avec une consommation moindre d'aliments, on a la predace en compte les craintes des consommateurs et des hygiénistes quant utilisées acude résidus d'hormones dans la viande. Les hormones anabolisantes ou progestagêne. La présence de résidus dans la viande risque donc de perturnou una consecuellement ont toutes une activité sexuelle androgène, oestrogène ler la fonction sexuelle des consommateurs. De plus, plusieurs de ces hormones hormonaux une baisse de la qualité de la viande ainsi produite.

No mobreux travaux ont porté sur la détermination de la teneur en résidus d'hormones dans la viande et les organes comme le foie et les reins. Tous ont fauteur à la démonstration que ces résidus étaient en concentration très faible utilisation d'implants, respect des doses et des délais d'abattage prescrits in particulier, les résidus libres, c'est à dire ceux qui sont extractibles par tis de particulier, les résidus libres, c'est à dire ceux qui sont extractibles par les colvents organiques et qui peuvent être dosés par radioimmunologie ou par chromatographie, ne représentent qu'une faible proportion des résidus (10% aqueux ces de la trenbolome). D'autres sont extractibles par les tampons intracellulaires (Ryan et Hoffmann 1978). Ces divers types de résidus doivent les études à propos de l'influence des traitements anabolisants sur la qualité veux de boucherie (Verbeke 1976, van Weerden 1982).

di la viande sont beaucoup moins nombreuses. La plupart ont trait à des veux de boucherie (Verbeke 1976, van Weerden 1982).

valux de boucherie (Verbeke 1976, van Weerden 1982).

du cours de ce travail, nous avons évalué l'influence de l'administration diverses hormones sur la qualité de la viande de taurillons. La comparaison autre animaux traités et non traités a porté sur les caractéristiques des la taglasimus Dorsi et M. Diaphragma. Les caractéristiques examinées étaient : de la viande le sanché après hydrolyse et a viande : les schémas d'électrophorèse en gel des fractions sarcoplasmiques ainsi que la teneur en matériel contenant de l'hydroxyproline" dans le jus éta parte de la viande. Le cuisen. Ce dernier critère a été misen relation avec la tendreté, qui a et partéciée par la mesure des forces de cisaillement selon Warner-Bratzler par la feystation. Enfin l'étude de la qualité de la viande a été complétée la pesée de la perte de jus à la cuisson.

Se qui corren les résidus, les résidus de trenbolone extractibles par les résidus organiques ont été dosés par radioimmunologie. Tandis que la significatude de la ur formation "in vitro" en présence de microsomes de foie de

tritiée(l uCi,200 nmoles), de <sup>35</sup>S-GSH(l uCi,5 mM) et de GSH-transférase (l mg). Les incubations étaient conduites à 37°C pendant 30 min. La réaction était arrêtée par addition d'acide perchlorique. Les témoins étaient obtenus par inactivation des microsomes dans un bain d'eau bouillante (l0 min). La liaison covalente était mesurée selon Pohl et Branchflower (1981). Après arrêt de la réaction et centrifugation, les culots étaient dissous par le Soluene-350 (Packard) et 10 ml de Dimilume-30 (Packard) étaient ajoutés à chaque fiole. La radioactivité était mesurée dans un compteur à scintillation liquide Intertechnique SL 4000.

## Résultats

Les teneurs en protéines totales des M. Longissimus dorsí sont données au Tableau I (Essai 1).

Table 1. Total protein content of lyophilized M. Longissimus dorsi.

Teneur en % en protéines totales (Nx6,25) de lyophilisats de M. Longissimus dorsi (12 taurillons).

	n	×	S
Groupe I (culards anabolisés)	3	87,60	0,98
Groupe II (culards témoins)	3	87,89	1,22
Groupe III (mixtes anabolisés)	3	83.30	2,14
Groupe IV (mixtes témoins)	3	82,58	1,02

Table 2. Amino acid composition of lyophilized muscles.

Teneur en acides aminés en g d'acide aminé/100 g d'acides aminés

	Cular	ds lisés	Cular témoi		Mixte	s lisés	Mixte témoi	
	×	C.V.	×	C.V.	×	C.V.	x	_C.V
	n=3		n=3		n=3		n=3	
Acide aspartique	10,3	2,6	10,4	2,9	10,4	3,5	10,3	3,9
Thréonine	5,0	2,3	5,0	0,5	5,0	2,6	5,2	9,4
Sérine	4,3	6,1	4,2	1,8	4,3	2,3	4,5	13,9
Acide glutamique	17,5	5,2	17,6	3,2	17,5	1,8	17,1	2,9
Proline	3,7	1,6	3,8	2,5	3,9	10,4	3,9	2,1
Glycine	4,5	19,3	4,0	1,6	4,1	2,2	4,2	3,2
Alanine	5,4	4,8	5,6	4,6	5,5	2,3	5,6	0,7
1/2 cystine	1,0	1,2	1,0	2,6	1,0	4,8	1,0	4,6
Valine	4,5	0,9	4,6	1,4	4,6	3,6	4,8	1,8
Méthionine	2,5	5,3	2,5	4,8	2,5	4,9	2,6	2,9
Isoleucine	4,1	2,9	4,4	0,9	4,3	0,7	4,2	2,5
Leucine	8,5	6,8	8,0	7,4	8,0	3,3	8,0	4,0
Tyrosine	3,6	4,4	3,6	1,9	3,6	0,6	3,6	5,4
Phénylalanine	4,6	2,4	4,7	0,6	4,7	1,1	4,7	4,3
Lysine	9,2	4.7	9,4	3,2	9,2	0,3	9,3	1,0
Histidine	4,1	8,1	4,1	3,4	4,2	1,4	4,1	8,1
Arginine	6,3	2,6	6,5	1,1	6,5	4,0	6,6	1,7

Dans le but d'éliminer les variations possibles dues aux fluctuations de teneur en protéines des lyophilisats, tous les résultats ont été rapportés en g d'acide aminé/g d'acides aminés tot. Les résultats sont repris dans le tableau 2 dans lequel apparaissent les 4 groupes expérimentaux comprenant chacun 3 animaux. Des coefficients de variation parfois très importants (19,3%,13,93%) indiquent une hétérogénété marquée au sein de certains groupes. Ces variations individuelles entre animaux se marquent d'autant plus que les populations sont réduites au sein d'une même classe, à 3 éléments.

boying. En particulier, le rôle des mono-oxygénases hépatiques a été défini en concerne la formation de métabolites réactionnels de la trenbolone. Matériel et méthodes

larde), al luteur presessor, provided and inferior and the presessor of the provided and present a serior of the present a serior of t

de Melle).

\$\frac{4}{8} \text{des Melle}\$,
\$\frac{4}{8} \text

Les teneurs moyennes en collagène des M. Diaphragma (Essai 2) sont reprises au tableau 3.

Table 3. Collagen content (%) of M. Diaphragma.

Teneur en collagène (en pourcents) des M. Diaphragma.

	Abattage n°l				Abattage n°2				Abattage n°3			
Anabolisés	n 2	s 0,84 0,1	C.V.	$\frac{n}{6}$	x 0,81	s 0,07	C.V. 8,6		x 0,79		C.V. 8,8	
Témoine	5 (	93 0 0	9 10 1	6	0.96	0.07	7.3	5	0.94	0.06	6,4	

L'analyse de variance des résultats présentés au tableau 3 a été réslisée avec deux critères de classification (abattage et traitement) en tenant comp des nombres inégaux des sous-classes. Elle a montré une différence significative (p<0,001) entre animaux traités et non traités, alors qu'il n'y avait pas de différence significative entre les trois abattages (Test de Duncan).

Les figures l à 4 montrent les densitogrammes comparatifs des électropho-rèses réalisées, en milieu réducteur SDS, sur des extraits sarcoplasmiques et myofibrillaires de muscle d'animaux anabolisés et témoins ( Essai 2 ). Les zônes hachurées correspondent aux déviations standards calculées (n=9).

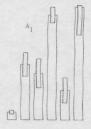




Diagramme comparatif de 6 fractions protéiques sarcoplasmiques.

A<sub>1</sub>: treated animals anabolisés

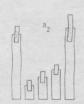
B1: untreated animals

Fig. 3-4 Comparaison of intensi-Comparaison of Intensi-ties of 5 electrophore-tic bands of myofibril-lair proteins. Diagramme comparatif de 5 fractions protéiques myofibrillaires.

A2: treated animals anabolisés

B<sub>2</sub>: untreated animals témoins





Les résultats des déterminations réalisées sur M. Longissimus dorsi des animaux de l'essai 3 sont donnés aux tableaux 5,6 et 7.

Table 5. Analysis of M. Longissimus dorsi (Assay 3) for total protein content, total pigments, hydroxyproline content in cooked meat.

Détermination du contenu en protéines totales, en pigments totaux, en hydroxyproline dans la viande cuite pour les M. Longissimus dorsi des animaux de l'Essai 3.

	Protéines totales (en %)			Pigments totaux <sup>b</sup>			Hydroxyproline dans la viande cuite c.		
	×	s	C.V.	×	s	C.V.	×	S	C.V.
Témoins	24.9	0,3	1,4	148	26	17,7	1067	80	7,5
TBA+E2(1x)	24,5	1,0	4.0	114	3	2,7	1002	312	31,1
TBA+E2(2x)	24.0	0,1	0,4	125	3	2,5	998	88	8,8
PROG+E2(1x)	24.8	0.8	3.1	126	13	10,0	1034	111	10,7
PROG+E2(2x)	24.9	0.3	1.1	142	14	9,6	991	84	8,5
ZERANOL(2x)	24,4	0,6	2,3	145	36	24,7	1087	237	21,8

a) Nx6,25 selon Kjeldhal. b) en ppm d'hémine. c) en µg d'hydroxyproline par

Table 6. Hydroxyproline content and amount of cooking juice from M.Longissimus

		en hydroxyp de cuisson	roline dans	Perte de	cuisson .	
	x	s	C.V.	x	s	C.V.
Témoins	226	65	28,8	25,4	0,3	1,3
TBA+E2(1x)	159	34	21,1	24,7	2,2	9,1
TBA+E2(2x)	179	42	23,6	26,8	1,3	5,0
PROG+E2(1x)	196	32	16,6	25,4	1,4	5,4
PROG+E2(2x)	166	1	0,4	26,1	0,6	2,2
ZERANOL(2x)	203	9	4,2	24,2	1,2	5,0

a) en μg d'hydroxyproline par g de jus. b) en g de jus par 100 g de viande.

Table 7. Tenderness measured by WARNER-BRATZLER shear force values (in kg) and by pannel appraisal.

Appréciation de la tendreté par mesure de la résistance au tranchage

(en kg) et par jugement du pannel de dégustation.

	A Jugement du	Résistance au tranchage	Classem	ent	
	pannel	kg + s	_ A	В	
Témoin	1,50	2,84 + 0,82	1	1	
Témoin	3,00	4,11 - 0,67	10	8	
TBA+E2(1x)	2,63	4,62 + 0,78	7	9	
TBA+E2(1x)	2,25	4,82 - 1,21	5	11	
TBA+E2(2x)	4,00	4,72 - 0,73	11	10	
TBA+E2(2x)	4,25	7,47 = 1,86	12	12	
PROG+E2(1x)	1,63	2,97 = 0,49	2-3	2	
PROG+E2(1x)	2,71	3,72 = 0,95	8-9	5	
PROG+E2(2x)	2,71	4,02 - 0,98	8-9	6	
PROG+E2(2x)	2,14	3,37 = 0,60	4	4	
ZERANOL(2x)	2,50	4,07 - 0,58	6	7	
ZERANOL(2x	1,63	3,33 - 0,83	2-3	3	

Sur chaque échantillon de M. Longissimus dorsi,2 ou 3 tranches de 3,5 cm d'épaisseur furent découpées,perpendiculairement à la direction des fibres. Une fois placées sous vide en sac de polyéthylène, les tranches furent plongées dans un bain marie à 75°C pendant 60 min. Après refroidissement de 10 min des sacs sous eau courante, le jus relaché par la viande fut prélevé et pesé pour la détermination de la perte de jus à la cuisson (exprimée en % du poids initial de la viande. Des forages de 1,27cm de diamètre furent ensuite pratiqués parallèlement aux fibres et répartis au hasard pour l'évaluation objective et subjective de la tendreté. Dix prélèvements étaient destinés à l'évaluation par cisaillement et chaque membre du pannel recevait 2 échantillons de forage de chaque muscle pour l'évaluation subjective. Chaque session de dégustation eutlieu à 11 h du matin; une échelle hédonique de 8 unités a été utilisée pour l'appréciation de chaque dégustateur : l= extrêmement tendre, 2 = très tendre,3 = tendre,4 = assez tendre,5 = peu tendre,6 = peu dur,7 = assez dur,8 = très dur. C'est la valeur moyenne des appréciations de ces 10 dégustatours qui est reprise dans la première colonne du tableau 7.

Table 8. Levels of trenbolone residues in M.Diaphragma (pg/g of muscle)
Concentrations en résidus de trenbolone dans les M.Diaphragma (pg/g)

Day after implantation	Traitement						
Délai d'abattage (jours après implan- tation)	n	TBA+1	E2(1x)	n	TBA+E2(2x)		
66	4	95	30	3	70 - 27		
76	6	47	19				
87	2	63	60	4	55 - 31		
110	6	25	10				
114	4	44	25	2	47 - 38		
124	6	35	21				
138	6	32	- 33				
211	5	12	+ 4				
231	2	27	- 12				
252	2	5	- 8				
280	4	23	- 14				

Les concentrations en résidus de trenbolone déterminées par radioimmunologie, sont donnés au tableau 8. La trenbolone glucurono et sulfo-conjuguée était en quantité trop faible dans les muscles pour y être dosée. On remarque que les résidus dans la viande des animaux implantés 2 fois sont du même ordre de grandeur que ceux des animaux implantés une fois.

En ce qui concerne la formation des résidus covalents, le tableau 9 montre la répartition de la radioactivité dans le milieu d'incubation après extraction par les solvants organiques. Pour les témoins, la majeure partie de la radioactivité était soluble en phase organique et une petite fraction de celle-ci se trouvait en phase aqueuse. La radioactivité liée aux protéines n'était pas significativement différente du bruit de fond. Dans les incubats de microsomes intacts, la radioactivité liée aux protéines représentait 3,72% du total. La concentration en métabolites réactionnels fixés sur les protéines était environ 0,7 nmole d'équivalent trenbolone par mg de protéines. La liaison covalente était négligeable lorsque l'incubation était conduite en anaérobiose (sous atmosphère d'azote).

Table 9. Distribution of radioactivity after incubation with liver microsome: in the presence of tritiated trenbolone (% total radioactivity) Distribution de la radioactivité après incubation de microsomes héps tiques bovins en présence de trenbolone tritiée.

	En présence de microsomes	Témoins	
Fraction organique Fraction aqueuse	16,9 + 3,5 (n=4) 72,1 + 6,4 (n=4)	92,1 + 5,4 (n=2) 4,3 + 0,5 (n=2)	
Radioactivité liée	3,7 ± 0,4 (n=6)	0	

Les valeurs moyennes sont données avec les déviations standards et sont mées en  ${\mathbb Z}$  de la radioactivité totale.

Le tableau 10 montre les effets du glutathion et de la glutathion-S-transférsur l'ampleur de la liaison covalente. L'absence de cofacteurs (NAPPH) rébutsait considérablement cette liaison. L'addition au milieu d'incubation de glutathion réduit (GSH) et de GSH-S-transférase dininuait sensiblement la jason. Cependant l'enzyme avait un effet moins marqué. Enfin, leur addition similande provoquait un effet plus marqué qu'enprésence de GSH seul.

Table 10. Effect of the addition of reduced glutathion (GSH) and of GSH-55 transferase on covalent binding of reactive metabolites to trendel

ne. Effet de l'addition de gluthation réduit (GSH) et de GSH-S-trans férase sur la liaison covalente des métabolites téactionnels de la

	trenbolone.			14
Cofacteur	GSH	GSH-S-transférase	Liaison a	Diminution de la liaison
+	District Control	Street world work made	831 + 98	0
+	+	THE RESIDENCE OF THE PARTY OF THE PARTY.	540 + 21	36
-000	FOR THE CASE WHILE	Contract of the secretary	47 + 10	94
+	-	terms of the state of the state of	738 + 19	22
+	+	A TOP OF THE STATE OF THE	500 + 20	40 ex

a) Les valeurs moyennes sont données avec les déviations standards et si primées en pmoles d'équivalents trenbolone par mg de protéines. b) Les valeurs sont exprimées en % de la liaison covalente totale.

b) Les valeurs sont exprimées en % de la liaison covalente totale.

Discussion
Nous avons évalué l'influence de traitements anabolisants sur les qualités de la viande de taurillons. La composition de M. longissimus dorsi était signifiaire chez les animaux anabolisés et les témoins en ce qui concerne la tener en protéines et la composition en acides aminés après hydrolyse de la viande La comparaison des schémas d'électrophorèse sur gel des protéines sarcor plasmiques et myofibrillaires n'indiquait aucune différence entre les taurillons traités et non traités. Les muscles des deux groupes d'animaux présentaient une même teneur en pigments totaux.

Les valeurs du dosage du collagène total réalisé sur M. diaphragma étaient significativement plus basses pour les animaux anabolisés. Le dosage de l'hydroxyproline solubilisée dans le jus de cuison des muscles représentait un bon critère pour l'appréciation de leur tendreté. Celle-ci a également été estimée à partir des valeurs des forces de cisaillement selon Warner-Bratzler. Il est apparu que l'anabolisation des taurillons ne modifibilion in la tendreté, ni la capacité de rétention d'eau durant la cuisson.

Nos résultats indiquent cependant une variabilité importante entre animaux d'un nême groupe, traités ou non traités. Nos conclusions rejoignent celle

de travaux antérieurs réalisés sur des veaux anabolisés (Van Weerden, 1982; Verbeke et al, 1976). Cependant l'analyse statistique des résultats du dossé du collagène, en tenant compte des effectifs inégaux des sous-classes a montré, en ce qui nous concerne, une différence significative entre animals traités et non traités, la viande des animaux traités étant moins riche en collagène total.

collagène total.

A quantité de résidus de trenbolone, extractibles par les solvants organique dans les muscles (M.diaphragma) a été mesurée par dosage radioimmunolos que la sensibilité était inférieur à 0.01 ppb. Les niveaux de résidus dans les muscles, mesurés pour différents délais entre l'abattage et la dernière implantation, étaient très bas: inférieurs à 0.15 ppb après 66 jours.

Leurs valeurs diminuaient progressivement jusqu'à 0.02 ppb après 280 jours.

Ces concentrations sont extrémement faibles par rapport au "non hormonal effect level" évalué pour l'acétate de trenbolone (Foxcroff et al. 1983).

Cependant, une publication antérieure (Ryan et Hoffmann, 1978) a montré que résidus non extractibles par les solvants organiques représentaient des résidus totaux de trenbolone dans la viande ou le foie des animaux traités. La formation des résidus de trenbolone liés de manière covalent aux macromolécules intracellulaires a été étudié in vitro en présence de microsomes hépatiques de bovins. Notre étude a démontré que les moro oxygénases hépatiques de bovins. Notre étude a démontré que les moro réactionnels de la trenbolone. Ceux-ci sont capables soit de réagir avec de protéines microsoméales soit de subir une détoxication par conjugaison au glutathion ou aux glutathion-S-transférases. Si on tient compte des propénysico-chimiques (solubilité dans l'eau, stabilité) des composés dont fep partie les résidus liés, il est raisonnable de penser que les résidus de trenbolone ne présentent pas de toxicité pour le consommateur de viande (Evrard et al, 1983).

Remerciements

Le traitement des animaux a été réalisé par le service de nutrition de notri faculté (Prof. J.M. Bienfait). Le Dr lambot nous a aimablement aidé pour l'analyse statistique des résultats. Nous remercions le Dr Jouquey (Rougsel UCLAF) pour les dons de trenbolone tritiée et d'anticorps anti-trenbolone ainsi que le Prof. Demeyer (Faculté agronomique de Melle) pour la réalissiée des tests de tendreté. Ce travail a été financé par l'IRSIA (Institut pour l'Encouragement de la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture).

Références

Bergman I. and Loxley R., 1969, Analyst, 94, 575. Bradford M.M., 1976, Apalishen. 72, 248. Bureat-Sacaze V., Delatour P. and Rico A., 1981, Ann. Wet., 13, 277. Duchatel J.P., Evrard P. and Maghuin-Rogister G., 1981, 84. Med. Vet., 126, 147. Evrard P., Dath M., Degand G. and Maghuin-Rogister G., 1983, Symposium on the safety evaluation of animal drug residues. Bergin 1983, Symposium on the safety evaluation of animal drug residues. Bergin 27-29, sous presse. Foxcroft G.R., Cameron D.M. and Bouffault J.C., 1981, analysis of the safety evaluation of animal drug residues. Bergin 1983, Symposium on the safety evaluation of animal drug residues. Bergin 1971, analysis of the safety evaluation of animal drug residues. Bergin 1983, Symposium, Paris, Feb 15-17, 347, 1984, Hornsey H.C., 1956, J. Sci. Food Agric., 7, 534. Moore S. and Stein W. Anal. Chem., 30, 1185. Neville D.M., 1971, J. Biol. Chem., 246, 6326, 1985