

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE  
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET  
DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

I.N.A.T.A-A.

N° d'ordre :

N° de série :

*Thèse*

Présentée à l'Université Mentouri de Constantine  
pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**  
(SPÉCIALITÉ : SCIENCES ALIMENTAIRES)

Soutenue le 15 décembre 2009

Par Samira BECILA - HIOUAL

---

**Marqueurs biologiques de la qualité  
de la viande ovine et caractérisation de la mise  
en place de l'apoptose**

---

Jury composé de :

Président :	Pr. SELSELET ATTOU Ghanem	Professeur – INFSA - Mostaganem
Encadreur :	Dr. OUALI Ahmed	Directeur de recherche – INRA de THEIX
Co-encadreur :	Dr. BOUDJELLAL Abdelghani	Maitre de Conférences - INATAA – Université Mentouri de Constantine
Examineurs :	Pr. AGLI Abdelnacer	Professeur - INATAA – Université Mentouri de Constantine
	Dr. ROCK Edmond	Directeur de recherche – INRA de THEIX
	Pr. KHELIFI Douadi	Professeur – Faculté des sciences de la nature et de la vie – Université Mentouri de Constantine

*Chaque progrès donne un nouvel espoir, suspendu à la solution d'une nouvelle difficulté*

*Claude Lévi-Strauss*

*Merci à DIEU de m'avoir donné le courage et la force de finir ce travail*

*J e voudrais remercier ma famille, tout*

*Particulièrement mes parents et beaux parents qui m'ont toujours soutenue dans mes choix,*

*et qui m'ont donnée la force de parvenir jusque là.*

*Merci à toi Khaled,*

*toi qui as supporté tous mes moments de doutes et de désespoir.*

*Merci à mes puces Riad, L yna et H aroune*

*Merci d'exister et merci pour votre amour*

*Merci Fatou pour ta complicité,*

*J e dédie cette thèse :*

*A la mémoire de Mohamed Mouadab*

*Qu'il repose en paix inchaleh*

## *Remerciements*

*Après six années de travail, il est difficile de trouver les mots justes pour remercier tous ceux qui m'ont apportée un soutien professionnel mais surtout personnel. Je vais tacher d'être concise.*

*Je souhaite remercier tout d'abord les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail : Monsieur SELSELET ATTOU Ghanem le président, Messieurs. AGLI Abdelnacer, EDMOND ROCK, KHELIFI Douadi les Examineurs, Messieurs OUALI Ahmed et BOUDJELLAL Abdelghani. C'est un immense privilège que de voir mon travail évalué par des chercheurs reconnus au niveau international.*

*Il me sera difficile d'exprimer en quelques mots toute ma reconnaissance à Mr Ahmed Quali, directeur du laboratoire de biochimie des protéines (Qualité des Produits Animaux-QuaPA, INRA-Clermont-Ferrand –Theix), qui a encadré mon travail et apporté son expérience au sujet. Merci de m'avoir prodigué tous les innombrables conseils et transmis cette culture de la recherche. Cette reconnaissance s'étend à la confiance qu'il m'a témoignée et à l'autonomie qu'il m'a très souvent laissée pour l'exécution de ces recherches.*

*Mes sincères remerciements vont à Monsieur Abdelghani BOUDJELLAL, Directeur de l'I.N.A.T.A.-A., et mon co-encadreur de thèse qui a été le point de départ de mon parcours atypique. Merci de m'avoir toujours épaulée avec beaucoup de gentillesse, de disponibilité et surtout de m'avoir filée le virus de la recherche sur la viande.*

*Je voudrais remercier le Gouvernement Algérien qui, à travers le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, a financé ma bourse en France.*

*Merci à toutes les personnes de l'unité QUAPA qui ont contribué à ce travail de près ou de loin. En particulier, Carlos H Herrera Mendez, Gerald Coulis, pour m'avoir communiquée leur enthousiasme au travers d'échanges constructifs et enrichissants. Merci à toute l'équipe QUAPA pour sa gentillesse, sa confiance et ses encouragements.*

*Merci à Xavier blanchet, Laure Bremaud, et l'ensemble de l'Unité de Génétique Moléculaire Animal (UMR1061-INRA-Université de Limoges) pour leur collaboration et leurs conseils en biologie moléculaire.*

*Au travers des différentes techniques que j'ai utilisées dans mon travail, j'ai collaboré avec un certain nombre de personnes. Ce travail ne verrait pas le jour sans leur compétence et leur professionnalisme :*

- ✓ *Merci au professeur KHELIFI Douadi d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire de génétique et amélioration des plantes j'ai vraiment été bien accueillie au sein de votre équipe. Merci à BENARIOUA Sabrina qui m'a appris à faire mon premier gel.*
- ✓ *Merci à Laurent Aubry qui n'a jamais hésité à consentir des efforts pour la bonne réalisation du travail de laboratoire. Que ce travail soit un témoignage de mon admiration pour ses compétences.*
- ✓ *Merci à Madame Brigitte Piccard de m'avoir reçu dans son équipe. (Unité de Recherches sur les Herbivores, Équipe Croissance et Métabolismes du muscle, INRA Clermont-Ferrand/Theix. Je remercie également Christine Barboiron, Arnaud Delavaud, Jean-Luc Montel pour leur aide est gentilles.*
- ✓ *Merci à Monsieur Jean-Louis Damez (Unité Qualité des produits animaux QuaPA) de m'avoir donnée de nombreux conseils pour la réalisation de la partie développement d'outils indispensables.*

*Un merci tout particulier à mon amie Fatiha SOUDANI, pour sa générosité sa gentillesse et son soutien, merci d'exister Fatou.*

*Je n'ai pas fait que bosser durant ces six années (si je compte bien) j'ai tissé de nombreuses amitiés et affinités. Je ne vais pas tout développer ici (ça pourrait être un sujet de thèse !!) mais vous savez que je vous apprécie beaucoup : Amar, Warda, Férial, Yasmine, Nora, Lynda, Samia, Amani, Delphine, Carlos, Gérard, Nils, Hajer, Ithem, ; Moustapha, Dounia, Abdel, Jean François, Bérengère, Leticia, Anthony, Claude, Nathalie, Soulimane, Rabah, Wadis, Jihen,...*

*Enfin, je voudrais remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées et qui ont contribué de loin ou de près à l'avancement de ma thèse, mes enseignants et collègues, le personnel administratif et technique de l'I.N.A.T.A.A. Ainsi que mes étudiants, pour la dimension humaine inestimable qu'ils ont manifestée à mon égard.*

# **SOMMAIRE**

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

**INTRODUCTION GENERALE..... 1**

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

*PREAMBULE..... 4*

### **1. LE MUSCLE STRIE**

<i>1.1. Organisation cellulaire .....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.1. La fibre musculaire.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.2. Le sarcolemme.....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.3. Le sarcoplasme .....</i>	<i>8</i>
<i>1.2. Les protéines majeures du muscle .....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.1. Les protéines sarcoplasmiques .....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.2. Les protéines myofibrillaires .....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.3. Les protéines contractiles .....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.4. Les protéines de la matrice extracellulaire .....</i>	<i>10</i>
<i>1.3. Les différentes catégories de muscles .....</i>	<i>10</i>

### **2. TRANSFORMATION DU MUSCLE EN VIANDE**

<i>2.1. L'état pantelant .....</i>	<i>12</i>
<i>2.2. Installation de la rigidité cadavérique .....</i>	<i>12</i>
<i>2.3. La maturation .....</i>	<i>14</i>

### **3. ATTENDRISSAGE DE LA VIANDE ET MECANISMES IMPLIQUES DANS LE**

#### **PROCESSUS DE MATURATION**

<i>3.1. Mécanismes physico-chimiques .....</i>	<i>15</i>
<i>3.1.1. La température .....</i>	<i>15</i>
<i>3.1.2. Le pH .....</i>	<i>16</i>
<i>3.1.3. La pression osmotique .....</i>	<i>18</i>
<i>3.1.4. La capacité de rétention d'eau .....</i>	<i>18</i>
<i>3.2. Mécanismes enzymatiques.....</i>	<i>19</i>
<i>3.2.1. Généralité dur les protéases.....</i>	<i>19</i>
<i>3.2.2. Les endoprotéases.....</i>	<i>21</i>
<i>3.2.2.1. Les sérine protéases.....</i>	<i>21</i>
<i>3.2.2.2. Les cystéine protéases .....</i>	<i>22</i>

3.2.2.3. Les aspartate protéinases .....	25
3.2.2.4. Les métalloprotéinases .....	25
3.2.2.5. Le protéasome .....	26
3.2.3 .Inhibiteurs endogènes des protéases et la science de la viande.....	27
3.2.3.1. Inhibiteurs de protéase a serine (serpines) .....	29
3.2.3.2. La Calpastatine .....	31
3.2.3.3. Les inhibiteurs de protéases à cystéine.....	32
3.2.3.4. Les inhibiteurs de métalloprotéases et de protéases acides .....	33
3.3. Les facteurs de variation de la tendreté de la viande .....	33
3.3.1. Les facteurs liés à l'animal.....	33
3.3.2. Les facteurs d'origine technologique .....	35

## **4 LES MORTS CELLULAIRES**

4.1. Les morts accidentelles .....	37
4.1.1. L'oncose.....	37
4.1.2. La nécrose .....	37
4.2. L'apoptose (Mort Cellulaire Programmée « MCP »).....	38
4.2.1. Caractéristiques morphologiques .....	40
4.2.2. Caractéristiques moléculaires et biochimiques.....	41
4.2.3. Régulation du processus apoptotique .....	41
4.2.4. Protéases à cystéine de l'apoptose (les caspases) .....	44
4.2.5. Les caspases et l'apoptose en science de la viande .....	48
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>49</b>

## **ETUDE EXPERIMENTALE**

<b>PREAMBULE</b> .....	<b>51</b>
------------------------	-----------

### **Chapitre 1 : CARACTERISATION PYHYSICO-CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE DE LA VIANDE D'AGNEAU.....**

<b>1. MATERIEL BIOLOGIQUE</b>	
1.1. Animaux .....	54
1. 2. Muscle.....	54
1. 3. Abattage et prélèvement des échantillons .....	54
<b>2. METHODES PHYSICOCHIMIQUES</b>	
2.1. Détermination de la température.....	55
2.2. Mesure du pH.....	55
2.3. Estimation de la capacité de rétention d'eau des PMF.....	55
2.4. Mesure de la conductivité électrique.....	56
<b>3. METHODES BIOCHIMIQUES</b>	
3.1. Détermination immunologique de la teneur en myoglobine et en isoforme M4 de l'enzyme LDH.....	56

3.1.1. Principe de la technique d'immunodiffusion radiale.....	56
3.1.2. Production d'anticorps polyclonaux anti myoglobine et anti LDH.....	57
3.1.3. Préparation des échantillons.....	57
3.1.4. Préparation de la gamme étalons.....	58
<b>3.2. Estimation de la protéolyse par électrophorèse .....</b>	<b>59</b>
3.2. 1. Extraction des protéines myofibrillaire.....	59
3.2. 2. Methode électrophorétique .....	60
<b>4. SPECTROMETRIE DE MASSE.....</b>	<b>60</b>
<b>5. ANALYSE STATISTIQUE .....</b>	<b>62</b>

## **Chapitre 2. MISE EN PLACE DU PROCESSUS D'APOPTOSE JUSTE APRES LA MORT DE L'ANIMAL..... 65**

<b>1. MATERIEL BIOLOGIQUE</b>	
1.1. Animaux .....	65
1.2. Muscle .....	65
<b>2. RECHERCHE DE MARQUEUR DE LA VOIE APOPTOTIQUE PAR WESTERN BLOT</b>	
<b>2.1. Prélèvement et traitement du muscle .....</b>	<b>65</b>
<b>2.2. Préparation des extraits du muscle de rat .....</b>	<b>66</b>
<b>2.3. Electrophorèse et Western Blot.....</b>	<b>67</b>
2.3.1. Réalisation de l'électrophorèse .....	67
2.3.2. Coloration au nitrate d'argent.....	67
2.3.3. Western Blot.....	68
<b>2. 4. Préparation des anticorps polyclonaux .....</b>	<b>69</b>
2.4.1. Préparation des anticorps polyclonaux dirigés contre la Caspase 3 et la Caspase 8.....	69
2.4. 2. Production d'anticorps contre le cytochrome C.....	71
<b>3. MESURE DU PH.....</b>	<b>71</b>
<b>4. MISE EN PLACE DE RETRECISSEMENT DES CELLULES MUSCULAIRE.....</b>	<b>72</b>
<b>5. MISE EN EVIDENCE DE L'INVERSION DE LA POLARITE DE LA MEMBRANE CELLULAIRE .....</b>	<b>72</b>
5.1. Marquage à l'annexine V.....	72
5.2. Le double marquage à la laminine.....	74
5.3. Microscopie électronique .....	74
<b>6. LA MISE EN EVIDENCE DE LA FRAGMENTATION D'ADN DANS LES CELLULE MUSCULAIRE.....</b>	<b>74</b>
6.1. Préparation des échantillons.....	75
6. 2. Principe de la méthode .....	75

## **Chapitre 3. INHIBITION DE CASPASES INITIATRICES ET EXECUTRICES PAR LES bovSERPINA3-1 ET A3-3..... 76**

<b>1. TITRATION ET MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE .....</b>	<b>76</b>
---	-----------

1. 1. Préparation des enzymes.....	76
1. 2. Titration des enzymes.....	76
1. 2. 1. Titration de la solution de trypsine utilisée .....	77
1. 2. 2. Titration de la caspase 3 et 8 .....	78
1. 3. Mesure des activités enzymatiques.....	78
<b>2. CARACTERISATIONS DES CINETIQUES DE L'INHIBITEUR.....</b>	<b>78</b>
2.1. Détermination de la constante de vitesse d'association $k_{ass}$ .....	81
2.2. Détermination de la stœchiométrie de l'interaction enzyme-inhibiteur ( $SI$ ) .....	<b>81</b>
<b>3. PREPARATION DE PEPTIDES ET ANALYSE DE SEQUENCES .....</b>	<b>82</b>

## RESULTATS ET DISCUSSION

### CHAPITRE I : MATURATION DE LA VIANDE D'AGNEAU..... 83

#### I. DEVELOPPEMENT D'OUTILS INDISPENSABLES.....83

1. Estimation de la texture des viandes .....	83
1.1. Evolution de la tendreté de la viande d'agneau.....	84
1.1.1. Matériel animal.....	84
1.1.2. Estimation de la dureté par pénétrométrie .....	84
1.1.3. Appréciation de la tendreté par analyse sensorielle.....	85
1.1.4. Analyse de données .....	86
1.2. Résultats et discussion .....	86
1.2.1. Corrélation entre mesures instrumentales et mesures sensorielles .....	86
1.2.2. Relations entre mesure instrumentale et sensorielle.....	88
1.2.3. Effet de l'âge et du type de muscle sur les mesures au pénétromètre .....	89
1.3. Conclusion.....	<b>91</b>
<b>1082. Conductivité électrique et pression osmotique du muscle .....</b>	<b>91</b>
2.1. Présentation des différentes techniques .....	<b>92</b>
2.1.1. Mesure de la conductivité électrique .....	92
2.1.2. Mesure de l'osmolarité à l'aide d'un osmomètre .....	93
2. 2. Validation de la méthode de mesure de la conductivité électrique .....	<b>93</b>
2. 2. 1. Etalonnage du conductimètre par la mesure de l'impédance électrique .....	93
2. 2. 2. Détermination du seuil de détection .....	95
2. 2. 3. Effet de dilution sur la mesure de la conductivité .....	95
2. 2. 4. Effet du pH sur la mesure de la conductivité électrique et l'osmolarité .....	97

2. 3. Détermination de la relation entre l'osmolarité et la conductivité électrique .....	98
2.4. Conclusion .....	99
<b>II. CARACTERISATION PYHYSICO-CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUE DE LA VIANDE D'AGNEAU</b>	<b>101</b>
1. CARACTERISTIQUES DES ANIMAUX .....	102
2. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUE DES MUSCLE .....	102
2. 1. Principe de la méthode de Mancin.....	102
2. 2. Application à la caractérisation des muscles.....	103
2. 3. Effet du facteur animal et/ou du facteur muscle sur les paramètres estimés au stade d'abattage .....	104
2. 4. Discussion sur le métabolisme des muscles étudiés .....	104
3. EVOLUTION GENERALE DES PARAMETRES AVEC LE TEMPS POST MORTEM .....	106
3. 1. Evolution de la température.....	106
3. 2. Evolution du PH .....	106
3. 3. Evolution de la capacité de rétention d'eau du muscle .....	108
3. 4. Evolution de la conductivité électrique.....	109
3. 5. Evolution de la dureté de la viande .....	110
4. CARACTERISATION DES CINETIQUES DES PARAMETRES ETUDIÉS .....	112
5. EFFET DU FACTEUR ANIMAL ET /OU FACTEUR MUSCLE SUR LES PARAMETRES MESURES EN CINETIQUE.....	113
6. ANALYSE GLOBALE DES DONNEES ACQUISES.....	115
6.1. Variabilité muscles et animal de la dureté ultime .....	115
6.2. Analyse en composantes principales des données et cercle de corrélation.....	115
6.3. Recherche de corrélation entre les différents paramètres mesurés.....	116
6.4. Analyse Factorielle Discriminante .....	119
6.4.1. Discrimination des animaux sur la base de l'ensemble des variables mesurées. ....	119
6.4.2. Discrimination des muscles sur la base de l'ensemble des variables mesurées.....	120
6.4.3. Discrimination des individus (muscles et animaux) sur la base de leur dureté ultime.....	120
6.4.4. Discrimination des individus sur la base de la dureté mesurée au cours du temps .....	121
7. ESTIMATION DE LA PROTEOLYSE DES PROTEINES MYOFIBRILLAIRES.....	121
8. Conclusion .....	123
<b>Chapitre II : LE PROCESSUS DE MATURATION : RECONSIDERATION DU</b>	
<b>CONCEPT ACTUEL .....</b>	<b>125</b>
1. Origine du nouveau concept.....	125
2. Les inhibiteurs de serine protéases dans le muscle	
2.1. Purification et caractérisation de 3 inhibiteurs de serine protéases.....	125
2.2. Sequence des gènes codant pour les endopine-like et complexité de la famille .....	126

2.3. Complexité de la famille des endopines et nouvelle dénomination .....	126
3. Les serpins : caractéristiques générales et mode d'inhibition.....	128
4. Enzymes cibles potentielles identifiées au niveau cellulaire.....	129
5. Conclusion .....	130
6. <b>Publication numéro 1:</b> Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms .....	131

### **Chapitre III : MISE EN PLACE DU PROCESSUS D' APOPTOSE JUSTE APRES LA MORT DE L' ANIMAL..... 132**

1. Préambule .....	132
2. Le choix des paramètres pour atteindre notre objectif.....	133
3. <b>Publication numéro 2:</b> Postmortem onset of apoptosis in rat muscles .....	134
4. <b>Résultats complémentaires</b> .....	151
4.1. Modification physicochimiques dans le muscle de rat .....	151
4.2. Recherche de marqueur de la voie apoptotique par Western Blot.....	153
4.2.1. Révélation de l'activation de la caspase3 .....	153
4.2.2. Révélation de l'activation de la caspase 8 .....	154
4.2.3. Révélation du cytochrome c .....	155
5. <b>Conclusion</b> .....	156

### **Chapitre IV : INHIBITION DE CASPASES INITIATRICES ET EXECUTRICES PAR LES bovSERPINA3-1ET A3-3..... 157**

1. Préambule.....	157
2. <b>Publication numéro 3:</b> Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3 .....	158
3. Supplemental data file .....	159
4. <b>Discussion – Conclusion</b> .....	162
5. <b>IMPLICATION DES bovSERPINA3s DANS LE PROCESSUS APOPTOTIQUE</b> .....	163

### **CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 166**

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 171**

### **PUBLICATION ET COMMUNICATIONS.....197**

**LISTE DES ABREVIATIONS**

- ADN : **Acide désoxyribonucléique**
- ADNc : **ADN complémentaire**
- AMC : **Amino 4-MethylCoumarine**
- ARN : **Aside ribonucléique**
- AT-III : **Antithrombine III**
- ATP, ADP : **Adénosine triphosphate, adénosine diphosphate**
- bp, kp : **paire de bases, kilo paire de bases**
- Bis-Tris : **Bis(2-hydroxyéthyl)imino-tris(hydroxyméthyl)méthane**
- BSA : **Sérumalbumine bovine**
- Cbz : **Carbobenzyloxy**
- CHAPS : **3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate**
- CV : **Coefficient de Variation**
- Da, kDa : **Dalton, kiloDalton**
- DEAE : **DiEthylAminoEthyl**
- DMSO : **Diméthyl sulfoxyde**
- D.O. : **Densité optique**
- DTT : **Dithiothréitol**
- E64 : **Trans-epoxy-succinyl-L-amido (4-guanido) butane**
- EDTA : **Acide Ethylène Diamine Tétraacétique**
- ELISA : **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**
- FITC : **Isothiocyanate de fluorescéine**
- FPLC : **Fast Protein Liquid Chromatography**
- HEPES : **N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-(2-éthanesulfonate) de sodium ; 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-(2-éthanesulfonate) de sodium**
- HPLC : **Hihg Perfomance Liquid Chromatography**
- HSP : **« Heat-shock protein »**
- IAP: **Inhibitor of Apoptosis**
- IgG : **Immunoglobuline de classe G**
- $k_{ass}$  : **Constante de vitesse d'association**
- $k_{diss}$  : **Constante de vitesse de dissociation**
- $K_i$  : **Constante d'inhibition**
- MCE : **2-mercapto-éthanol**

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

PBS : Phosphate Buffered Saline

pI : Point isoélectrique

PM : Poids moléculaire

PMF : protéines myofibrillaires

PMSF : Phényl méthyl sulfonyl fluoride

PVDF : Difluorure de polyvinylidène

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SI : Stœchiométrie d'inhibition

TCA : Acide Trichloroacétique

TEMED : N, N , N',N'-tétraméthyléthylène diamine

Tris : Tris(Hydroxyméthyl)-aminométhane

Tween-20 : Polyéthylène glycol sorbitane monolaurate

### Acides aminés :

Acide aminé	code 3 lettres	code 1 lettre	Acide aminé	code 3 lettres	code 1 lettre
Alanine	<b>Ala</b>	<b>A</b>	Leucine	<b>Leu</b>	<b>L</b>
Arginine	<b>Arg</b>	<b>R</b>	Lysine	<b>Lys</b>	<b>K</b>
Asparagine	<b>Asn</b>	<b>N</b>	Méthionine	<b>Met</b>	<b>M</b>
Acide Aspartique	<b>Asp</b>	<b>D</b>	Phénylalanine	<b>Phe</b>	<b>F</b>
Cystéine	<b>Cys</b>	<b>C</b>	Proline	<b>Pro</b>	<b>P</b>
Acide Glutamique	<b>Glu</b>	<b>E</b>	Sérine	<b>Ser</b>	<b>S</b>
Glutamine	<b>Gln</b>	<b>Q</b>	Thréonine	<b>Thr</b>	<b>T</b>
Glycine	<b>Gly</b>	<b>G</b>	Tryptophane	<b>Trp</b>	<b>W</b>
Histidine	<b>His</b>	<b>H</b>	Tyrosine	<b>Tyr</b>	<b>Y</b>
Isoleucine	<b>Ile</b>	<b>I</b>	Valine	<b>Val</b>	<b>V</b>
Hydroxyproline	<b>Hyp</b>		Hydroxylysine	<b>Hyl</b>	

## Liste des illustrations

**\* en face de la page**

<b>Figure 1.</b> Organisation du muscle strié.....	*5
<b>Figure 2.</b> Structure d'une myofibrille et d'un sarcomère.....	*7
<b>Figure 3.</b> Représentation de la membrane plasmique .....	*8
<b>Figure 4.</b> Etapes successives de la transformation du muscle en viande.....	*12
<b>Figure 5.</b> Schéma d'évolution de la dureté du muscle <i>Longissimus thoracis</i> de bovin .....	*15
<b>Figure 6.</b> Evolution <i>post mortem</i> du pH et de l'osmolarité du muscle <i>Longissimus dorsi</i> de bovin .....	*16
<b>Figure 7.</b> Organisation spatiale des sous-unités du protéasome 20S.....	*26
<b>Figure 8.</b> Structures spatiales des différentes conformations des serpinines .....	*
<b>Figure 9.</b> Mécanisme d'inhibition des serpinines .....	*
<b>Figure 10.</b> Vitesse relative de maturation de différentes espèces .....	*33
<b>Figure 11.</b> Aspects morphologiques de la mort cellulaire .....	*37
<b>Figure 12.</b> Régulation du processus apoptotique .....	*41
<b>Figure 13.</b> Structure schématique des précurseurs des caspases.....	*45
<b>Figure 14.</b> Schéma de maturation du précurseur de la caspase 3 en caspase 3 active .....	*46
<b>Figure 15.</b> Analyse phylogénétique de la famille des caspases humaines .....	*46
<b>Figure 16.</b> Classification des différentes caspases humaines en fonction de leur spécificité de clivage .....	*47
<b>Figure 17 :</b> exemple de plaque de la technique d'immunodiffusion radiale.....	*56
<b>Figure18.</b> Dispositif de prélèvement du sang de lapin immunisé.....	*56
<b>Figure19.</b> Caractérisation par immunodiffusion double (Ouchterlony, 1948).....	*56
<b>Figure20.</b> Protocole de préparation des échantillons servant au dosage immunologique des teneurs en isoforme M4 de la LDH et de la myoglobine .....	*57
<b>Figure21.</b> Préparation de l'extrait brut à partir du muscle Diaphragma d'ovine .....	*58
<b>Figure 22.</b> Purification de la myoglobine sur une chromatographie échangeuse d'anions.....	*59
<b>Figure 23.</b> Schéma d'extraction des myofibrilles .....	*60
<b>Figure 24.</b> Principe de la séparation des protéines par l'électrophorèse (SDS PAGE) .....	*61
<b>Figure 25.</b> Détermination de la valeur finale, la vitesse et l'amplitude d'évolution des paramètres suivis en cinétique .....	*62
<b>Figure 26.</b> Préparation des l'extraits a partir du muscle longissimus Dorci de Rat .....	*66
<b>Figure 27.</b> Schéma du principe du sandwich de transfert pour le Western Blot .....	*68
<b>Figure28.</b> Etape d'injection des peptides .....	*70
<b>Figure 29.</b> Exemple de titration de la caspase 3 par l'inhibiteur irréversible.....	*78
<b>Figure 30.</b> Schéma du principe de la mesure de la dureté de la viande par pénétrométrie .....	*84

<b>Figure 31.</b> Spécimen de formulaire de réponse pour le test de notation .....	*85
<b>Figure 32.</b> Evolution de la profondeur de pénétration en fonction de l'âge des animaux .....	*89
<b>Figure33.</b> Evolution de la profondeur de pénétration en fonction des muscles .....	*90
<b>Figure 34.</b> Communication écrite présenté au Congrès International en 2006 à Tunis.....	*91
<b>Figure 35.</b> Conductimètre à microprocesseur.....	*92
<b>Figure 36.</b> Schéma de principe du micro-osmomètre .....	*93
<b>Figure 37.</b> Schéma de la cellule conductimétrique .....	*93
<b>Figure 38 :</b> Mesure de l'impédance en méthode de « 2 point ».....	*94
<b>Figure 39.</b> Relations entre la conductivité électrique mesurées et calculées .....	*94
<b>Figure 40.</b> Effet de la dilution sur la linéarité des mesures de conductivités électriques (Différents volumes de la solution NaCl et du jus de viande avec un volume constant du mélange) .....	*96
<b>Figure41.</b> Effet de la dilution sur la linéarité des mesures de conductivités électriques (Volume constant de jus de viande le volume total du mélange et variable) .....	*97
<b>Figure 42.</b> Sonde du conductimètre à microprocesseur .....	*97
<b>Figure 43.</b> Effet de la variation du pH sur la linéarité de la mesure de la conductivité électrique et de l'osmolarité .....	*98
<b>Figure 44.</b> La courbe moyenne d'étalonnage entre la conductivité électrique et osmolarité.....	*99
<b>Figure 45.</b> Exemple de quantification de l'iosforme M4 de l'enzyme LDH du muscle SM d'ovin par immunodiffusion radiale.....	*103
<b>Figure46.</b> Caractéristiques physiologiques des muscles à 1 <i>post mortem</i> des cinq animaux.....	*104
<b>Figure 47.</b> Les Muscles SM, ST, LB, et RF différence de couleur et de vascularisation .....	*105
<b>Figure 48.</b> Evolution de la température des quatre muscles au cours du temps <i>post mortem</i> .....	*106
<b>Figure 49.</b> Profil d'évolution du pH <i>post mortem</i> en fonction du temps pour les quatre muscles .....	*106
<b>Figure 50.</b> Profil d'évolution du pH dans le muscle SM.....	*107
<b>Figure 51.</b> Profil d'évolution du pH dans le muscle LB .....	*107
<b>Figure 52.</b> Profile d'évolution de la quantité de jus extractible des muscles SM, ST, RF et LB au cours du temps <i>post mortem</i> .....	*109
<b>Figure 53.</b> Profile d'évolution de conductivité électrique des muscles SM, ST, RF et LB au cours du temps <i>post mortem</i> .....	*109
<b>Figure54.</b> Profil d'évolution <i>post mortem</i> , de la dureté moyenne des quatre muscles SM, ST RF et LB estimée par pénétrométrie. ....	*111
<b>Figure 55.</b> Détermination de la valeur finale, la vitesse et l'amplitude d'évolutiondes paramètres suivis en cinétique .....	*112
<b>Figure 56.</b> Comparaison de la dureté ultime des muscles étudiés estimée par pénétrométrie .....	*115
<b>Figure 57.</b> Dureté ultime des muscles étudiés estimée par pénétrométrie pour chacun des animaux .....	*115
<b>Figure 58.</b> Cercle de corrélation .....	*116
<b>Figure 59.</b> Discrimination des animaux et des muscles .....	*120

<b>Figure 60.</b> Discrimination des animaux et des muscles sur la base de la dureté ultime .....	*121
<b>Figure 61.</b> Illustration dui profil électrophorétique , de la protéolyse des protéines myofibrillaires du muscle RF .	*122
<b>Figure 62.</b> Profil électrophorétique des quatres muscle SM,ST,RF et LB à 1 h post mortemu .....	*122
<b>Figure 63.</b> Carte peptidiques des deux bandes réalisées par MALDI-TOF .....	*123
<b>Figure 64.</b> Homologie de séquence des proteines codées par les 8 gènes : les amino-acides en rouge sont les mêmes pour toutes les bovSERPINA3s.....	*127
<b>Figure65.</b> Fractionnement, par gel filtration sur Sephadex G100 superfin (5 x 100 cm), d'un extrait brut de muscle et profil en électrophorèse 2D des 2 principales fractions FI et FII .....	*128
<b>Figure 66.</b> Schéma de principe d'action des Serpines.....	*129
<b>Figure 67.</b> Evolution de la quantité de surnageant récolté lors de l'extraction du muscle de rat.....	*151
<b>Figure 68.</b> Evolution du pH et du volume du surnageant de l'extrait musculaire de rat au cours du temps post mortem .....	*151
<b>Figure 69.</b> Evolution de la concentration en protéines totaux dans les deux factions culot et surnageant de extrait musculaire de rat au cours du temps post mortem .....	*152
<b>Figure 70.</b> Western blots réalisé sur les surnageant de rat avec l'anticorps polyclonaux dirigé contre la caspase 3 .	*153
<b>Figure 71.</b> Western blots réalisé sur le culot de rat avec l'anticorps polyclonaux dirigé contre la caspase 3 .....	*153
<b>Figure 72.</b> Western blots réalisé sur les surnageant de rat avec l'anticorps polyclonaux dirigé contre la caspase 8.	154
<b>Figure 73.</b> Western blots réalisé sur le culot mitochondriale de rat avec l'anticorps polyclonaux dirigé contre le cytochrome c. ....	*155
<b>Figure 74.</b> Western blot avec un anticorps anti-cytochrome c. la solution utilisé est préparé avec du cytochrome c acheté 1g/ml. Deux temps on été testés J1et J2 qui correspond à 24h et 48h après la préparation de la solution...	*155
<b>Figure 75.</b> Evolution de la concentration en cytochrome c dans le culot mitochondriale et du pH intramusculaire du muscle longissimus dorsi de rat au cours du temps post mortem .....	*155
<b>Figure76.</b> Mode d'interaction d'un inhibiteur vrai (a) et des IAP (b).....	*163
<b>Figure 77.</b> Régulation du processus apoptotique.....	*164
<b>Figure 78.</b> Les différentes phases de transformation du muscle en viande à prendre en considération .....	*168

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Principales protéines musculaires .....	*8
<b>Tableau 2.</b> Caractéristiques des types de fibres .....	*10
<b>Tableau 3.</b> Membres de la famille des calpaïnes .....	*22
<b>Tableau 4.</b> Tableau récapitulatif des cathepsines .....	*23
<b>Tableau 5.</b> Principales fonctions des serpins et représentants respectifs de cette famille .....	*
<b>Tableau 6.</b> Echelle de tendreté.....	*86
<b>Tableau 7.</b> Résultats du test de SPEARMAN pour les différents muscles .....	*86
<b>Tableau 8.</b> Evaluation, par analyse de la variance, de l'effet animal et de l'effet type de muscle sur les mesures obtenues par pénétrométrie.....	*89
<b>Tableau 9.</b> Conductivité des blancs (N =70).....	*95
<b>Tableau 10.</b> Effet de variation du pH sur la linéarité de la mesure de l'osmolarité.....	*98
<b>Tableau 11.</b> Paramètres des différentes fonctions d'étalonnages, (N = 10).....	*99
<b>Tableau 12.</b> Age et poids des animaux et muscles utilisés dans l'expérience .....	*102
<b>Tableau 13.</b> Caractéristique physiologiques des muscles étudiés .....	*103
<b>Tableau 14.</b> Analyse de variance des paramètres mesurés au stade d'abattage .....	*104
<b>Tableau 15.</b> Nombre de plateaux observés par muscle et animal étudiés .....	*108
<b>Tableau 16.</b> Valeurs moyenne de conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) des quatre muscle.....	*110
<b>Tableau 17.</b> Valeurs moyenne des profondeurs de pénétration en millimètres des quatre muscles étudiés.....	*111
<b>Tableau 18.</b> Evaluation, par analyse de variance, de l'effet animal et/ou effet muscle sur le pH, le jus extractible, la conductivité électrique et la dureté de la viande mesurée par pénétrométrie .....	*113
<b>Tableau 19.</b> Matrice de corrélation entre les différents paramètres mesurés .....	*117
<b>Tableau 20.</b> Nomenclature des serpins identifiées au niveau du génome bovin.....	*126
<b>Tableau 21.</b> Protéases inhibées par les serpins bovines A3-1 et A 3-3 .....	*128

Les qualités sensorielles des viandes dépendent de nombreux facteurs. Ceux-ci, qu'ils soient liés à l'animal (espèce, race, âge, sexe, génotype), au mode d'élevage (vitesse de croissance, alimentation) ou aux facteurs technologiques *post mortem* (vitesse et intensité du refroidissement, stimulation électrique, ...), induisent des modifications des caractéristiques biologiques du muscle, et par conséquent, des variations de tendreté, de flaveur, de jutosité et de couleur des viandes. Toutefois, moins d'un tiers à un quart de la variabilité des qualités sensorielles et notamment de la tendreté et de la flaveur ont pu être expliquées par la variabilité des caractéristiques musculaires de l'animal vivant (Renand et *al.*, 2001). L'identification de nouveaux indicateurs constitue une priorité de recherche pour espérer maîtriser ces qualités. C'est la raison pour laquelle des recherches ont été initiées, depuis les années quatre vingt, dans le but d'identifier de nouveaux indicateurs biologiques fiables ayant une forte incidence sur les qualités sensorielles des viandes et pouvant expliquer une part importante de leur variabilité.

Il est clair qu'après l'abattage des animaux de boucherie, l'ensemble des protéinases musculaires demeurent actives et contribuent, plus ou moins, à la déstructuration des fibres musculaires et des myofibrilles. Les myofibrilles étant l'élément essentiel dans la définition de la tendreté ultime de la viande, qui représente la qualité majeure la plus recherchée par le consommateur. Du fait que les protéinases ne sont plus soumises à aucun contrôle dynamique. Leur régulation sera uniquement assurée par les modulateurs d'activité présents dans la cellule (activateurs ou inhibiteurs) ainsi que par les conditions physicochimiques qui vont changer de façon drastique, qu'il s'agisse du pH qui chute pour atteindre une valeur ultime de l'ordre de 5.4-5.6, de l'osmolalité du tissu musculaire qui atteint des valeurs 2 fois plus élevées que la normale et de la dénaturation des protéines substrats.

L'attendrissage des viandes est un processus enzymatique impliquant les systèmes protéolytiques endogènes (Ouali, 1992 ; Sentandreu et *al.*, 2002). Dans ce contexte, l'attention des chercheurs a été principalement focalisée sur deux groupes enzymatiques connus depuis plusieurs décennies. Il s'agit des cathepsines et des calpaïnes.

En 1996, Zamora et *al.*, publiaient un travail qui montrait que parmi un nombre de paramètres important susceptibles d'être des prédicateurs de la tendreté ultime de la viande bovine, le plus efficace s'est avéré être la concentration d'inhibiteurs de serine protéases au stade de l'abattage. Ce résultat fut confirmé par la suite dans une expérience similaire portant sur un nombre d'animaux plus élevé (Zamora et *al.*, 2005). Ceci est d'autant plus surprenant que, durant des années, tout le monde s'accordait à dire que les serine protéases n'avaient

aucun rôle dans le processus de maturation et que cette famille de protéases était très peu représentée dans la cellule musculaire (Sentandreu et *al.*, 2002).

Un autre élément essentiel, dans cette réflexion sur ce nouveau concept, fut la démonstration, vers les années 90, que les inhibiteurs de protéases constituaient de meilleurs marqueurs de l'intensité de la protéolyse dans le muscle et, par voie de conséquence, de la tendreté ultime de la viande, que le taux d'enzyme lui-même (Ouali et Talmant 1990).

Ces observations ont conduit à une étude plus systématique des inhibiteurs de serine protéases dans le tissu musculaire. Le but de cette étude est d'essayer d'identifier ces derniers et de préciser la nature de leurs protéases cibles *in vivo*, protéases susceptibles de jouer un rôle primordial dans le processus d'attendrissage des viandes.

Parmi les nombreuses protéases testées et connues pour être largement distribuées dans les organismes vivants et pour être intracellulaires, le seul groupe de peptidase fortement inhibées par ces serpins, se sont avérées être les caspases, famille très particulière de cystéine protéases, qui jouent un rôle prépondérant dans le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose.

Les observations décrites précédemment, nous ont conduits à reconsidérer le concept actuel de la transformation du muscle en viande, Si on admet que :

- les inhibiteurs de serine protéases qui ont été identifiés comme les meilleurs marqueurs de la tendreté ultime de la viande bovine dans le cas présent,
- ces inhibiteurs sont des inhibiteurs de caspases,
- les caspases sont les moteurs de l'apoptose et donc de la mort cellulaire programmée, ce qui est aujourd'hui démontré (Taylor et *al.*, 2008),

La seule conclusion qui s'impose, est d'admettre que dès la mort de l'animal, les cellules musculaires vont s'engager sur la voie de la mort cellulaire par apoptose. C'est ce que nous avons voulu démontrer dans ce travail. Cette nouvelle conception de la transformation du muscle en viande apportera des réponses à de nombreuses questions en suspens depuis des décennies et pour lesquelles des explications scientifiques cohérentes n'ont jamais été proposées.

Notre travail comprend trois parties :

- Dans un premier temps, nous avons voulu comprendre les relations entre les différents paramètres physico-chimiques et biochimiques intervenant dans le processus d'attendrissage naturel de la viande d'agneau. Afin de limiter la variabilité de la dureté de la viande liée à deux facteurs, le facteur animal et le facteur type de muscle. Pour atteindre cet objectif nous avons mesuré en cinétique plusieurs caractéristiques biologiques du muscle, connues pour avoir un rôle dans le processus d'attendrissage.

- Dans une deuxième étape nous avons procédé à la mise en évidence de l'apoptose dans le muscle de rat. Parmi les différents marqueurs de l'apoptose nous avons choisi de suivre l'évolution des marqueurs suivants :

- La rétraction cellulaire ;
- L'externalisation des groupements phosphatidylserine ;
- L'hydrolyse de l'actine, première protéine cible des caspases ;
- La dégradation de l'ADN

- Dans la troisième partie de notre thèse nous avons procédé à l'étude des cinétiques enzymatiques et, plus particulièrement, à la détermination des constantes d'association caractérisant la vitesse d'interaction des serpins avec leurs protéases cibles à savoir la caspase 8, caspase initiatrice et la caspase 3, caspase exécutive de l'apoptose.

Après une étude bibliographique détaillée et une présentation des matériels et méthodes utilisés, nous présenterons l'ensemble des résultats très originaux obtenus avant de conclure sur les perspectives envisagées

## **Préambule**

La synthèse bibliographique de ce rapport a pour but de présenter les connaissances actuelles sur la transformation du muscle en viande, ainsi que les principaux facteurs biologiques responsables de la variabilité de sa tendreté.

Une partie de cette synthèse est consacrée au muscle strié, qui est la base de la viande, avec un accent particulier sur les deux composants musculaires responsables de la tendreté de la viande. La structure contractile et la structure conjonctive. Les principales protéines, qui constituent ces tissus, seront plus spécialement détaillées, ainsi que le polymorphisme musculaire et sa relation avec la qualité de viande.

Les mécanismes physicochimiques impliqués dans le phénomène de transformation du muscle en viande seront aussi bien détaillées. Les mécanismes enzymatiques, les principaux systèmes protéolytiques connus et/ou susceptibles d'intervenir dans la maturation seront décrits, avec une attention spéciale sur les inhibiteurs endogènes de protéinases. Ces inhibiteurs endogènes étaient d'autant plus importants que leurs concentrations dans le tissu musculaire s'est avérée être le meilleur indicé de prédiction de la tendreté de la viande (Zamora *et al.*, 2005)

Enfin un chapitre sera consacré à l'apoptose (la mort cellulaire programmée) la première phase de transformation du muscle en viande après la saignée de l'animal.

## 1 LE MUSCLE STRIE

Le tissu musculaire est un des tissus les plus abondants chez les mammifères. Sa masse correspond à environ 40% de la masse totale corporelle. On distingue trois types de muscle :

- **Les muscles striés** squelettiques qui représentent 30 à 35% du poids du corps d'un animal vivant. Ils assurent le maintien de la posture, ainsi que les mouvements du corps grâce à leurs insertions sur les os via les tendons. Leurs contractions sont volontaires et répondent à un influx nerveux

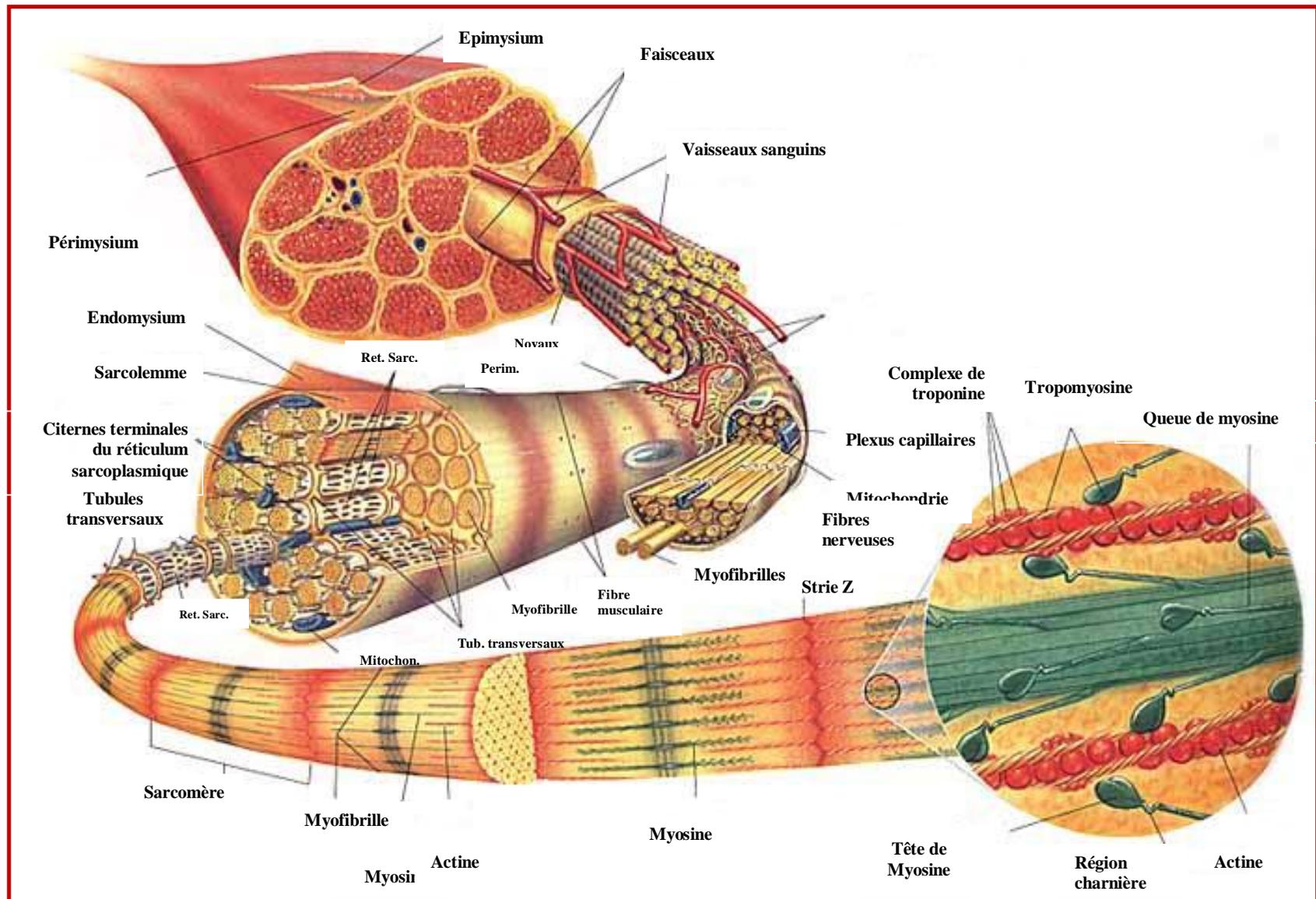
- **le muscle cardiaque**, muscle strié, commandé par le système nerveux autonome, fonctionne en permanence pour assurer la circulation du sang et l'apport continu des nutriments et de l'oxygène aux tissus.

- **Les muscles lisses**, composés de cellules mononucléées, présents dans de nombreux organes comme les artères, les veines, l'utérus, les viscères avec des fonctions diverses, mais axées sur le maintien des structures et de l'élasticité.

Le muscle strié squelettique est un des tissus les plus étudiés en biologie. C'est un organe bien délimité et marqué par une très forte hétérogénéité structurale. Il est constitué par la juxtaposition de cellules, les fibres musculaires, enveloppées dans une gaine de périnysium, chaque fibre étant entourée par l'endomysium (**Figure 1**). La principale protéine constitutive de ce tissu conjonctif est le collagène. Ces enveloppes de tissu conjonctif contiennent des neurofibres, nécessaires à l'excitation électrique permettant la contraction, des adipocytes constituant les réserves en lipides intramusculaires, et des réseaux de vaisseaux sanguins nécessaires à l'irrigation du muscle qui se prolongent en capillaires pour atteindre toutes les composantes plus internes du muscle.

### *1.1. Organisation cellulaire*

La fibre musculaire est l'unité structurale essentielle de tous les muscles striés squelettiques. Elle présente une forme allongée pouvant mesurer jusqu'à une trentaine de centimètres. Chaque fibre musculaire est entourée, comme toute cellule, d'une membrane plasmique, appelée sarcolemme, qui abrite le sarcoplasme contenant les nombreux noyaux cellulaires, les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique ainsi que d'autres organites plus ou moins spécialisés (**Figure 1**).



**Figure 1** : Organisation du muscle strié

Image téléchargé à partir de <http://www.emc.maricopa.edu.html>

### ***1.1.1. La fibre musculaire***

La fibre musculaire est plurinucléée et une grande majorité de l'espace intracellulaire est occupé par les myofibrilles. Ces myofibrilles ont un diamètre d'environ 1-2  $\mu\text{m}$  et peuvent s'étendre sur toute la longueur de la fibre musculaire. Les myofibrilles occupent 80% du volume de la cellule et les espaces intermyofibrillaires sont très faibles. Ces espaces sont occupés par des mitochondries et le réticulum sarcoplasmique (tubules T). Les myofibrilles représentent les éléments contractiles des cellules des muscles squelettiques. Elles sont constituées de sous unités encore plus petites : les filaments ou myofilaments, également parallèles au grand axe de la myofibrille (Pearson et Young, 1989).

En microscopie photomique, les myofibrilles apparaissent formées d'une succession de bandes claires et sombres. Ces bandes sont situées au même niveau pour l'ensemble des myofibrilles d'une même fibre, si bien que la cellule a un aspect strié et caractéristique. En lumière polarisée, les bandes sombres sont fortement biréfringentes d'où leur nom de bandes anisotropes (polarisent la lumière visible) ou bandes A ; les bandes claires ne sont que très faiblement biréfringentes, ce sont les bandes isotropes (non polarisantes) ou bandes I. La bande A présente, d'autre part, en son milieu une région plus claire, la bande H (H vient de hélios=semblable au soleil). Chaque zone est divisée en deux par une ligne sombre, la ligne M. Au milieu des bandes I, on remarque également, une zone plus foncée que l'on nomme ligne Z (**Figure 1**).

La portion de myofibrille comprise entre deux lignes Z successives, est appelée sarcomère. Mesurant environ 2  $\mu\text{m}$  de long, le sarcomère est la plus petite unité contractile de la fibre musculaire. Chaque unité fonctionnelle du muscle squelettique est, donc, une très petite portion de myofibrille, c'est-à-dire que la myofibrille est formée d'une succession de sarcomères identiques. Au repos, le sarcomère mesure environ 2,5  $\mu\text{m}$ . Lorsque le muscle se contracte, les bandes I se raccourcissent alors que les bandes A gardent la même longueur quelque soit le degré de contraction du muscle. Lorsque le muscle est contracté, le sarcomère mesure environ 1,5  $\mu\text{m}$ . Le muscle squelettique fonctionne, donc comme un ressort, dont la contraction serait contrôlable.

Plus en détail au microscope électronique, les coupes longitudinales permettent de reconnaître les diverses bandes sombres et claires qui s'étendent le long des myofibrilles. A fort grossissement, on voit que les myofibrilles sont constituées de filaments longitudinaux de deux espèces différentes : les myofilaments. Une première série de myofilaments est composée d'éléments de 100 Å de diamètre qui s'étendent sur toute la longueur de la bande

A : ce sont les filaments épais. Une seconde série est constituée d'éléments de 50 Å de diamètre : les filaments fins qui s'étendent de part et d'autre de la strie Z et s'engagent entre les filaments épais (**Figure 2**). La strie Z correspond à une zone où les filaments fins des sarcomères voisins sont reliés entre eux par un système de filaments spéciaux, les filaments Z.

La bande I semble être constituer uniquement de filaments fins ; la bande A est formée de filaments épais entre lesquels s'engagent de filaments fins. Comme les filaments fins ne vont pas jusqu'au milieu de la bande A, il existe au centre de cette bande une zone formée uniquement par des filaments épais et qui correspond à la bande H, plus claire que l'on observe. La ligne M, située au centre de la zone claire (bande H) est légèrement assombrie par la présence de structures qui maintiennent ensemble les filaments épais adjacents. La ligne Z, aussi appelée télomphragme, est, en fait, une couche de protéines en forme de pièce de monnaie on sont ancrés les filaments fins et qui unissent aussi les myofibrilles entre elles sur toute l'épaisseur de la cellule musculaire ; de la ligne Z, partent des filaments particuliers qui attachent la myofibrille à la membrane plasmique (sarcolemme) (Berkaloff et al., 1977).

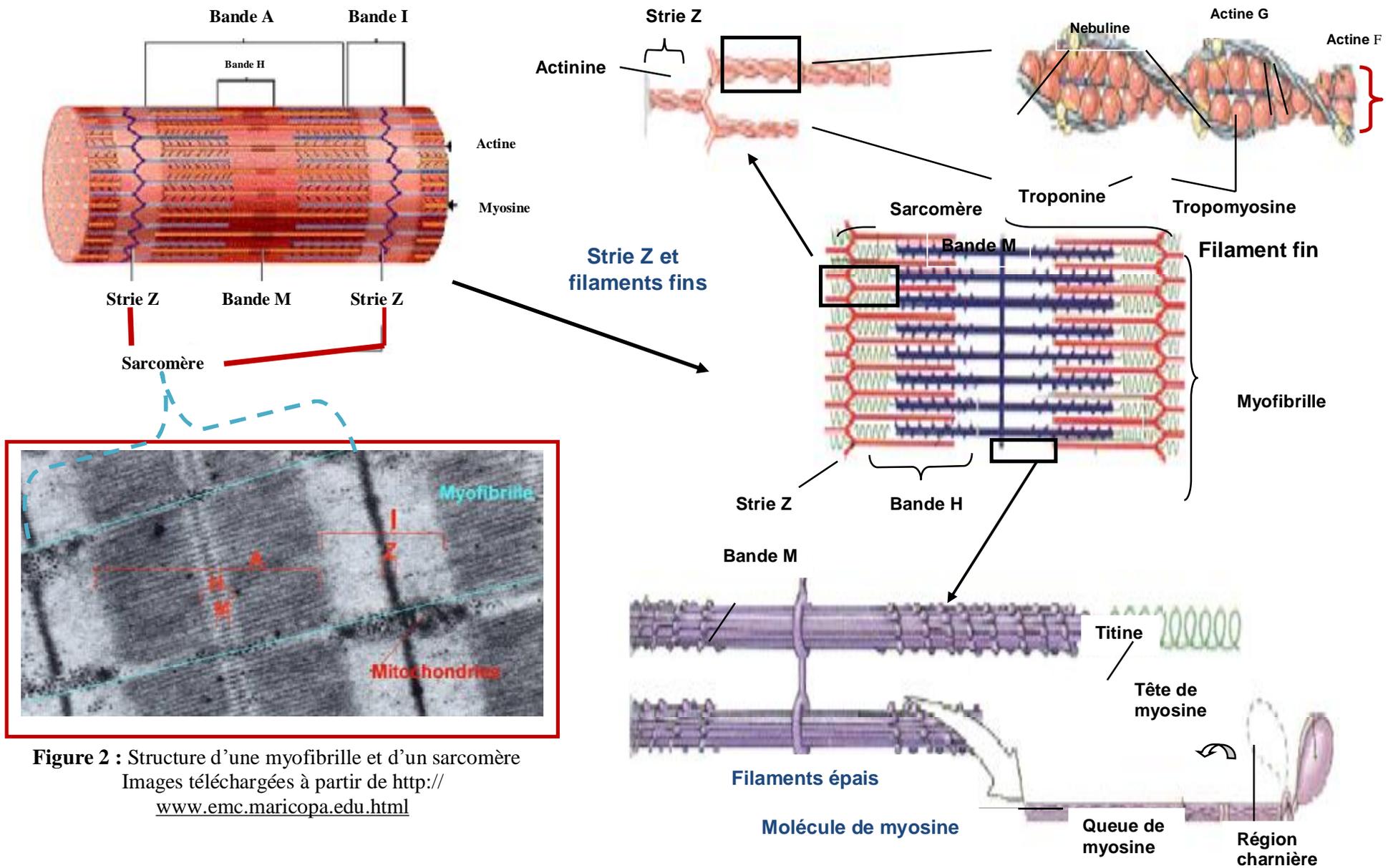
### ***1.1.2. Le sarcolemme***

Le sarcolemme est une structure continue qui parcourt la fibre musculaire et contribue à l'intégrité mécanique du muscle. La force de contraction qui est transmise par les myofibrilles, traverse le sarcolemme en direction de la matrice extracellulaire. Le sarcolemme est, donc exposé à un stress mécanique intense nécessitant une structure très forte.

Le sarcolemme présente une particularité unique dans le tissu musculaire puisqu'il se prolonge vers l'intérieur de la cellule et fusionne avec le réticulum sarcoplasmique pour former un réseau de tubules transversaux (ou tubules T). La fonction des tubules T est de conduire les impulsions électriques délivrées par la plaque motrice de la surface de la fibre (sarcolemme) à l'intérieur de la cellule musculaire pour arriver jusqu'au niveau de chaque myofibrille (Pearson et Young, 1989).

Au niveau de la membrane, la connection entre les compartiments intracellulaire et extracellulaire se fait grâce à un complexe transmembranaire associant la dystrophine située à l'intérieur de la cellule et divers protéoglycanes transmembranaires. La dystrophine est la plus grande protéine associée au sarcolemme (Hijikata, 1998).

La membrane plasmique des cellules musculaire est constituée de lipides (phospholipides, glycolipides et cholestérol) et de protéines. Comme toutes les membranes biologiques, elle est globalement organisée selon le modèle de la "mosaïque fluide" proposé



**Figure 2 :** Structure d'une myofibrille et d'un sarcomère  
 Images téléchargées à partir de <http://www.emc.maricopa.edu.html>

dès 1972 par Singer et Nicholson. Dans ce modèle (**Figure 3**). La membrane sarcolemmique se compose de phospholipides représentant environ 50% et le cholestérol environ 12% des lipides totaux (Madeira, 1977 ; De Krester, 1977 ; Roseblatt, 1981 ; Salviati, 1982).

### ***1.1.3. Le sarcoplasme***

C'est le cytoplasme de la cellule musculaire dans lequel baignent tous les constituants et organites intracellulaires. C'est une substance colloïdale qui est principalement composée d'eau (75-85 %) (Forrest, 1979). Le sarcoplasme, comme le cytoplasme des autres cellules de l'organisme, correspond au liquide nourricier de la cellule ; il contient notamment de l'ATP, de la phosphocréatine, du glycogène, des mitochondries, des acides gras et de la myoglobine (Pollack, 1990).

### ***1.2. Les protéines majeures du muscle***

Le muscle est une réserve de protéines importante. Gott et al. (1997), montrent un inventaire des protéines présentes dans le muscle et leur rôle dans ce tissu. Le **tableau 1** présente ces protéines majeures et décrit brièvement leur fonction.

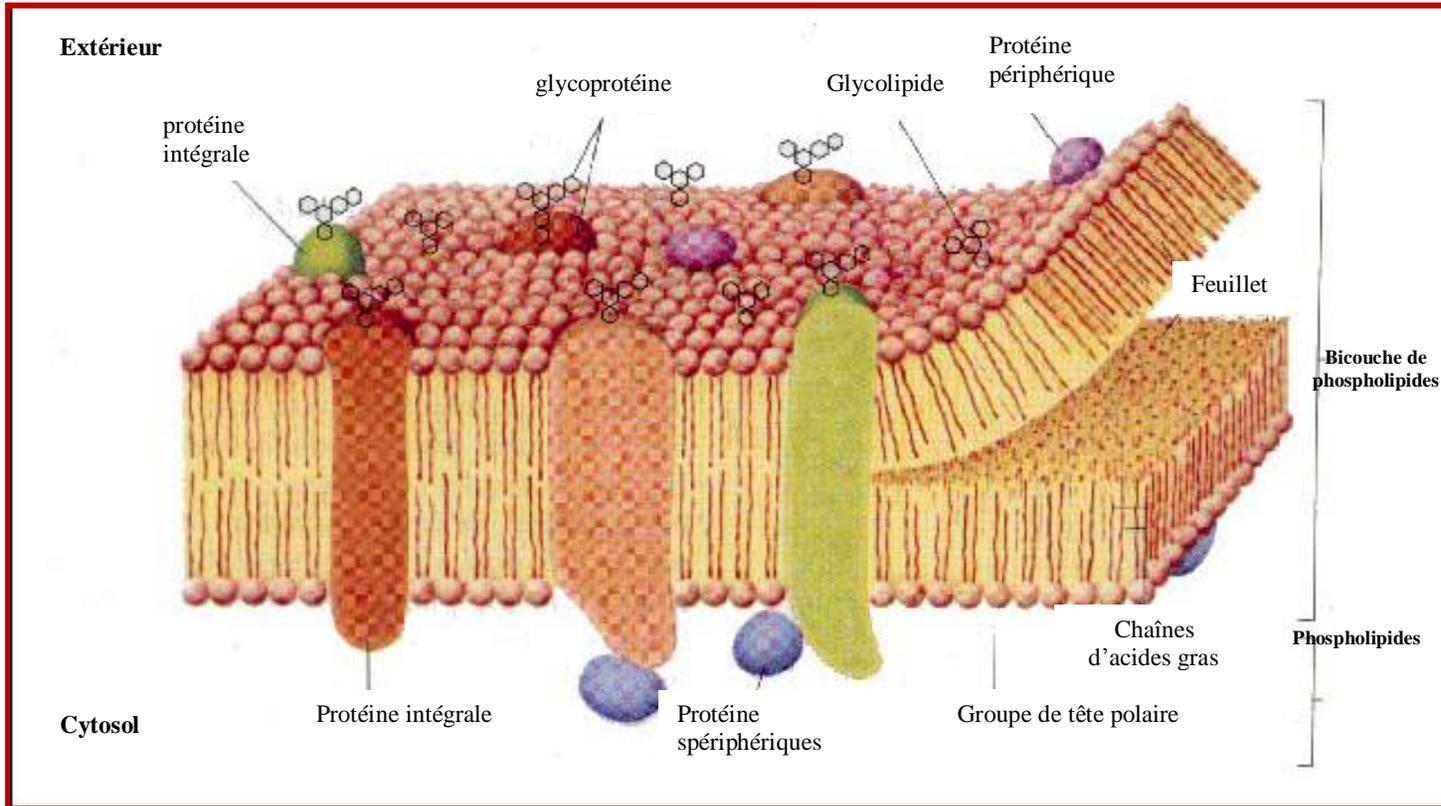
On peut classer ces protéines en fonction de leur localisation au sein de la cellule ou en fonction de leur rôle suivant le type de muscle considéré.

#### ***1.2.1. Les protéines sarcoplasmiques***

Les protéines sarcoplasmiques représentent environ 30-35% des protéines totales du muscle (Pearson et Young, 1989). La plupart sont des enzymes et participent au métabolisme cellulaire. On distingue quatre fractions : la fraction nucléaire (contenant l'ADN, l'ARN, les nucléoprotéines et les lipoprotéines) ; la fraction mitochondriale (mitochondries, lysosomes, enzymes qui agissent dans le cycle de Krebs, composants du système de transport d'électrons, peroxisomes) ; la fraction microsomale (microsomes, ribosomes, réticulum sarcoplasmique) et la fraction cytoplasmique (enzymes de la glycolyse, myoglobine et hémoglobine) (Davey et Winger, 1979).

#### ***1.2.2. Les protéines myofibrillaires***

Les protéines myofibrillaires représentent environ 60% des protéines totales du muscle. Ces protéines peuvent être classées selon leur fonction : protéines contractiles, protéines régulatrices de la contraction et protéines du cytosquelette servant au maintien de l'intégrité et l'organisation tridimensionnelle du sarcomère (**tableau 1**).



**Figure3.** Représentation de la membrane plasmique.  
(D'après Darnell 1990).

**Tableau 1. Principales protéines musculaires (modifié d'après Got, 1997)**

PROTEINES	% des protéines totales	% des protéines myofibrillaires	Poids moléculaires (kDa)	Localisation dans la myofibrille	Rôle physiologique
<b>Sarcoplasmiques</b> (Enzymes, Myoglobine,...)	<b>30</b>	-		-	- Interviennent essentiellement au niveau du métabolisme des muscles
<b>Mvofibrillaires</b>	<b>60</b>	<b>100</b>			
<i>Contractiles</i>					
Myosine		45	520	Filament épais	- Contraction
Actine		22	42	Filament fin	- Contraction
<i>Régulatrices</i>					
Protéine H		< 1	74	Filament épais	- Régule la contraction
Protéine C		2	130	Filament épais	- Régule la contraction
Myomesine		1	185	Bande M	- Arrange les filaments de myosine de façon ordonnée
Protéine M		2	165	Bande M	- Arrange les filaments de myosine de façon ordonnée
La M-créatine kinase		< 1	80	Bande M	- Régénérateur intramoléculaire d'ATP
Skelemine		< 1	195	Bande M (périphérie)	- Attache les myofibrilles adjacentes entre elles et les myofibrilles aux filaments intermédiaires
Tropomyosine		5	66	Filament fin	- Régule la contraction. Lie le filament fin au disque Z
Troponine C		2	18	Filament fin	- Régule la contraction. Fixe le calcium
Troponine I		2	22	Filament fin	- Régule la contraction. Inhibe l'activité ATPasique de l'actomyosine
Troponine T		2	37	Filament fin	- Régule la contraction. Rôle structural
Paratropomyosine		< 1	34	Jonction A- I	- Inhibe les interactions myosine/actine en présence d'ATP
Tropomoduline		< 1	41	Filament fin (extrémité libre)	- Se lie à la tropomyosine. Régule la contraction. Lie les troponines I et C au filament fin
<i>Cytosquelettiques</i>					
α-actinine		2	204	Disque Z	- Ancre les filaments fins et élastiques dans le disque Z
β-actinine		< 1	66	Disque Z	- Ancre les filaments d'actine dans le disque Z et les coiffe
Zeugmatine		< 1	2000	Disque Z	- Ancre les filaments d'actine dans le disque Z et les coiffe
Titine		10	2800	Filaments allant de la bande M au disque Z	- Garde les filaments épais au milieu du sarcomère. Régule l'assemblage des protéines du filament épais et contrôle la longueur de la bande A.
Nebuline		4	800	Filaments parallèles au disque Z	- Régule la longueur du filament fin. Régule la contraction en liant l'actine à la myosine
Desmine		< 1	212	Filaments intermédiaires	- Encerle le disque Z et attache les myofibrilles entre elles. Maintient la continuité des sarcomères
Synemine		< 1	460	Filaments intermédiaires	- Lie la desmine aux myofibrilles. Se lie à la desmine et à l'α actinine
Vinculine		< 1	130	Costamères	- Attache les myofibrilles au sarcolemme
Filamine		< 1	245	Costamères	- Attache le disque Z au sarcolemme
Dystrophine		< 1	427	Costamères	- Se lie à l'actine et à la matrice extracellulaire
Spectrine		< 1	240-280	Costamères	- Attache le disque Z au sarcolemme
<b>Tissu conjonctif</b> (Collagène, Elastine)	<b>10</b>	-			-

### ***1.2.3. Les protéines contractiles***

#### ***- La myosine***

La myosine (48% des protéines myofibrillaires totales) est une protéine dimérique de poids moléculaire 470 kDa qui comprend deux longues chaînes identiques (chaînes lourdes, leur PM est 200 kDa) auxquelles sont associées des chaînes légères beaucoup plus courtes (2 à 4 chaînes, selon s'il s'agit de muscles à contraction rapide ou de muscles à contraction lente, leur PM étant compris entre 16 et 18 kDa). L'édifice réalisé par l'association de ces chaînes par liaisons non covalentes est une molécule polaire asymétrique ayant la forme d'un bâtonnet de 20 Å de diamètre et 1450 Å de long, bâtonnet. Ce bâtonnet a un caractère hydrophobe portant à une de ses extrémités une tête hydrophile formée de deux parties globuleuses de 100 Å de diamètre chacune. La myosine a deux propriétés importantes : d'une part, elle possède une propriété ATPasique qui est activée par les ions calcium, d'autre part, elle se lie à l'actine pour former un complexe : l'actomyosine ; c'est le sous fragment S-1, correspondant à la tête de la molécule qui possède ces deux propriétés.

L'organisation ultrastructurale montre que chaque myofilament épais de 1,6 µm de long est composé de 300 à 400 molécules de myosine disposées tête-bêche. Les bâtonnets sont placés côte à côte et parallèlement au grand axe du myofilament et se recouvrent partiellement ; les têtes sont en saillie et arrangées régulièrement (Berkaloff et al., 1977) (**Figure 2**).

#### ***- L'actine***

Les myofilaments fins sont constitués de 3 protéines : l'actine, la tropomyosine et les troponines. La plus abondante est l'actine (20-25% des protéines myofibrillaires totales). L'actine est une protéine globulaire dont le diamètre est de 55 Å et qui contient un acide aminé rare, la 3-méthyl histidine. L'actine (PM : 43 kDa) est constituée d'une chaîne polypeptidique de 376 acides aminés dont la séquence est connue. En solution aqueuse et en absence de sels, les molécules globulaires d'actine sont dispersées ; cette forme monomérique est désignée sous le nom d'actine-G. En ajoutant de sels neutres (0,1 M KCl) à cette solution d'actine G, il se forme un polymère fibreux d'actine appelé actine-F

Dans les myofilaments fins qui, chez les vertébrés mesurent 1 µm de long, les monomères d'actine (actine-G) sont disposés sous la forme filamentaire (actine-F). Les molécules, au nombre de 350 environ, sont placées bout à bout et forment deux brins torsadés en hélice, le pas de l'hélice étant de 700 Å et de 13 monomères d'actine G.

### ***1.2.4. Les protéines de la matrice extracellulaire***

Le tissu conjonctif est une matrice extracellulaire composée de collagène. Le tissu conjonctif assure, ainsi, un rôle de tissu de soutien et de maintien de la cohésion des fibres musculaires. Les deux grandes classes de macromolécules extracellulaires sont les collagènes et les polysaccharides, qui associés à des protéines particulières, forment les protéoglycanes ; les protéines de ce tissu représentent entre 10 et 15 % des protéines musculaires, la protéine principale étant le collagène qui peut représenter 70 à 80 % des protéines du tissu conjonctif (**Tableau 1**).

Le collagène assure la résistance physique et les protéoglycanes permettent la diffusion des métabolites et des nutriments entre le sang et les cellules cibles. L'élastine est également une protéine présente dans ce tissu, elle apporte une élasticité à la structure. La fibronectine est une glycoprotéine de haute masse moléculaire présente dans la plupart des tissus conjonctifs où elle joue un rôle de cohésion cellulaire grâce aux liaisons à la fois avec le collagène et les protéoglycanes (Purslow et *al.*, 2002).

### ***1.3. Les différentes catégories de muscle***

Le muscle strié est un tissu très hétérogène, propriété essentielle pour sa fonction. La disponibilité de nombreux types de fibres avec des caractéristiques fonctionnelles différentes permet au muscle squelettique une optimisation du travail aux tâches diverses qu'il devra accomplir. Les fibres musculaires ne sont pas des structures statiques et leur nature dynamique rend difficile leur classement en catégories différentes (Karlsson, 1999; Bottinelli, 2000). Il existe de nombreuses méthodes de classification des fibres musculaires, pour cette raison on rencontre dans la littérature beaucoup d'appellations différentes des fibres et des muscles.

On distingue plusieurs types de muscles. Les fibres musculaires peuvent être classées selon leur couleur, leurs propriétés métaboliques ou leurs propriétés contractiles (**Tableau 2**). Les études sur le muscle squelettique, ont révélé l'existence de deux types majeurs de fibres musculaires : d'un côté, les fibres oxydatives, rouge à contraction lente de type I et de l'autre les fibres glycolytiques, blanches de type II à contraction rapide.

Les fibres rouges sont trouvées dans les muscles qui ont une activité répétitive et de longue durée et les fibres blanches sont associées à des activités puissantes, brèves et intenses qui peuvent être réalisées pendant un temps court. Sur la base d'une coloration histochimique, il a été rapporté que l'activité phosphorylase et de l'ATPase myofibrillaire sont basses mais

**Tableau 2.** Caractéristiques des types de fibres (+, bas; ++, moyen; +++, haut).  
(adapté de Lefaucheur et Gerard, 2000)

<b>Type contractil</b>	Contraction lente (Type I ou $\beta$ )	Contraction rapide (Type II ou $\alpha$ )	
		Rouge	Blanche
<b>Couleur</b>	Rouge	Rouge	Blanche
<b>Type métabolique</b>	Oxydative	Oxydo-glycolytique	Glycolytique
<b>Type de fibre</b>	$\beta$ R I	$\alpha$ R IIA	$\alpha$ W IIB
<b>Type d'activité</b>	Aérobie	Aéro-anaérobie	Anaérobie
<b>Energie de stockage</b>	Triglycérides	CP-glycogène	CP-glycogène
<b>Capacité oxydative</b> (densité capillaire, densité mitochondriale, myoglobine)	+++	+++	+
<b>Activité myosine-ATPase</b>	+	++	+++
<b>Capacité glycolytique</b>	+	+++	+++
<b>Capacité tampon</b>	+	+++	+++
<b>Résistance à la fatigue</b>	+++	++	+
<b>Production de force</b>	+	++	+++
<b>Strie Z (largeur)</b>	+++	++	+
<b>Diamètre</b>	+	+,++	+++

qu'il existe une concentration élevée en enzymes mitochondriales dans les fibres de type I ; c'est le contraire pour les fibres de type II. A l'évidence l'activité ATPase myofibrillaire dépend des propriétés mécaniques des fibres, particulièrement la vitesse de la contraction. Sur la base de la révélation de l'activité ATPase myofibrillaire à différents pH, Brooke et Kaiser (1970) ont classé les fibres en : I, IIA, IIB. Un troisième type de fibres rapides : IIX (intermédiaire entre les fibres IIA et IIB d'un point de vue métabolique), a été mis en évidence, tout d'abord chez les rongeurs, puis dans de nombreuses autres espèces (Picard et *al.*, 2002).

Les fibres musculaires peuvent être analysées sur leur capacité oxydative par la coloration de la NADH-tétrazolium réductase (NADH-Tr) ou de la succinate déhydrogénase (SDH) (Ogata, 1964 ; Padykula, 1967). Ashmore et Doerr (1971) ont combiné la coloration oxydative (SDH) avec l'activité ATPase ; ils ont classé les fibres en :  $\alpha$ R (ATPase acide-stable, oxydative),  $\beta$ R (ATPase acide-faible et oxydative) et  $\alpha$ W (ATPase acide-faible et glycolytique). Peter et al. (1972) ont utilisé la coloration de l'enzyme NADH-Tr et l'activité ATPase pour mettre en évidence trois types de fibres : contraction lente oxydative (SO), contraction rapide oxydative et glycolytique (FOG) et contraction rapide glycolytique (FG). Ces types de fibres sont respectivement les fibres  $\alpha$ R,  $\beta$ R et  $\alpha$ W. Il existe une grande ressemblance entre les fibres  $\alpha$ R,  $\beta$ R,  $\alpha$ W et les types de fibres I, IIA et IIB (Kiesling et Hansson, 1983).

L'isolement des isoformes de la chaîne lourde de myosine (MHC) par les techniques électrophorétiques est une autre manière de classer les fibres. Les fibres des types I, IIA et IIB expriment respectivement les isoformes MHC-1, MHC-IIA et MHC-IIB (Schiaffino, 1989). L'utilisation d'anticorps spécifiques de différentes isoformes de MHC a permis de révéler, en plus de ces quatre types de fibres dits purs, des fibres appelées hybrides qui forment plusieurs isoformes de MHC simultanément (Picard et *al.*, 2002)

Le muscle strié peut être classé en différents types qui découlent directement de la proportion des différents types de fibres qui les constituent..

## **2. TRANSFORMATION DU MUSCLE EN VIANDE**

La transformation du muscle en viande commence dès la mort de l'animal. Les muscles sont le siège de modification, plus ou moins importantes qui contribuent à l'élaboration et à la définition des qualités organoleptiques de la viande. Cette étape de transformation fait appel à un ensemble de processus très complexe, de nature à la fois enzymatique. Au cours de la transformation, le muscle passe successivement par trois états différents (**Figures 4**).

### ***2.1. L'état pantelant***

La saignée a pour but de retirer le plus de sang possible de la carcasse. Dans la pratique, seuls 50% environ du sang est éliminé par la méthode de saignée par étourdissement. Toutefois, dans le muscle, le sang résiduel ne dépasse pas 5 à 10%.

La rétention du sang est minimale suite à la vasoconstriction périphérique induite par l'augmentation rapide du taux de catécholamines circulantes libérées par les divers stress suivis par l'animal dans les minutes qui précèdent la saignée (Warris, 1978).

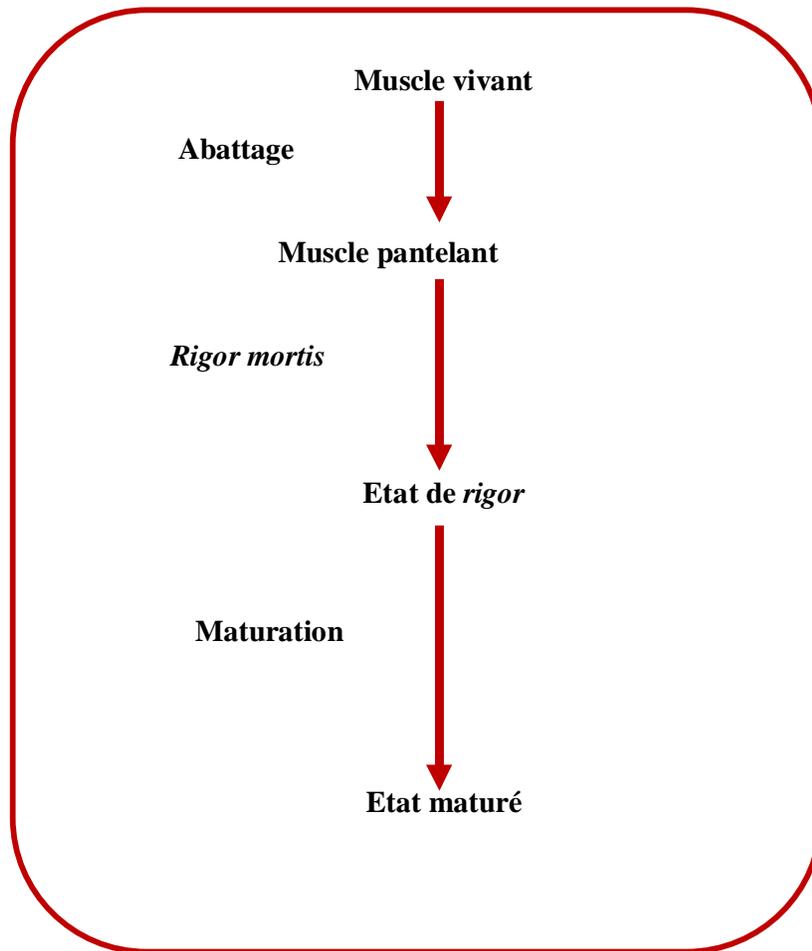
Au niveau des tissus, le principal effet de la saignée et de l'arrêt de la circulation sanguine qui en découle, est d'interrompre l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules. Le muscle continue de vivre, mais en épuisant ses réserves énergétiques (Monin, 1988).

Les mécanismes de maintien de l'homéostasie continuent de fonctionner dans la cellule pendant un certain temps, et les contractions musculaires subsistent, sans doute, en raison des excitations nerveuses. Cette phase est dénommée l'état pantelant et a une durée variable selon l'espèce considérée et les réserves énergétiques du muscle. Cette phase est encore, à ce jour, mal définie et mal comprise.

### ***2.2. L'installation de la rigidité cadavérique***

Avec la fin de la phase dite « pantelante » la rigidité cadavérique s'installe progressivement. Elle se caractérise par des tissus musculaires plus durs, inextensibles et des axes osseux plus difficiles à déplacer chez l'animal.

Dans le tissu musculaire, après abattage et l'arrêt de la circulation sanguine, l'apport d'oxygène et de substrats énergétiques exogènes (glucose, acides aminés, et acides gras) sont supprimés. Les seules réactions qui persistent, suivent des voies anaérobies, essentiellement la



**Figure 4.** Etapes successives de la transformation du muscle en viande

glycolyse. Le principal substrat énergétique est le glycogène. La phosphocréatine, présente en moindre quantité (quelques  $\mu\text{g/g}$  de muscle à la fin de la saignée), fournit également de l'ATP. Le taux d'ATP reste constant tant que la phosphocréatine est en quantité suffisante ; l'ATP hydrolysé en ADP est ainsi régénéré :



Pour cette phase, au cours de laquelle il n'y a pas de consommation nette d'ATP, le tiers environ de l'ATP synthétisé l'est à partir de la phosphocréatine. Rapidement, la phosphocréatine s'épuise et le taux d'ATP diminue. La synthèse d'ATP par la myoquinase intervient alors. Elle ne fournit qu'environ 10% de l'ATP produit au cours de cette seconde phase dont la réaction est décrite ci-dessous :



Ensuite, la voie de la glycolyse devient majoritaire. Le glycogène subit la glycolyse avec finalement production d'acide lactique et de protons ; la réaction peut être ainsi schématisée :



L'acide lactique provenant de la glycolyse s'accumule dans le tissu musculaire. Chaque molécule d'acide lactique produite est associée à la libération d'environ un proton, ce qui acidifie progressivement le muscle.

Quand les réserves en glycogène s'épuisent et quand l'acidité devient trop forte (le pH musculaire diminue alors jusqu'à une valeur dite pH ultime, variant entre 5,3 et 6,0 selon l'espèce et le muscle) pour que la glycolyse puisse se poursuivre, l'ATP n'est plus régénéré, le muscle ne peut plus relaxer : **la rigor mortis est installée** (Ouali, 1976 ; Monin, 1988 ; Got, 1997 ; Mathoniere, 1999).

La durée de cette phase est très variable en fonction du type de muscle et de l'espèce animal (quelques heures <6-10h voire moins> chez le porc contre 24h ou plus chez le bovin), (Ouali, 1990a).

La diminution du pH observée inhibe les ATPases sarcoplasmiques, des pompes à calcium maintenant le gradient de calcium, provoquant une fuite de calcium du réticulum vers le cytosol. Quand la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  atteint  $10^{-6}$  M, l'activité ATPasique de la myosine commence : formation du complexe actine-myosine.

### 2.3. *La maturation*

Il est traditionnellement admis que la maturation constitue la période d'évolution *post mortem* apparaissant à la fin de la *rigor mortis*. Les conditions de développement de la *rigor mortis* seront, donc, essentielles pour l'évolution de la maturation, processus déterminé par deux variables cinétiques, qui sont sa vitesse et son intensité (Ouali, 1990b).

Après la *rigor*, le muscle, qui a perdu irrévocablement toute propriété d'extensibilité et ne développe plus aucune contraction, va être progressivement dégradé dans une suite de processus de nature physico-chimique et enzymatique complexes au cours desquels se produisent en grande partie les divers facteurs qui déterminent les qualités organoleptiques des viandes : couleur, jutosité, flaveur et en particulier la tendreté (Lawrie, 1998).

Sur le plan morphologique, une certaine modification se produit. La fibre devient fragile, la structure de la membrane est très altérée, le sarcoplasme granuleux et les striations peuvent disparaître (Henderson *et al.*, 1970). L'examen de la fibre montre une structure faite de sarcomères contractés (Gothard *et al.*, 1966).

La microscopie électronique permet de détecter, au niveau de l'ultrastructure, des détériorations profondes, des ruptures des stries Z, un allongement des sarcomères (Cook et Wright, 1966).

### **3. ATTENDRISSAGE DE LA VIANDE ET MECANISMES IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS DE MATURATION**

Après l'abattage de l'animal, la carcasse subit des modifications contribuant en particulier à son attendrissage, qui est une des qualités les plus recherchées par les consommateurs (Jeremiah, 1982).

La tendreté d'une viande exprime la facilité avec laquelle celle-ci se laisse trancher ou mastiquer. A l'inverse, la dureté exprime la résistance qu'elle offre au tranchage ou à la mastication (Ouali, 1992).

La maturation commence dès la mort de l'animal et les conditions d'installation de la *rigor mortis* vont être déterminantes pour le déroulement de la maturation qui n'est à relier en aucun cas avec un phénomène bactériologique ; il s'agit d'un phénomène naturel. La phase de maturation conduit à un attendrissage du muscle (**Figure 5**).

Le processus d'attendrissage pour la viande n'est pas encore totalement compris et fait l'objet de nombreuses controverses. Le taux d'attendrissage varie entre les différentes espèces de mammifères avec 80% d'attendrissage réalisé en environ 5 jours après la mort de l'animal pour le porc, et 2 semaines pour le bœuf à une température réfrigérée. D'autres espèces comme le lapin ou l'agneau requièrent des temps de stockage intermédiaires. De plus, pour la volaille et plus particulièrement le poulet, l'attendrissage est très rapide, totalement accompli en 48 heures (Pette et Staron, 1990).

La maturation du muscle en viande dépend de nombreux facteurs biologiques et technologiques. Ce processus met en jeu 2 types de mécanismes fortement dépendants de la température, qui sont des phénomènes physico-chimiques et enzymatiques entre lesquels existe probablement une synergie (Ouali, 1990b).

#### ***3.1. Mécanismes physico-chimiques***

##### ***3.1.1. La température***

Le métabolisme *post mortem* est fortement influencé par la température des carcasses. La température basale de l'animal vivant est d'environ 38°C. Le fait d'abaisser la température du tissu musculaire de 38°C à des valeurs de +6 à +8°C pendant la réfrigération à 4°C a pour conséquence de diminuer la vitesse de renouvellement de l'ATP. Cependant, en dessous de ces températures, une accélération du métabolisme se produit alors que le muscle est en

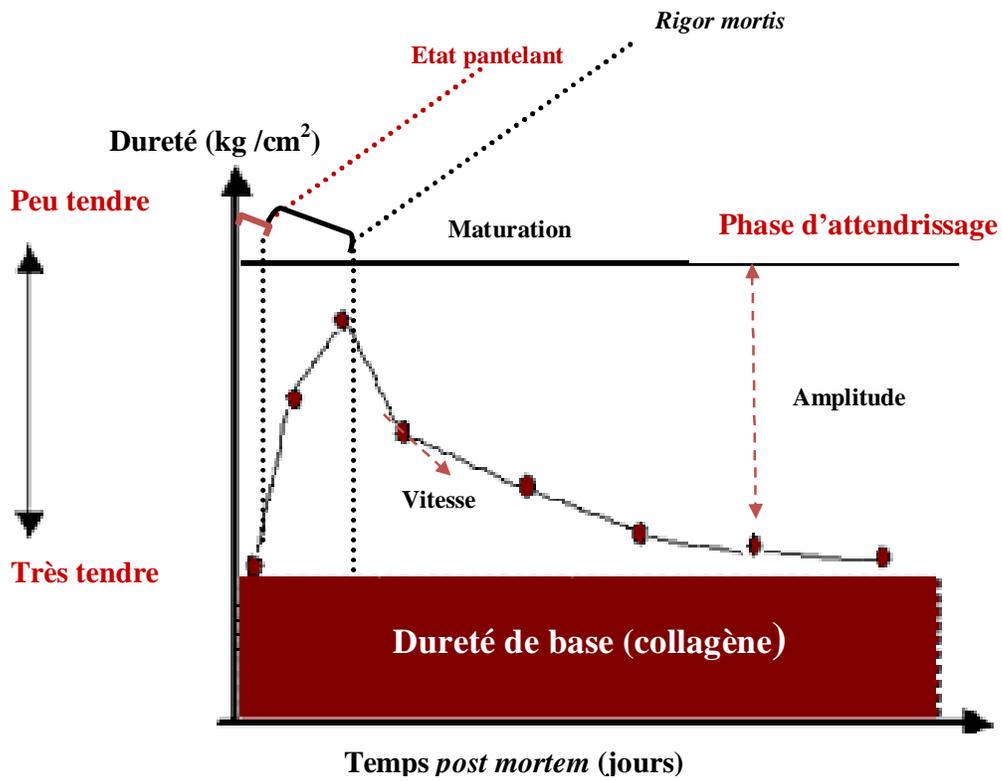


Figure 5 : Schéma d'évolution de la dureté du muscle *Longissimus thoracis* de bovin pendant la phase de conservation à l'état réfrigéré (d'après Ouali, 1991)

*prerigor*. Le muscle subit alors, une contraction très importante. L'intensité de cette contraction augmente lorsque la température décroît de 15°C à 0°C (Locker et Hagyard, 1963). La longueur des sarcomères diminue considérablement ; ce phénomène est appelé contracture au froid ou « cold shortening » (Marsh et Leet, 1966).

Aussi, si les muscles sont placés juste après l'abattage à une température supérieure à 25°C, il se produit le phénomène de « heat shortening » qui conduit également à une viande dure (Hertzman *et al.*, 1993). Cette augmentation de la dureté serait due à la myosine qui devient plus sensible à l'acidification du milieu ainsi que de l'inactivation, par la température, de certaines enzymes responsables de la dégradation de protéines myofibrillaires lors de la maturation (Dransfield, 1993).

La morphologie de la carcasse affecte la vitesse de refroidissement des muscles selon la localisation plus ou moins profondément insérés dans la carcasse. De plus, la composition intrinsèque du muscle aussi joue un rôle : la matière grasse isole plus ou moins les muscles et affecte cette vitesse de refroidissement (Smulders *et al.*, 1991).

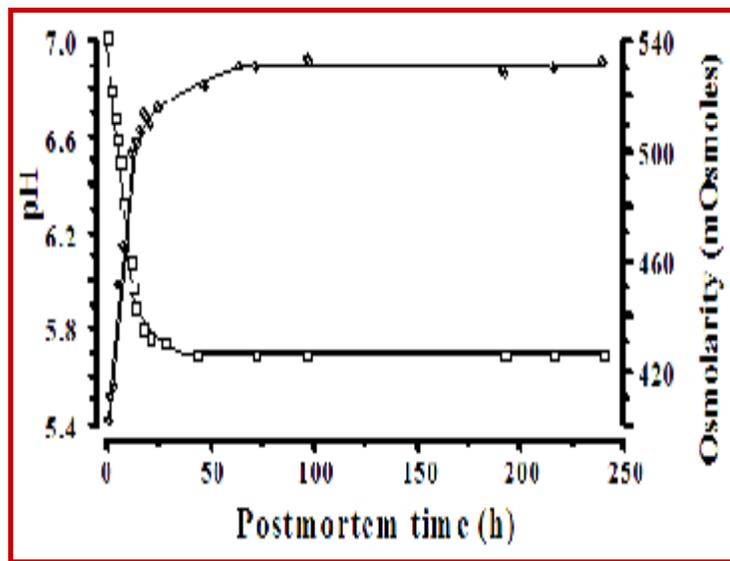
Le facteur température, et en particulier sa vitesse de chute dans les premiers heures *post mortem*, est très important pour la tendreté finale de la viande. En fait, les températures intermédiaires (autour de 15°C) semblent être les plus favorables à un bon attendrissage des viandes (Simmons *et al.*, 1996).

### 3.1.2. Le pH

Le pH est le paramètre de la viande le plus souvent mesuré. Son suivi au cours de la maturation est un moyen de contrôler la qualité.

L'évolution *post mortem* du pH peut être caractérisée par sa vitesse et son amplitude : la vitesse est directement proportionnelle à l'activité d'hydrolyse de l'ATP ou activité ATPasique (**Figure 6**). Tout facteur modifiant l'activité ATPasique entraîne un changement similaire de la vitesse de chute du pH. L'*amplitude* est mesurée par le pH ultime puisque le pH musculaire avant l'abattage est à peu près constant et proche de la neutralité. Elle est proportionnelle pour un muscle donné, à la quantité totale de lactate produit ou encore de glycogène dégradé (Bendall, 1973).

La vitesse de chute du pH intervient dans la tendreté finale de la viande. Cette vitesse est dépendante de la température, celle-ci est minimale à 17°C, puis elle augmente quand la température augmente, mais aussi quand la température diminue. Les muscles dont le pH a



**Figure 6.** Evolution *post mortem* du pH et de l'osmolarité du muscle *Longissimus dorsi* bovin stocké 24h à 15°C puis à 4°C (d'après Ouali, 1990b)

chuté très lentement, généralement, sont plus tendres (Hamm, 1982 ; Smulders *et al.*, 1990 ; Dransfield, 1994).

Après la mort de l'animal, le pH musculaire, proche de la neutralité (7,0-7,2) chez l'animal vivant, diminue en quelques heures à une valeur assez stable (pH ultime) qui est normalement comprise entre 5,4 et 5,6 dans la plupart des muscles. De nombreux résultats ont mis en évidence un effet du pH ultime sur la tendreté de la viande. Des relations linéaires positives entre pH ultime et tendreté, estimée par mesure mécanique ou par analyse sensorielle, ont été rapportées pour la viande de bœuf (Bouton *et al.*, 1973 ; Bouton *et al.*, 1982), de veau (Guignot, 1992). D'autres travaux ont révélé l'existence d'une relation curvilinéaire entre le pH ultime et la tendreté de la viande de bœuf (Purchas, 1990). De telles relations ont été obtenues lorsque le pH ultime présentait une large amplitude de variation (5,4 à 7,0). Une valeur minimale de la tendreté est enregistrée pour des valeurs de pH variant de 5,7 à 6,0.

Les carcasses qui ont le pH le plus bas juste après la mort de l'animal, produisent la viande la plus tendre (Eliers *et al.*, 1996). De même, les viandes PSE (Pale-Soft-Exsudative), à vitesse rapide de chute du pH, ont été jugées plus dures par un jury de dégustateurs (Buchter et Zeuthen, 1971). Lorsque l'acidification du muscle est très rapide, le pH peut atteindre des valeurs inférieures à 5,5 en moins d'une demi heure. Ces viandes proviennent d'animaux, qui ont épuisé, juste avant l'abattage, leur stock de glycogène, le transformant en acide lactique, acidifiant très rapidement le muscle. A ce moment, la température des muscles est encore de l'ordre de 40°C, ce d'autant plus que le métabolisme très actif tend à augmenter la température. Cette conjonction, pH bas-température élevée dénature, fortement les protéines sarcoplasmiques (précipitation) et affecte aussi les protéines myofibrillaires. Les protéines myofibrillaires subissent aussi des altérations. Une partie des charges électriques des protéines est neutralisée par la fixation en quantité importante d'ions divalents  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ , ce qui tend à resserrer le réseau myofibrillaire. Le tout conduit à une diminution supplémentaire du pouvoir de rétention d'eau. Également, ce pH acide dénature les enzymes endogènes qui ne peuvent plus attendrir la viande lors de la maturation. Enfin, ces conditions de pH bas et température élevée endommageraient gravement les membranes cellulaires, facilitant l'écoulement de l'eau intracellulaire vers les espaces extracellulaires et donc l'exsudation. A l'inverse, les viandes DFD (Dark-Firm-Dry) présentant un pH ultime anormalement élevé, sont plus tendres que les viandes normales ; ces viandes proviennent d'animaux stressés quelques heures avant l'abattage, et qui ont, par conséquent, consommé tout leur stock de glycogène

mais le temps entre le stress et l'abattage est suffisant pour que le pH acide augmente mais non pour reconstituer une réserve énergétique en conséquence après la mort de l'animal, le pH ne peut donc plus chuter et il reste élevé lors du stockage. On a attribué la bonne tendreté des viandes à haut pH ultime à une forte capacité de rétention d'eau (Tarrant, 1981 ; Sanz *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997).

### **3.1.3. La pression osmotique**

La pression osmotique augmente juste après la mort de l'animal et tend à se stabiliser à la fin de la période de la rigidité cadavérique. Par analyse enthalpique différentielle, méthode permettant de mesurer (Bonnet *et al.*, 1992) sur des échantillons de muscle entier, l'osmolarité de ce tissu, il a été montré (Figure 6) que celle-ci croît au cours de la phase d'installation de la *rigor mortis* pour atteindre, à la fin de cette phase, des valeurs (500-600 mOsmoles) presque deux fois plus élevées que les valeurs physiologiques (270-300 mOsmoles). Elles correspondent à la formation de métabolites et à la libération d'ions libres initialement concentrés dans le réticulum sarcoplasmique et dans les mitochondries (Ouali, 1990b). Ceci correspond à des forces ioniques voisines de 0,25-0,30 et équivalentes à des concentrations de NaCl de 0,25-0,30 M, forces ioniques suffisantes pour causer des dommages importants. Parallèlement à l'acidification du muscle, la pression osmotique augmente à cause de l'accumulation d'acide lactique et d'autres métabolites. Cette augmentation de la pression osmotique a deux effets principaux : dans un premier temps, elle participe à une altération des structures contractiles par une solubilisation des protéines myofibrillaires. Ainsi, la maturation sera plus rapide dans un muscle dont la pression osmotique est importante (Ouali, 1992) et dans un deuxième temps, elle permet de réguler et de faciliter l'action protéolytique.

### **3.1.4. La capacité de rétention d'eau**

Dans la cellule musculaire, la majorité de l'eau est retenue par capillarité dans les espaces intramyofibrillaires et le reste se trouve au niveau des espaces intermyofibrillaires et extracellulaires (Hermansson et Luciano 1982).

Après la mort de l'animal, les interactions des protéines myofibrillaires avec l'eau évoluent (Durton 1983). En effet, avec le temps post mortem, le pH chute et se rapproche du point isoélectrique des protéines myofibrillaires ( $pH_i = 5$ ). Cette chute a pour conséquence de resserrer le réseau protéique myofibrillaire (Offer et Knight 1988). Les

espaces intra et intermyofibrillaires diminuent et l'eau est expulsée dans l'espace extracellulaire, puis à l'extérieur de la cellule (Boakye et Mittal 1993). La capacité de rétention d'eau des protéines myofibrillaires diminue donc avec le temps post mortem (Hamm 1982).

La capacité de rétention d'eau peut être estimée de différentes manières : par compression, centrifugation, gravité, capillarité ou résonance magnétique nucléaire (Trout 1988). Les valeurs obtenues sont très dépendantes de la méthode utilisée, donc il est particulièrement difficile de comparer les résultats obtenus dans les différentes études (Zamora 1996).

### **3.2. Mécanismes enzymatiques**

Dans la cellule musculaire, la présence de systèmes protéolytiques efficaces est indispensable au bon fonctionnement du turnover protéique. Après la mort des animaux, ces systèmes protéolytiques sont également sollicités puisqu'ils semblent impliqués dans le processus de maturation des viandes (Valin, 1985 ; Goll *et al.*, 1989).

Au cours de la maturation dans les conditions réfrigérées, les composants myofibrillaires du muscle sont dégradés et permettent ainsi à la viande de s'attendrir. Les raisons de cet attendrissement ne sont pas encore bien définies. Il demeure encore un grand nombre de contradictions.

Il existe différents systèmes protéolytiques qui ne sont plus régulés *post mortem* et qui sont responsables des altérations structurales et biochimiques des muscles conduisant à une fragilisation de ce tissu et, par voie de conséquence, à l'amélioration de sa tendreté. Cependant, le poids relatif des différents systèmes enzymatiques dans ce phénomène n'est pas encore élucidé (Ouali, 1992 ; Sentandreu *et al.*, 2002).

Cette protéolyse *post mortem* qui joue un rôle majeur dans l'élaboration des propriétés de texture des viandes, est toutefois limitée puisqu'apparemment elle n'affecte pratiquement pas le collagène ; ce qui fait de cette protéine, un des facteurs limitants majeurs de la tendreté des viandes au moins chez les animaux adultes.

#### **3.2.1. Généralités sur les protéases**

Les protéases sont des enzymes spécialisées dans la catalyse des liaisons peptidiques, plus communément appelées *enzymes protéolytiques* ; elles appartiennent à la classe 3.4 selon

la classification de la Commission sur les enzymes (EC), formée par l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

Ces enzymes sont ubiquitaires dans la nature et jouent des rôles essentiels dans les processus intracellulaires et extracellulaires, aussi bien que dans la régulation des voies physiologiques. Ces dernières regroupent la dégradation des protéines mal repliées (effectuée par les protéasomes), la coagulation sanguine, la maturation protéolytique des précurseurs polypeptidiques, le contrôle de l'apoptose, la défense immunitaire, le clivage du peptide signal, et bien d'autres.

Elles ont des activités soit exoprotéasiques, soit endoprotéasiques. **Les exoprotéases** (peptidases) dégradent les protéines par élimination progressive des acides aminés à partir de leur extrémité N-terminale ou C-terminale. Bien que *post mortem*, l'activité exopeptidasique soit très limitée dans les conditions normales de conservation de viandes, le muscle n'en possède pas moins un équipement très complet d'exopeptidases.

**Les endoprotéases** (protéinases) hydrolysent les protéines au niveau de sites internes spécifiques, Leur spécificité de substrat est étroite et dépend de la présence d'amino-acides caractéristiques (Barrett, 1977).

L'hydrolyse de la liaison peptidique par une protéase est un mécanisme complexe basé sur la structure moléculaire des protéines. La vitesse de la réaction (ou cinétique) est, ensuite fonction de plusieurs facteurs environnementaux (pH, température, force ionique), du ratio enzyme-substrat, de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, de la durée de contact, de la présence de co-facteurs, d'activateurs ou d'inhibiteurs (Barrett, 1980b ; Barrett *et al.*, 1998).

D'après le type catalytique (désignant la nature du groupe chimique responsable du mécanisme catalytique), on discerne quatre types distincts de mécanisme catalytique utilisés par les protéinases : sérine protéinases, cystéine protéinases, aspartyl protéinases, métalloprotéinases (Hartley, 1960). Pour permettre de classer chacune des protéinases selon ce système pratique, l'utilisation des inhibiteurs a grandement contribué à l'identification et à la distinction des différents types catalytiques (Barrett, 1994).

Les protéinases sont un groupe d'enzymes qui paraît jouer un rôle majeur dans la protéolyse *post mortem* par opposition aux activités exopeptidasiques. En effet, elle protéinases appartenant aux quatre groupes de cette classification sont présentes dans le tissu musculaire, c'est-à-dire dans les fibres musculaires et les cellules mononuclées identifiées

dans ce tissu musculaire (fibroblastes, mastocytes, cellules satellites, leucocytes...) (Valin, 1985 ; Sentandreu *et al.*, 2002).

### **3.2.2. Les endoprotéases et la tendreté de la viande**

#### **3.2.2.1. Les sérine protéases**

Les études d'immunolocalisation ont indiqué que les cellules de muscle peuvent contenir des protéinases neutres ou alcalines de type sérine (Kay *et al.*, 1985). Plus récemment, Margolius (1996) a rapporté la présence dans la fibre musculaire de la kallikréine une protéinase à sérine qui a une implication importante dans le métabolisme des cellules du muscle et de l'homéostasie (Mayfield *et al.*, 1996). Dans le muscle, la thrombine joue un rôle aussi important dans la dégradation et transformation de la jonction neuromusculaire et de la synapse que dans des pathologies inflammatoires affectant les muscles squelettiques (Akaaboune *et al.*, 1998 ; Mbebi *et al.*, 1999). Birkedal-Hansen *et al.* (1993) ont montré que plusieurs sérines protéinases et metalloprotéinases existent dans la matrice extracellulaire. Parmi les sérines protéinases, la plasmine et son précurseur le plasminogène sont fortement concentrés dans le tissu musculaire.

Les études réalisées sur les protéinases à sérine sont rares puisque on pense que les sérines protéases sont localisées seulement dans les mastocytes (Park *et al.*, 1973), c'est pour cette raison que rien n'est connu sur leur rôle potentiel dans l'attendrissement de la viande. Cependant, certains auteurs n'ont trouvé aucun changement de la dureté finale des coupes de bœuf injectés avec du PMSF (Phenyl-Methyl-Sulphonyl-Fluoride), un inhibiteur irréversible des protéinases à sérine. D'autres ont rapporté une dureté finale plus élevée par des viandes de bœuf injectée avec PMSF suggérant une contribution des protéinases à sérine non identifiées à la protéolyse du muscle (Uytterhaegen *et al.*, 1994 ; Alarcon-Rojo et Dransfield, 1995). Cette hypothèse a été soutenue par des résultats récents montrant que parmi 29 variables biologiques et physico-chimiques susceptibles d'expliquer la variabilité de l'attendrissement de la viande (la teneur en inhibiteurs des sérine protéinases, la vitesse de chute de l'activité  $\mu$ -calpaïne, l'amplitude et la vitesse de chute du pH, l'amplitude d'augmentation de l'osmolarité, le métabolisme glycolytique des muscles,...), la teneur en inhibiteurs de sérine protéinases occupe la première place (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005).

### 3.2.2.2. Les cystéine protéases

#### A. Les calpaïnes

En 1964, Guroff décrit pour la première fois, une protéase dans les fractions solubles de cerveau de rat, qui fut finalement purifiée en 1976 par Dayton *et al.* Il s'agit de la calpaïne (EC 3.4.22.17). C'est une cystéine protéinase calcium dépendante et de pH optimal neutre, ce qui lui vaut également la nomenclature CANP (« Calcium Activated Neutral Protease »). Chez les vertébrés, les calpaïnes forment une grande famille comprenant plus de dix membres. Ce système est composé de différentes isoformes de protéinases (**Tableau 3**) et d'un inhibiteur endogène, la calpastatine.

Les premiers travaux portant sur les calpaïnes dans le muscle squelettique ont été rapportés en 1972 par Bush *et al.* Dans le tissu musculaire, la  $\mu$ -calpaïne et la m-calpaïne sont trouvées dans toutes les espèces d'animaux et la  $\mu$ /m calpaïne a été localisée seulement dans le muscle de poulet. La calpaïne spécifique du muscle nommée p94 était identifiée génétiquement (Sorimachi *et al.*, 1989), mais étant très instable, elle n'a jamais été purifiée. Au sein du muscle, les calpaïnes ont été localisées au niveau de la bande I, au voisinage de la strie Z ainsi qu'au niveau du sarcolemme.

Les calpaïnes pourraient être le système majeur intervenant dans l'attendrissage de la viande. Cependant, on ne sait toujours pas si la protéolyse *post mortem* implique principalement  $\mu$ - ou m-calpaïne ou toutes les deux (Boehm *et al.*, 1998 ; Delgado *et al.*, 2001) et quels substrats des calpaïnes sont les plus importants pour l'attendrissage de la viande (Huff-Lonergan et Lonergan, 1999). Elles peuvent être en contact avec les protéines myofibrillaires. La concentration en calcium libre dans le sarcoplasme augmente durant la contraction du muscle après la mort de l'animal. Cette concentration en calcium (110  $\mu$ M) est suffisante pour activer la  $\mu$ -calpaïne (Koochmaraie *et al.*, 1987), mais nsuffisante pour activer la m-calpaïne (Edmunds *et al.*, 1991). L'activation des calpaïnes conduit progressivement à leur autolyse. Une autolyse trop importante peut conduire à une inactivation de la calpaïne. La diminution de l'activité de la  $\mu$ -calpaïne au cours de la maturation peut être dûe à son autolyse (Boehm *et al.*, 1998). Toutes ces observations conduisent à suggérer que la  $\mu$ -calpaïne est principalement responsable de la dégradation *post mortem* et que la m-calpaïne joue un rôle mineur (Dransfield, 1993 ; Koochmaraie, 1996 ; Veiseth et Koochmaraie, 2005).

La fragilisation de la strie Z, principale modification structurale obtenue au cours de l'attendrissage ainsi que l'apparition d'un fragment de 30 kDa, sont reproduites lorsque les calpaïnes sont incubées avec des myofibrilles (Taylor *et al.*, 1995). Cependant, les calpaïnes

**Tableau 3.** Membres de la famille des calpaïnes (modifié d'après Perrin *et al.*, 2004)

<b>Calpaïne protéine</b>	<b>Autres noms</b>	<b>Distribution tissulaire</b>
<i>Calpaïne 1</i> (EC. 3.4.22.52)	$\mu$ -calpaïne, CANP1	Ubiquitaire
<i>Calpaïne 2</i> (EC. 3.4.22.53)	m-calpaïne, CANP2	Ubiquitaire
<i>Calpaïne 3</i> (EC. 3.4.22.B7)	nCL-1, p94, Lp82, Lp85, Lp88	Muscle squelettique, rétine
<i>Petite sous-unité 1</i> (EC. 3.4.22.B24)		Ubiquitaire
<i>Calpaïne 5</i> (EC. 3.4.22.B25)	htra3, nCL-3	Ubiquitaire
<i>Calpaïne 6</i> (EC. 3.4.22.B26)	CANPX, calpamoduline	Placenta
<i>Calpaïne 7</i> (EC. 3.4.22.B27)	palBH	Ubiquitaire
<i>Calpaïne 8</i> (EC. 3.4.22.B28)	nCL-2	Muqueuse stomacale
<i>Calpaïne 9</i> (EC. 3.4.22.B29)	nCL-4	Tractus digestif
<i>Calpaïne 10</i> (EC. 3.4.22.B30)	CANP10	Ubiquitaire
<i>Calpaïne 11</i> (EC. 3.4.22.B31)		Testicules
<i>Calpaïne 12</i> (EC. 3.4.22.B32)		Ubiquitaire
<i>Calpaïne 13</i>	Sol H	Ubiquitaire

ne peuvent, à elles seules, reproduire l'ensemble des modifications *post mortem* intervenant au niveau de la structure myofibrillaire (Taylor *et al.*, 1995). Ainsi, la fragmentation observée au niveau de la bande I n'est pas retrouvée suite à l'incubation de myofibrilles avec les calpaïnes. Raynaud *et al.* (2005) ont montré que la calpaïne I est concentrée dans les lignes N1 et N2 de la région de la titine et ceci pourrait être un réservoir de calpaïne I dans la cellule. Il existerait donc une régulation spéciale de la libération de l'enzyme et par conséquent une régulation très fine de l'équilibre entre l'enzyme libre et l'enzyme unie. Dransfield (1992a) a précisé en utilisant un modèle mathématique basé sur l'activité des calpaïnes, que ce modèle a fixé exactement la tendreté finale de la viande à pH normal, mais n'a pas fourni une bonne prévision de la texture de la viande à pH élevé qui a toujours été trouvée anormalement dure. D'autres systèmes protéolytiques doivent donc intervenir dans l'attendrissage de la viande.

### **B. Les cathepsines**

Le terme « cathepsine » indique, généralement des protéinases situées dans les lysosomes et, la plupart du temps actives au pH acide. Les cathepsines ont été découvertes en 1955 par De Duve *et al.* Les cathepsines lysosomales sont présentes dans tous les types cellulaires à l'exception des globules rouges. Les propriétés des cathepsines lysosomales dans les différentes espèces animales et les différents types cellulaires sont similaires. Ces endoprotéases lysosomales sont petites avec un poids moléculaire compris entre 20 et 50 kDa. Leur pH optimal est voisin de 6 avec de nombreux substrats et elles sont instables à pH supérieur à 7. **Le tableau 4** montre un groupe hétérogène qui renferme des cystéine protéinases (cathepsines B, F, K, H, L et S) et des protéases à acide aspartique (cathepsines D et E). Leur activité est commandée par plusieurs facteurs comprenant le pH, le potentiel redox, l'ampleur de l'activation des précurseurs et les inhibiteurs endogènes spécifiques.

Les cathepsines lysosomales et les calpaïnes sont les deux systèmes enzymatiques endogènes les plus largement étudiés en relation à l'attendrissage de la viande (Jiang, 2000). Les idées qui rejettent la contribution des cathepsines dans le développement de l'attendrissage de la viande sont principalement basées sur deux types d'observations. D'abord, les activités des cathepsines n'ont pas expliqué les différences dans l'attendrissage des échantillons de viande (Koochmaraie *et al.*, 1988 ; Whipple *et al.*, 1990). En second lieu, les études d'inhibition ont prouvé que quelques inhibiteurs des cathepsines ne pouvaient pas supprimer la protéolyse *post mortem* ; mais, au contraire, un inhibiteur de protéinases à cystéine comme l'E-64 entraîne l'absence de protéolyse des myofibrilles et donc l'attendrissage du muscle. Cet inhibiteur spécifique exerce son action sur les calpaïnes et les cathepsines à cystéine

**Tableau 4.** Tableau récapitulatif des cathepsines (modifié d'après Sentandreu *et al.*, 2002).

Noms	Nombre EC	Classification et type	Taille (kDa)	Gamme de pH optimum	pI
Cathepsine B	3.4.22.1	Famille des protéases a cystéine	30 (25+5)	5,5-6,5	4,5-5,5
Cathepsine D	3.4.23.5	Famille des protéases à acide aspartique	45 (30+15)	3,0-5,0	6,8
Cathepsine E	3.4.23.34	Famille des protéases à acide aspartique	42	3,0-3,5	4,1
Cathepsine F	3.4.22.41	Famille des protéases a cystéine	-----	5,2-6,8	-----
Cathepsine H	3.4.22.16	Famille des protéases a cystéine	28 (23+5)	6,5-6,8	6,0-7,1
Cathepsine K	3.4.22.38	Famille des protéases a cystéine	29	6,0-6,5	-----
Cathepsine L	3.4.22.15	Famille des protéases a cystéine	28 (24+4)	5,5-6,5	5,0-6,3
Cathepsine S	3.4.22.27	Famille des protéases a cystéine	24	6,0-6,5	6,3-7,0

**Tableau 5.** Principales fonctions des serpins et représentants respectifs de cette famille (d'après Emmerich, 1996).

<b>Fonctions</b>	<b>Serpines impliquées</b>
1.- Modelage de la matrice extracellulaire	$\alpha$ 1-AT, $\alpha$ 1-Achy, PAI-1, PAI-2, PN-1
2.- Précurseur d'hormones	$\alpha$ 1-antichymotrypsine
3.- Transporteur d'hormones	TBG, CBG
4.- Protéolyse intracellulaire	Inhibiteur des leucocytes
5.- Régulation de la pression artérielle	Angiotensinogène
6.- Inhibition tumorale	Maspine
7.- Modulation de la réponse inflammatoire	$\alpha$ 1-Achy, virus de la variole
8.- Différenciation cellulaire	PN-1, PEDF
9.- Migration cellulaire	PAI-1
10.- Repliement protéique	HSP 47 de la souris
11.- Toxicité virale ou parasitaire	Virus de la vaccine, virus de la variole, myxoma virus
12.- Régulation de complément	Inhibiteur de la C1-estérase
13.- Régulation de la fibrinolyse	$\alpha$ 2-AP, PAI-1, PAI-2
14.- Régulation de la coagulation	AT, HC II, PCI, $\alpha$ 1-AT, $\alpha$ 2-AP

( $\alpha$ 2-AP:  $\alpha$ 2-antiplasminine ; AT : antithrombine III; HC II: 2<sup>ème</sup> cofacteur de l'heparine; PCI: inibiteur de la protéine C activée; TBG: thyroxin binding globulin ; CBG : cortisol binding globulin ; HSP: heat shock protein; PN-1 : protease nexin-1 ; PEDF : pigment epithelium-derived factor ; PAI : plasminogen activator inhibitor)

(cathepsines B, H et L). Ce résultat souligne que cette classe de protéinases joue un rôle primordial dans la dégradation *post mortem* de la viande (Mikami *et al.*, 1987 ; Ouali, 1990a).

Une autre raison de rejeter l'action des cathepsines sur les protéines myofibrillaires a été qu'il y a peu ou pas de dégradation d'actine et de myosine pendant le vieillissement, deux protéines extrêmement sensibles à l'action des cathepsines (Ouali *et al.*, 1987, 1988 ; Koochmaraie *et al.*, 1991). Un autre argument principal que les cathepsines ne pourraient pas participer à la protéolyse *post mortem* a été le fait qu'elles sont contenues dans les lysosomes, et ainsi elles ne pourraient avoir aucun accès à la structure myofibrillaire sans dommage antérieur de la membrane lysosomale (Koochmaraie, 1996).

Au contraire, il existe des arguments qui soutiennent que les cathepsines pourraient intervenir dans l'attendrissage de la viande. Des études *in vitro*, où les protéines myofibrilles sont incubées avec des enzymes lysosomales, révèlent qu'elles sont capables de dégrader la troponine T, la titine, l'actine, la myosine, l' $\alpha$ -actinine (Mikami *et al.*, 1987 ; Ouali *et al.*, 1987). Ces résultats confirment les observations faites suite à la dégradation *post mortem* du muscle *in vivo*. Le système lysosomal est spécifique, puisque ces protéases sont emprisonnées dans des vésicules, les lysosomes ; ce qui les prive d'un contact direct avec leur substrat, les myofibrilles. Il a été montré que les membranes de ces lysosomes étaient rompues après la mort de l'animal et au cours de la période *post mortem*, permettant une libération de ces enzymes. Ces résultats sont confirmés par une augmentation de l'activité de certaines enzymes considérées comme des indicateurs de rupture de la membrane des lysosomes : la  $\beta$ -glucuronidase et la phosphatase acide (Dutson et Lawrie, 1974). Après la mort de l'animal, une accumulation d'acide lactique va provoquer une diminution du pH à des valeurs proches de 5,4 (Ouali, 1990a). La chute du pH entraîne une rupture des membranes des lysosomes et donc une libération de leurs contenus.

Même si plusieurs changements *post mortem* de l'ultrastructure du muscle peuvent être imités par le traitement des myofibrilles avec les extraits lysosomaux, certains autres telle la diminution de la densité de la ligne Z sont expliqués par le traitement des myofibrilles avec des calpaïnes ou le protéasome. Puisque tous ces changements structurels identifiés dans le muscle *post mortem* ne peuvent pas être expliqués par l'action d'un système protéolytique, un effet synergique des calpaïnes et des cathepsines doit être considéré (Ouali, 1992).

### 3.2.2.3. *Les aspartate protéinases*

Le muscle en contient deux : la cathepsine D (EC 3.4.23.5) et la cathepsine E (EC 3.4.23.7). La cathepsine D est la plus abondante des enzymes lysosomales. Elle a un poids moléculaire de 42 kDa et son pH optimal est compris entre 3 et 5. De répartition ubiquitaire, sa présence a été démontrée dans les lysosomes de très nombreux types de cellules y compris dans la fibre musculaire. La cathepsine D lyse les protéines comme l'hémoglobine, la myosine, les protéines sarcoplasmiques, mais elle a très peu d'effet sur le collagène. Dans le muscle, la cathepsine D hydrolyse la chaîne lourde de la myosine, l' $\alpha$ -actinine, la tropomyosine et les troponines T et I à pH 3 (Tessitore *et al.*, 1987).

La cathepsine E a un poids moléculaire de 80 kDa et son pH optimal est compris entre 3,0 et 3,5. Elle dégrade l'albumine sérique et l'hémoglobine. Venugopal et Bailey (1978) ont mentionné l'activité de la cathepsine E dans le muscle *Diaphragma* de bovin et de porc, mais des incertitudes existent sur l'origine de l'activité cathepsine E dans le muscle (Asghar et Bhatti, 1987).

### 3.2.2.4. *Les métalloprotéinases*

Les métalloprotéinases auxquelles un ion métallique, habituellement un atome de zinc, participe activement (groupe prosthétique), et est nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme, forment le plus diverse des type catalytiques des protéinases. L'activité maximale de ces enzymes est observée à pH neutre, 7,5/8,5 ; elle chute très rapidement en dessous de pH 7,0 et est nulle à pH 5,0 (Valin, 1985). Au moins 18 métalloprotéinases différentes ont été identifiées avec un poids moléculaire entre 25 et 75 kDa (Barrett *et al.*, 1998).

Les collagénases (EC 3.4.24.3) sont les seules métalloprotéinases connues dans le tissu musculaire. Les collagénases des vertébrés sont normalement trouvées sous forme inactive ou partiellement active. Il semble probable que cette latence résulte de l'interaction avec un inhibiteur sérique ou tissulaire (Valin, 1985).

Dans le muscle squelettique, la matrice extracellulaire est structurellement et fonctionnellement complexe. Cette matrice, qui contient le collagène (types I, III, IV, V et VI), les glycoprotéines (laminine et fibronectine) et les protéoglycanes, contribue aux caractéristiques mécaniques du muscle et à la transmission de la force du muscle au tendon. Les métalloprotéinases dégradent les différents types de collagène ainsi que les protéines

cytosquelettiques reliant le sarcolemme à la matrice extracellulaire, aux dystroglycanes et aux plaques neuromusculaires (Nagase, 1996 ; Yamada *et al.*, 2001).

Les collagénases sont très spécifiques. Elles coupent les trois chaînes de la triple hélice de collagène en un seul point, coupure au 3/4, 1/4 de la longueur de la chaîne. L'activité de ces enzymes sur le collagène est fonction du type de collagène (Valin, 1985). Puisque le collagène ne subit pas de changements drastiques pendant le stockage de la viande aux basses températures (0-4°C), très peu de travaux ont été réalisés sur ce groupe d'enzyme.

### 3.2.2.5. *Le protéasome*

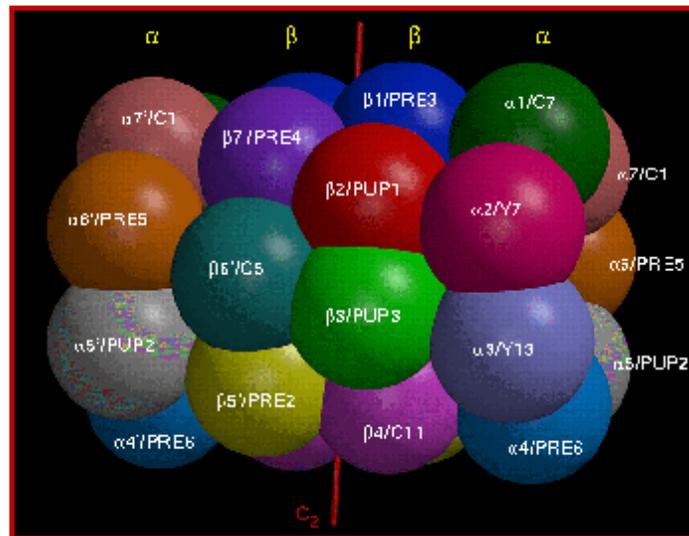
Il a été décrit pour la première fois en 1980 dans l'hypophyse de bovin (Orlowski et Wilk, 1981). Le protéasome est aussi appelé complexe protéolytique multicatalytique (MCP), puisque la présence de multiples activités distinctes a été mise en évidence (Rivett, 1993). Il est présent dans la plupart des cellules vivantes aussi bien dans le cytosol que dans le noyau (Rivett, 1989).

On peut différencier deux isoformes selon leurs coefficients de sédimentation, le 20S et le 26S (Goldberg, 1992). Le rôle physiologique du protéasome de 20S est inconnu, mais il doit avoir un intérêt puisqu'il est très largement distribué dans les différents types cellulaires et aussi dans un grand nombre d'espèces allant des bactéries aux mammifères (**Figure7**). Quant au protéasome de 26S, il catalyserait une voie protéolytique responsable de l'élimination sélective de protéines endogènes impliquées dans la régulation métabolique (Goldberg, 1992). Les activités protéolytiques nécessitent une gamme de pH comprise entre 6 et 8 (Dutaud *et al.*, 1996).

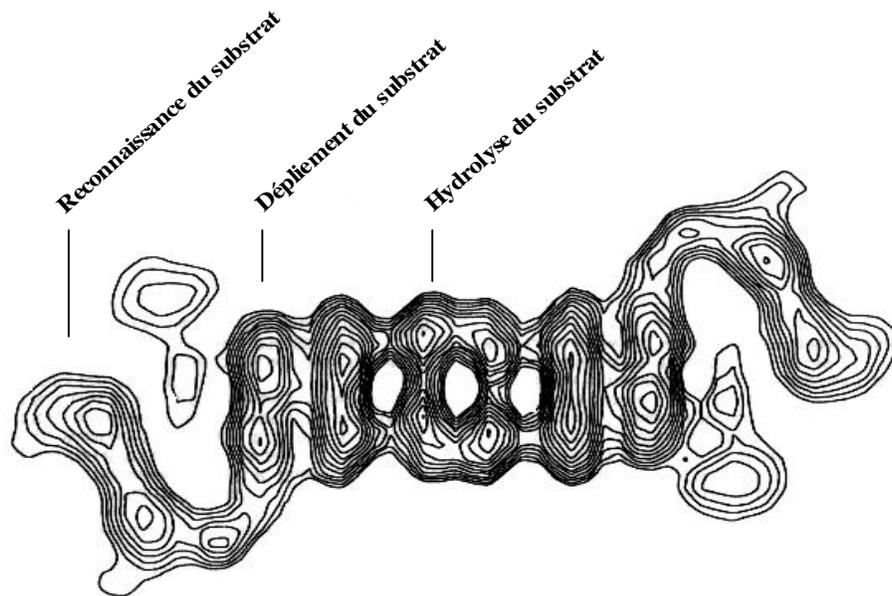
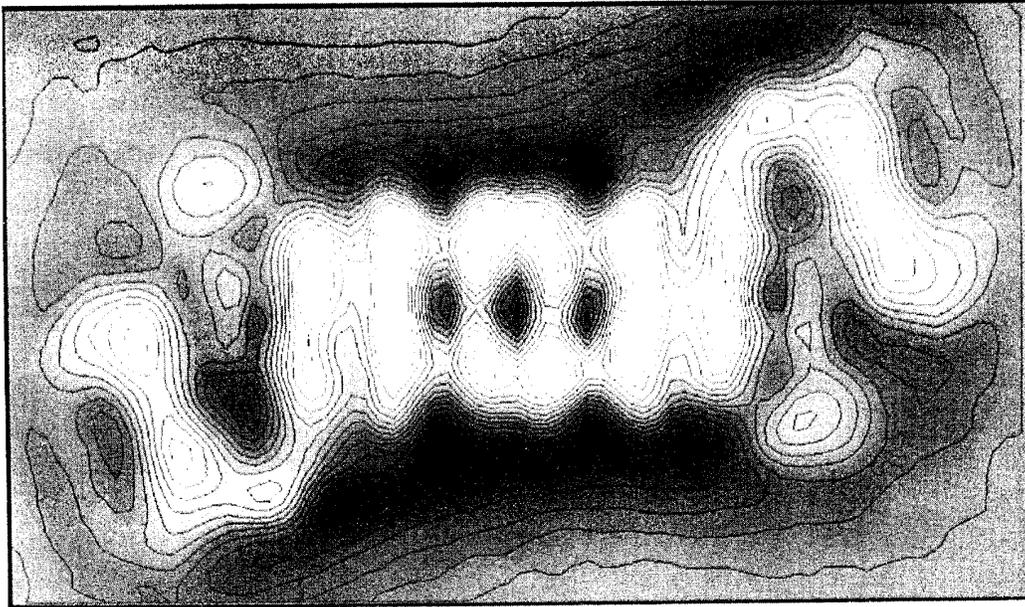
Tous les sous-types des complexes protéasome existent dans le muscle squelettique (Dahlman *et al.*, 2000 ; Dahlman *et al.*, 2001). Dans les muscles de bovin la concentration de protéasome est de 200 à 350 µg/g de tissu humide (Dutaud, 1998).

Le rôle du protéasome durant l'évolution *post mortem* de la viande a été peu étudié et les résultats publiés sont contradictoires.

L'incubation de myofibrilles d'ovins avec une préparation de protéasome montre que la troponine C et les chaînes légères de la myosine sont dégradées (Koochmariaie, 1992). Dans les conditions réelles de stockage, après la mort de l'animal, ces protéines myofibrillaires ne sont habituellement pas dégradées.



**Figure 7.** Organisation spatiale des sous-unités du protéasome 20S de *S. cerevisiae* (<http://www.biochem.mpg.de/xray/projects/hubome/yp.r.html>)



**Figure 2:** Structure générale du protéasome 26S, observée en microscopie électronique (en haut), et fonctions plausibles des différentes parties de la molécule (en bas). L'image du haut est issue du calcul de la moyenne des centres de masse d'environ 3000 molécules. Elle montre une partie centrale, cylindrique constituée du protéasome 20S, entourée de deux complexes 19S orientés tête-bêche (d'après Koster *et al.*, 1995 et [http://www.biochem.mpg.de/baumeister/image/detection\\_result\\_26s.html](http://www.biochem.mpg.de/baumeister/image/detection_result_26s.html)).

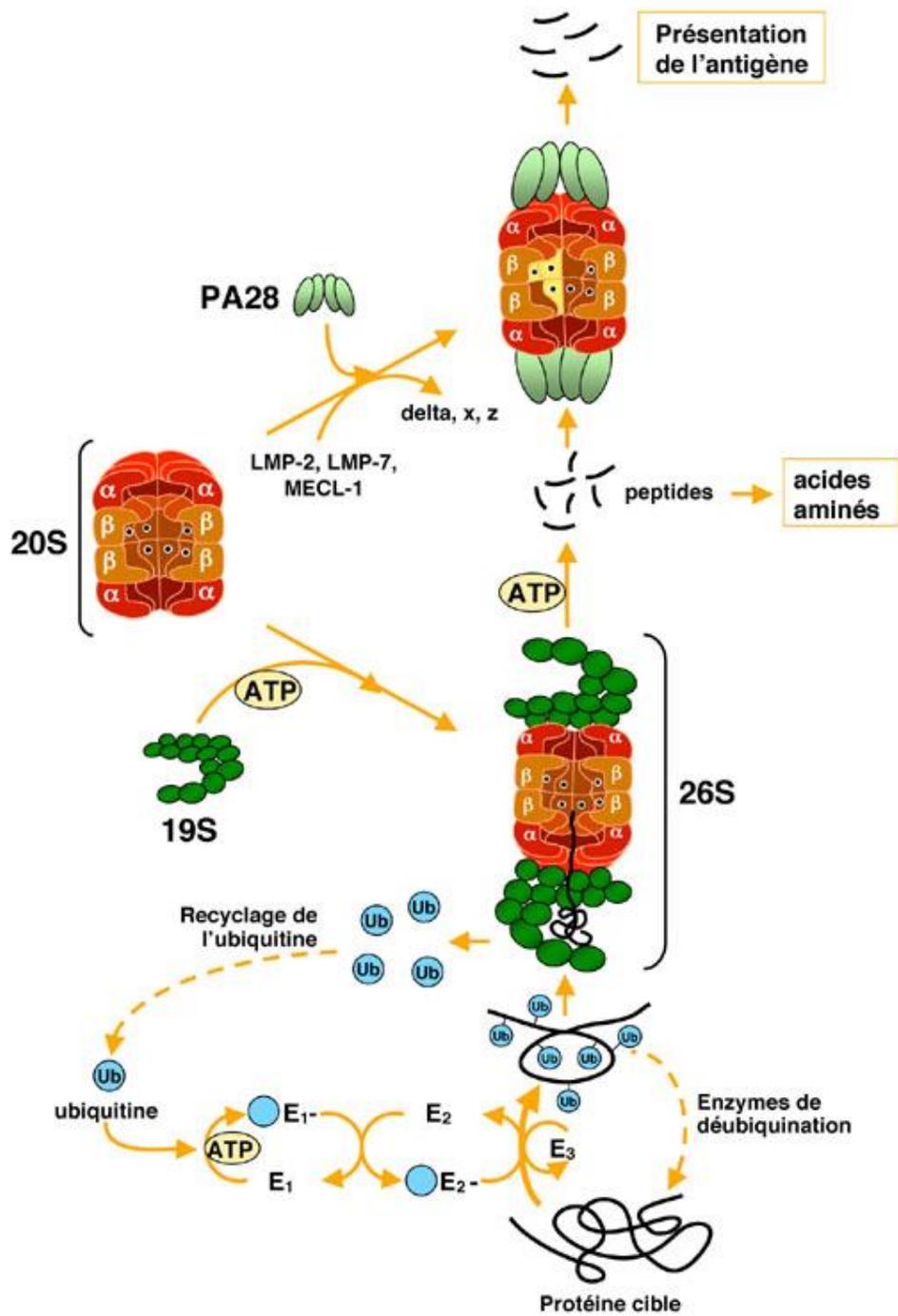
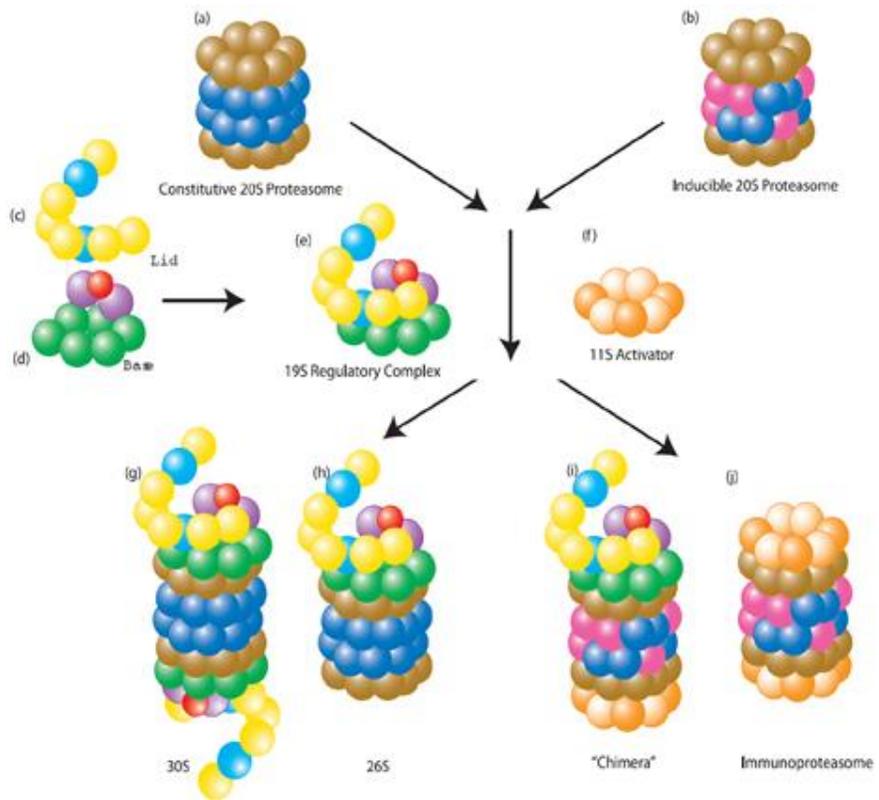
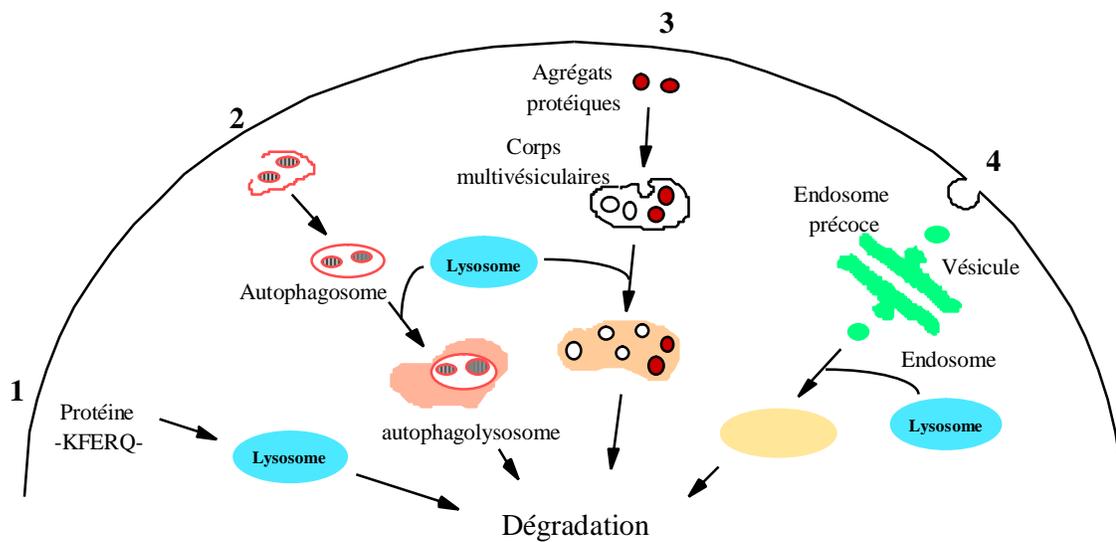


Figure 3





**Figure 3** : Schéma des principales voies de dégradation lysosomales.

**1** : Le ciblage sélectif : certaines protéines ayant une séquence -Lys-Phe-Glu-Arg-Gln- (KFERQ) sont ciblées spécifiquement vers le lysosome.

**2** : La macroautophagie : une portion du cytoplasme est entourée par une double membrane correspondant à une projection du reticulum endoplasmique pour former une vésicule fermée, l'autophagosome, qui fusionne avec le lysosome pour former l'autophagolysosome.

**3** : La microautophagie : des corps multivésiculaires d'origine endosomique s'invaginent pour internaliser des agrégats protéiques puis fusionnent avec les lysosomes.

**4** : L'hétérophagie : des particules extracellulaires sont internalisées dans des vésicules

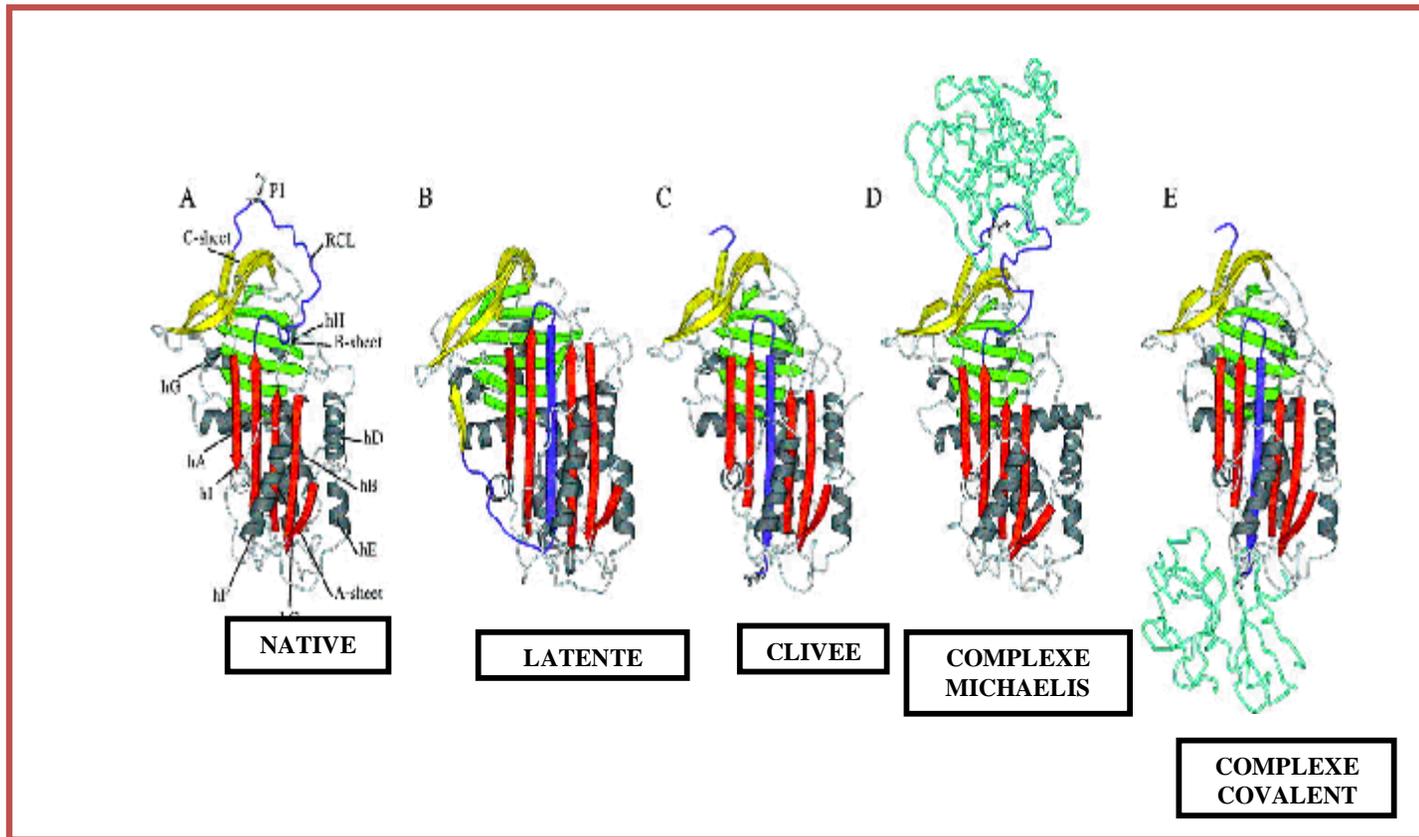


Figure 8. Structures spatiales des différentes conformations des serpinines (d'après Gettins, 2002)

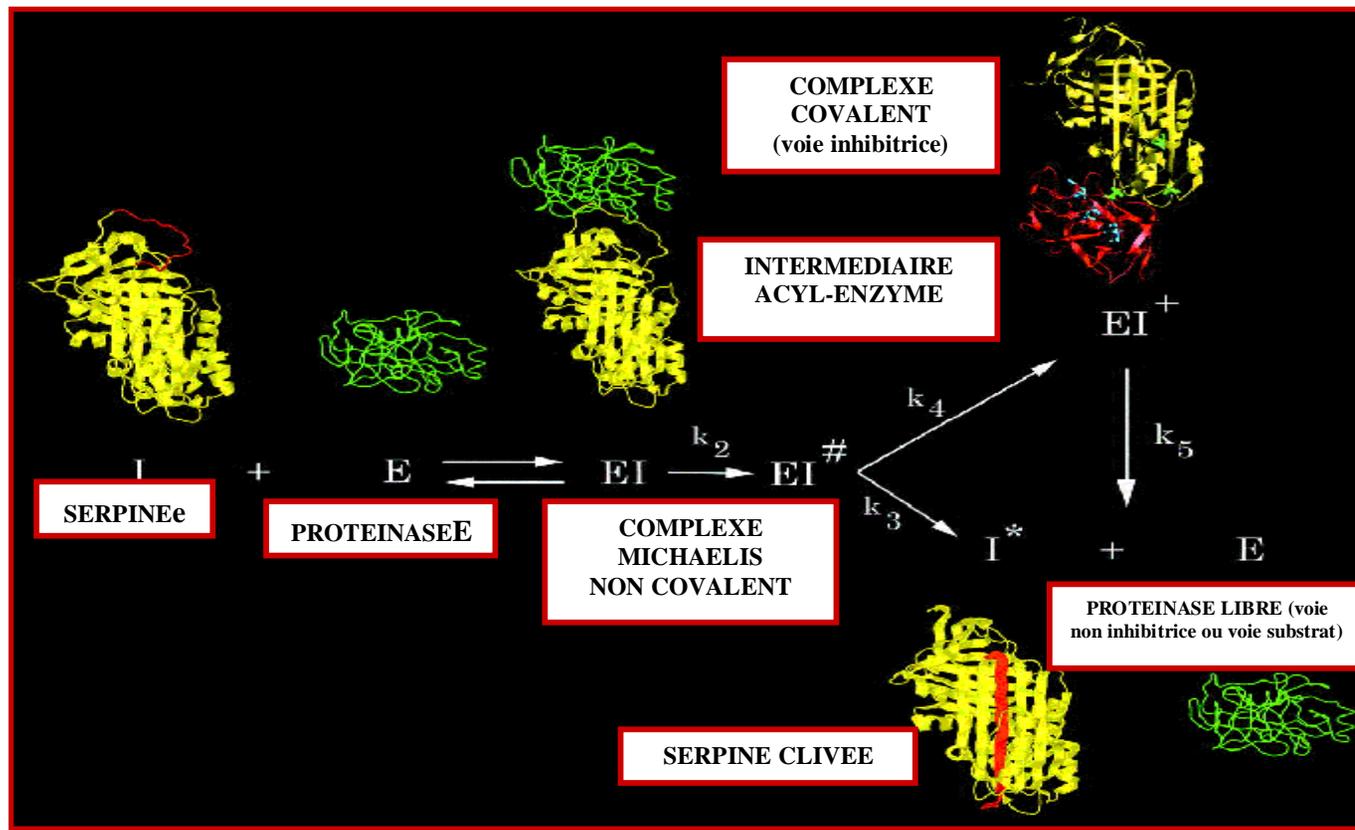


Figure 9. Mécanisme d'inhibition des serpines (d'après Gettins, 2002)

Aussi, l'incubation de myofibrilles bovines avec des protéasomes de 20S montre que les protéines myofibrillaires sont des substrats relativement spécifiques du complexe protéosomique de 20S (Taylor *et al.*, 1995). La myosine, l'actine et la desmine sont dégradées avant que l' $\alpha$ -actinine, la troponine T et la tropomyosine. Ces changements sont différents de ceux rencontrés lors de l'évolution *post mortem* de la viande.

Il a été plus souvent suggéré que le protéasome n'était pas impliqué dans les premiers stades de maturation *post mortem* de la viande ou dans la désorganisation des myofibrilles ; ce rôle est le plus souvent attribué aux calpaïnes (Boehm *et al.*, 1998). Néanmoins, une possible hydrolyse par le protéasome est envisageable, mais, supposerait une action synergique de différentes protéases comme les calpaïnes et le protéasome. (Mykles, 1989).

### ***3.2.3. Inhibiteurs endogènes des protéases et la science de la viande***

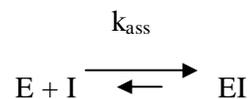
Les substances qui affectent la vitesse de réaction catalysée par l'enzyme et diminuent son efficacité durant la formation ou la rupture du complexe enzyme-substrat en se combinant avec celle-ci sont appelées inhibiteurs. Les inhibiteurs peuvent être divisés en deux groupes d'après le genre d'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur : inhibiteurs non-covalents et les inhibiteurs covalents. Les inhibiteurs non-covalents réagissent de façon réversible avec l'enzyme pour réduire sa vitesse de réaction alors que les inhibiteurs covalents sont souvent référés aux inhibiteurs irréversibles et réagissent de façon covalente avec l'enzyme pour diminuer son efficacité. Les derniers sont souvent dénommés inhibiteurs suicides, puisque ils sont hydrolysés au cours de ce processus et ne pourront donc pas resservir.

Les inhibiteurs synthétiques et les inhibiteurs endogènes ou naturels ont fortement contribué à l'élucidation de la structure tridimensionnelle et de la configuration spatiale des résidus qui constituent le site actif (site de liaison et site catalytique) (Bode *et al.*, 1989 ; Perona *et al.*, 1993 ; Gaboriaud *et al.*, 1996). Ils ont aussi été utilisés pour élucider les voies métaboliques, les mécanismes cinétiques des réactions catalysées par l'enzyme et la nature des intermédiaires formés durant la catalyse. Les inhibiteurs ont été des outils essentiels pour comprendre les phénomènes enzymatiques.

La classification des inhibiteurs dépend de la réversibilité, de la force, et des vitesses de leur interaction avec les enzymes. La distinction entre un comportement réversible et irréversible est difficile.

Il existe trois types principaux d'inhibition réversible : compétitive, incompétitive et mixte. Dans les différents types de mécanisme d'inhibitions réversibles, l'interaction de l'inhibiteur enzymatique et son enzyme cible forme généralement un complexe enzyme-inhibiteur (EI) réversible. Dans l'inhibition compétitive (inhibition spécifique), l'inhibiteur compétitif se lie au site de liaison du substrat en compétition avec le substrat pour le site actif. Dans l'inhibition incompétitive (inhibition catalytique), l'inhibiteur se fixe seulement au complexe enzyme-substrat, pas à l'enzyme libre. Dans l'inhibition mixte, l'inhibiteur se lie à l'enzyme libre aussi bien qu'au complexe enzyme-substrat, en obéissant à un ordre de fixation au hasard. Pour l'ensemble des inhibiteurs réversibles que nous venons de décrire, le taux d'inhibiteurs est toujours significativement plus élevé que le taux d'enzyme cible.

L'inhibition irréversible est définie par une réaction simple dans laquelle la liaison du complexe enzyme-inhibiteur est irréversible ou pseudo-irréversible, elle est caractérisée par une orientation de la réaction vers la formation du complexe ( $k_{\text{ass}} \gg k_{\text{diss}}$ ).



$k_{\text{ass}}$  est la constante de vitesse d'association du complexe. Dans ce type de mécanisme d'inhibition, la constante de vitesse de dissociation du complexe,  $k_{\text{diss}}$ , devient nulle, puisque il n'y a aucun retour dans la direction de la dissociation du complexe EI. D'ailleurs, la vitesse de relâche de l'inhibiteur à partir du complexe enzyme-inhibiteur devient vraiment très lente pour être négligeable, alors l'inhibition est considérée comme irréversible. Un composé qui amène à la formation d'un lien covalent de l'enzyme détruit souvent l'activité enzymatique d'une manière définitive (Silverman, 1995).

Les fonctions des inhibiteurs de protéases sont essentielles pour tout organisme vivant : d'une part, ils préviennent une activité protéolytique incontrôlée. Les protéases font l'objet d'une régulation très étroite, limitant ainsi leur activité catalytique aux seuls processus et compartiments physiologiques où elles sont nécessaires ; d'autre part, ils protègent l'organisme d'une activité protéolytique exogène, qu'elle soit le fait de prédateurs ou d'organismes pathogènes.

La majorité des inhibiteurs de protéases connus et caractérisés jusqu'à ce jour, est constituée d'inhibiteurs de sérine protéases (Bode et Huber, 1992).

Les évolutions *post mortem* des variables biologiques et de la dureté myofibrillaire de la viande, varient énormément en fonction des animaux, bien qu'ils soient zootechniquement

similaires. Une cause possible de cette variabilité peut être la différence dans le contenu d'enzymes et plus probablement dans le rapport enzyme/inhibiteur, un paramètre reflétant l'efficacité des systèmes protéolytiques (Ouali, 1991 ; Valin, 1995 ; Zamora, 1997).

L'intérêt porté aux inhibiteurs est lié au fait que, s'il n'y a pas de relation directe entre le taux d'enzymes musculaires et la vitesse d'attendrissage ou de maturation, par contre, il existe une bonne corrélation entre cette même caractéristique et le rapport enzyme/inhibiteur (Ouali et Talmant, 1990).

### 3.2.3.1. *Inhibiteurs de protéase à sérine (serpines)*

Les protéases à sérine constituent, sans aucun doute, les protéases les plus étudiées et le mieux caractérisées actuellement. Il n'est, donc, pas étonnant que la majorité des inhibiteurs naturels de protéases connus à ce jour, soient des inhibiteurs de protéases à sérine. Une classification de ces inhibiteurs permet de les regrouper en dix familles distinctes basées sur les similarités de séquences, de topologie ainsi que sur les mécanismes de fixation des protéases. Parmi eux, la famille la plus importante est, sans doute, les SERPINES (**SER**ine **P**roteinase **I**nhibitor**S**) proposée par Carrell et Travis, et dont les membres présentent une grande similitude structurale et une importante homologie de séquence (Carrell et Travis, 1985). Chez les mammifères, les serpines régulent un grand nombre de processus biologiques allant de la coagulation à l'inflammation en passant par l'apoptose et certains peuvent jouer un rôle de suppresseur de tumeur. La famille des serpines joue un rôle majeur dans au moins 14 fonctions physiologiques (**Tableau 5**).

Les serpines sont composées de 300 à 400 acides aminés et partagent une structure commune, composée de 3 feuillets  $\beta$  (A, B et C), de 8 à 9 hélices  $\alpha$  (A-I), et d'une boucle appelée RCL (Reactive Center Loop) composée d'environ 17 acides aminés (**Figure 8**) reliée entre le brin 5 du feuillet  $\beta$  A et le brin du feuillet  $\beta$  C (Stein *et al.*, 1990 ; Carrell *et al.*, 1994 ; Wei *et al.*, 1994), près de la région C-terminal, qui agit comme un appât ou un pseudosubstrat pour la protéase cible, et forme un complexe très stable avec celle-ci (**Figure 8**). En outre, le RCL des serpines est flexible et mobile, et a la capacité d'adopter un nombre de conformations différentes. Cette région hypervariable avec les résidus P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub> de la serpine lie le site actif de sa protéase cible et, ainsi, sa séquence détermine la spécificité de l'inhibiteur. Le résidu P<sub>1</sub> s'associe dans la poche de spécificité primaire de la protéase cible, et est un déterminant majeur de la spécificité de la serpène.

Dans la plupart des cas, les enzymes cibles des serpins sont les peptidases à sérine. Cependant, plusieurs exemples ont suggéré que les serpins pourraient avoir une plus large spécificité et que leur fonction n'est pas limitée aux peptidases à sérine.

Les cathepsines K, L et S sont inhibées par la serpine « squamous cell carcinoma antigen 1 » (Schick *et al.*, 1998a ; Schick *et al.*, 1998b) ; les caspases 1, 3 et 8 sont inhibées par la serpine virale CrmA (Zhou *et al.*, 1997) ; les caspases 1, 4 et 8 sont inhibées par la serpine humaine PI9 (Annand *et al.*, 1999). Une autre serpine appelée endopine qui a été isolée dans les cellules de chromaffine de la médulle adrénale est capable d'inhiber la prohormone thiol protéinase (Hwang *et al.*, 1999). D'autre part, les serpins d'utérus des bovins, des moutons et des porcs sont des inhibiteurs de la pepsine, une peptidase à aspartate (Mathialagan et Hansen, 1996).

Les serpins ont été les premiers inhibiteurs qui ont montré une activité inhibitrice croisée. Salvesen (1993) a remarqué que la géométrie de la liaison avec le substrat et non le mécanisme catalytique des peptidases est le responsable de la sélectivité des inhibiteurs.

En conclusion, puisque l'on ne peut toujours pas affirmer que le mécanisme structural d'inhibition des protéinases à cystéine par les serpins est le même que pour les protéinases à sérine, il existe la preuve suffisante montrant que le mécanisme d'inhibition des serpins est capable de réunir toutes les conditions nécessaires pour une inhibition efficace des protéinases à cystéine, y compris la formation et la stabilisation dans le complexe d'un intermédiaire thioacycle (Gettins, 2002).

Contrairement au mécanisme d'inhibition des autres inhibiteurs de protéases à sérine, type Kunitz ou Kazal, qui forment des complexes réversibles avec leur protéase cible via une interaction « clé et serrure », les serpins participent à un complexe covalent. Ce sont des « inhibiteurs suicides » (Patston *et al.*, 1991).

Le mécanisme qui permet aux serpins d'assurer leurs fonctions d'inhibiteurs est assez particulier, puisqu'il implique certaines modifications structurales majeures (Gettins, 2002). L'inhibition des protéases à sérine par les serpins se fait en plusieurs étapes (**Figure 9**). La première étape du processus d'inhibition est l'interaction du RCL avec le site actif de la protéase. La protéase forme un complexe non covalent avec la serpine en interagissant avec les résidus P1 et P'1 de la boucle RCL. Puis, la sérine du site actif de la protéase attaque la liaison peptidique entre P1 et P'1 comme s'il s'agissait d'un substrat. Ceci aboutit à la formation d'une liaison covalente entre cette sérine et le résidu P1 de la serpine, puis à la

coupure de la liaison peptidique entre P1 et P'1 (Wright et Scarsdale, 1995). Cette action déclenche une modification dramatique de la conformation de la serpine : le RCL clivé s'insère rapidement dans la feuillet  $\beta$  A pour y former un brin  $\beta$  additionnel. Une fois la boucle RCL insérée dans le feuillet  $\beta$  A, la protéase, qui reste liée au RCL, est entraînée par ce mouvement d'un pôle de la serpine à l'autre, ce qui correspond à un déplacement relatif d'environ 70 Å (Im *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2000, Silverman *et al.*, 2001). Au cours de ce mouvement, la protéase subit également certaines modifications conformationnelles qui consistent, notamment, en une distorsion de son site actif (Huntington *et al.*, 2000). La protéase est alors inactivée et incapable de se libérer du complexe formé avec la serpine. Elle est également plus sensible à la digestion protéolytique (Silverman *et al.*, 2001 ; Gettins, 2002).

Bien que l'existence de ces inhibiteurs dans le muscle ait été révélée dans les années 1970 (Nogushi et Kandatsu, 1969), peu de travaux ont été réalisés sur le tissu musculaire. Kuehn *et al.* (1984) ont montré l'existence de 4 activités inhibitrices dans la fraction cytosolique du muscle squelettique de rat. 3 de ces activités correspondent à des protéines de 50, 65 et 65 kDa et sont des homologues des inhibiteurs de sérine protéinases de la famille des serpin purifiées à partir du sérum de rat. La quatrième fraction, qui n'a été caractérisée que très partiellement, présente un poids moléculaire voisin de 15 kDa.

Des inhibiteurs des sérine protéinases ont été aussi isolés dans le muscle de plusieurs poissons (Toyohara *et al.*, 1983 ; Hara et Ishihara, 1986). Kim *et al.* (1992) ont isolé un inhibiteur de sérine protéinase de masse moléculaire de l'ordre de 65 kDa à partir de muscle de poulet.

Des investigations visant à identifier des marqueurs biologiques de la tendreté de la viande ont démontré que le taux d'inhibiteurs de sérine protéinases est le paramètre le plus important pour la prédiction de tendreté finale de la viande (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005).

### 3.2.3.2. La Calpastatine

La calpastatine est l'inhibiteur endogène spécifique des calpaïnes. Cette protéine est polymorphe. Son poids moléculaire est compris entre 50 et 120 kDa.

Son rôle est double : elle permet de bloquer le phénomène d'autolyse et aussi empêcher l'activité protéolytique de l'enzyme activée. La calpastatine se comporte comme

inhibiteur réversible des calpaïnes. Elle se lie au domaine IV de la grosse sous-unité et au domaine IV' ou VI de la petite sous-unité. Le calcium a un rôle clef dans le mécanisme d'inhibition de la calpaïne par la calpastatine. Il joue un rôle de liant entre la calpastatine et la calpaïne. Sa fixation se fait entre les domaines IV et VI de la calpaïne et les domaines A, B et C de la calpastatine. De plus, cette interaction devient réversible après la complexation des ions calcium par de l'EDTA (Takano et Maki, 1999).

Concernant le tissu musculaire, les études de localisation en immunohistologie ont montré que les calpaïnes ainsi que leur inhibiteur avaient une localisation exclusivement intracellulaire (Goll *et al.*, 1990 ; Kumamoto *et al.*, 1992). Cependant ces protéines n'apparaissent pas libres dans le cytoplasme, elles seraient liées à des structures myofibrillaires. La localisation de la calpastatine semble être compartimentée près d'invaginations nucléaires (Lane *et al.*, 1992). L'activation des calpaïnes par augmentation de la concentration calcique, amorce la dissolution de ces structures, libérant la calpastatine dans le cytoplasme, laquelle disparaît progressivement suite à sa dégradation (De Tullio *et al.*, 1998).

La présence de deux isoformes de la calpastatine, exprimées principalement dans des muscles à contraction rapide et des muscles à contraction lente, ont été rapportés dans le muscle d'ovin, de bovin et de porc (Ouali et Talmant, 1990). L'isoforme principal de calpastatine dans des muscles à contraction lente pourrait correspondre à la forme phosphorylée de calpastatine. Ce serait la forme mineure dans des muscles à contraction rapide (Doumit *et al.*, 1996). Par ailleurs, il a été montré que l'augmentation de la dureté juste après l'abattage, était corrélée avec une augmentation de la calpastatine (Roncalés *et al.*, 1995).

### ***3.2.3.3. Les inhibiteurs de protéases à cystéine***

Les principaux inhibiteurs endogènes des protéases de la famille de la papaïne sont les cystatines, ainsi nommées pour leur capacité à bloquer l'action des protéases à cystéine. Ces molécules sont des inhibiteurs protéiques à forte affinité et réversibles. La super famille des cystatines est divisée en quatre familles selon le nombre de copies de segment cystatine et la présence de ponts disulfure (Barrett, 1987).

Tous les membres de la famille des cystatines inhibent des peptidases à cystéine telles que la papaïne et les cathepsines B, H et L. Les kininogènes sont capables d'inhiber les calpaïnes ubiquitaires (Ishiguro *et al.*, 1987). Dans le tissu musculaire, plusieurs inhibiteurs

d'activité cystatine ont été décrits (Bige *et al.*, 1985 ; Schwartz et Bird, 1997), mais, aucune séquence n'est disponible, par conséquent il est encore impossible de certifier que ce sont vraiment des membres de la famille des cystatines (Shackelford *et al.*, 1991 ; Barnier, 1995).

#### **3.2.3.4. Les inhibiteurs de métalloprotéases et de protéases acides**

Ces dernières classes d'inhibiteurs ont été mises en évidence dans très peu d'organismes. De manière générale, très peu d'inhibiteurs de métalloprotéases ou de protéases acides sont connus à ce jour.

Chez les vertébrés, les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases sont des molécules d'environ 20 à 30 kDa multifonctionnelles. Ce sont des inhibiteurs à forte affinité qui forment des complexes réversibles et stoechiométriques avec leur enzyme cible, bloquant physiquement l'accès des substrats au site actif. Quatre inhibiteurs des métalloprotéases ont été identifiés en mammifères. Ils ont été appelés TIMP-1, 2, 3 et 4. TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3 sont présents dans les tissus de bovine (Balcerzak *et al.*, 2001).

Les protéases à acide aspartique (pepsine, cathepsine D, renine,...) sont inhibées par la pepstatine A. La structure de la pepstatine a été modifiée pour augmenter la sélectivité par les protéinases à acide aspartique.

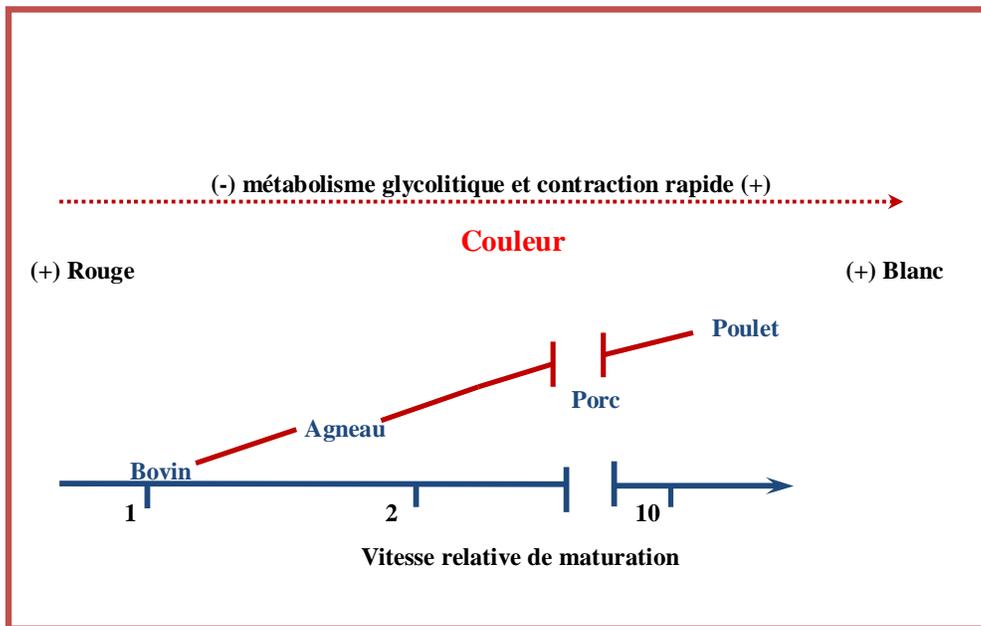
### **3.3. Les facteurs de variation de la tendreté de la viande**

La tendreté de la viande dépend de nombreux facteurs tels que les facteurs biologiques liés à l'animal (l'espèce, la race, l'âge, le sexe, et le type de muscle) et les facteurs technologiques (conditions d'abattage, temps de maturation, transformation et cuisson) responsable d'une grande variabilité qu'il convient de maîtriser au maximum.

#### **3.3.1. Les facteurs liés à l'animal**

- **L'espèce** : la vitesse d'attendrissage des viandes est très différente en fonction de l'espèce animale (**Figure 10**). Ainsi, l'attendrissage à 4°C, est complet en deux jours pour le poulet, 5 jours pour le porc, 7 jours pour le mouton et 10 jours pour le lapin et le bœuf (Blanchard et Mantle 1996).

Les raisons de ces différentes vitesses de maturation ne sont pas encore bien comprises. Le potentiel enzymatique, qui se traduit par une dégradation plus ou moins rapide des protéines musculaires, serait responsable de cette variation (Ouali et Talmant, 1990). Cependant, bien que le poulet soit l'espèce qui contient la plus grande activité protéolytique,



**Figure 10.** Vitesse relative de maturation de différentes espèces, en relation avec la couleur et le typage contractile et métabolique des muscles (OUALI 1990a)

il n'y aurait pas de corrélation entre la capacité d'activité protéolytique et la vitesse d'attendrissement de la viande (Blanchard et Mantle, 1996).

- **La race** : l'effet de la race sur la tendreté a été particulièrement étudié chez les bovins. Les animaux issus de races laitières, mixte ou races à viande présentent essentiellement des caractéristiques musculaires variées en raison de différences marquées dans leur physiologie. Ainsi, les qualités sensorielles des viandes sont importantes au sein de chaque race (Dransfield et al., 2003)

Monsòn et al. (2005) ont montré des différences significatives de la tendreté de la viande maturée entre 1 et 7 jours provenant de 4 races : une race laitière (Holstein), une race mixte (Brown Swiss) et deux races à viande (Limousine, blond d'aquitaine). Au début de maturation, les viandes issues des races allaitantes sont en effet plus tendres que les autres viandes. Toutefois, ces différences s'estompent au cours de la maturation. De même, Sinclair et al., (2001) ont montré que les viandes de bœufs Holstein étaient moins tendres que les viandes de bœufs Charolais ou Angus. Les caractéristiques musculaires propres à chaque race et en particulier la quantité, la solubilité et l'organisation spatiale du collagène, la quantité de gras intramusculaire, mais, également les activités des enzymes protéolytiques et notamment du système calpaïne/calpastatine, peuvent expliquer les différences de tendreté observées entre les races.

- **Le sexe** : la variabilité de la tendreté liée au sexe est indéniable pour toutes les espèces : les femelles produisent de la viande plus tendre que les mâles castrés, eux même produisant de la viande plus tendre que les mâles entiers. A l'intérieur d'une même espèce, la variabilité de la tendreté liée au sexe est même supérieure à celle liée à la race (Nicastro et Maiorano, 1994).

Huff Lonergan et al. (1995) ont rapporté que l'intensité de la protéolyse serait responsable de la variabilité liée au sexe. En effet, la conversion de la titine 1 en titine 2 et la dégradation de la nébuline sont plus rapides chez les animaux castrés que chez les animaux non castrés.

- **L'âge** : la qualité de la viande change considérablement avec l'âge des animaux. En effet, au cours de la croissance et du vieillissement, la structure et la composition des muscles évoluent, entraînant des modifications de la tendreté de la viande. Il a notamment, été observé une augmentation de la dureté des viandes principalement en raison d'une diminution de la solubilité du collagène chez les animaux âgés (Gerrard et al., 1987).

Mais, en plus du collagène d'autres paramètres biologiques joueraient un rôle dans la variabilité de la tendreté liée à l'âge. En effet, avec l'âge, la structure contractile devient moins sensible à l'action des protéases endogènes et des sels (Ouali 1990b). Cependant, Whipple et Koohmarie (1992), signalant que les muscles provenant de moutons âgés de 8 semaines sont plus durs et ont une activité calpastatine à 24 h *post mortem* plus élevée que les muscles provenant de mouton âgés de 26 semaines.

Ces différents facteurs liés à l'animal lui-même, semblent concorder avec les variations métaboliques et contractiles des muscles (Wulf et *al.*, 1995).

- **Le type de muscle** a une influence importante au cours de la maturation de la viande (Dransfield et *al.*, 1980-81). Essen-Gustavsson et Fjelkner-Mudig (1985) rapportent que l'attendrissage est lié au profil métabolique du muscle. Les muscles riches en fibres de type IIB mûrent plus vite que les muscles riches en fibres de type I (Valin, 1988). De même Ouali (1990a) a montré que la vitesse de l'attendrissage de la viande est plus rapide dans les muscles blancs de contraction rapide que dans les muscles rouges de contraction lente. Monin et Ouali (1992) ont proposé trois mécanismes pour expliquer les différences sur la vitesse de l'attendrissage des types de muscles : (1) la quantité de protéases et d'inhibiteurs, (2) la sensibilité du muscle à la protéolyse et (3) la pression osmotique. Les muscles rouges de contraction lente ont la vitesse d'attendrissage la plus lente et ont la quantité de teneur en calpaïnes la plus grande, c'est-à-dire que l'expression de ces protéases est dépendante du type de muscle (Ouali, 1990b).

La composition du type de fibre musculaire est très variable et peut être influencée par beaucoup de facteurs intrinsèques et extrinsèques. La difficulté d'avoir le contrôle sur tous ces facteurs dans une expérience complique la mise en évidence d'une relation forte entre le type de fibre et la qualité de la viande (Lefaucheur et Gerard, 2000).

### ***3.3.2. Les facteurs d'origine technologique***

***Les conditions de transport*** des animaux à l'abattoir et les méthodes d'abattage des animaux sont associées à une multitude de facteurs pouvant induire un stress important chez les animaux (Culioli, 1999 ; Terlouw, 2002). Ces réactions de stress entraînent des modifications du métabolisme musculaire avant et après la mort de l'animal, et par ce biais, ont une influence sur les qualités sensorielles des viandes.

**La conservation** des viandes est, également, un élément important pouvant influencer leurs qualités sensorielles (Ouali, 1991 ; Culioli, 1999). Les conditions de réfrigération jouent un rôle important à la fois sur la vitesse et l'intensité de la maturation. En effet, une réfrigération trop rapide ou trop lente entraîne une diminution de la capacité de maturation du muscle (Daudin, 1988 ; Hertzman, 1993). Le maintien du muscle à 12 et 15°C pendant 10 à 15 heures post mortem, puis à 2 et 4°C au delà, semble le meilleur profil de température à suivre pour optimiser la maturation (Ouali 1990a). La congélation semble avoir un rôle bénéfique sur ce processus, si elle a lieu *post rigor*. Cet effet bénéfique de la congélation est probablement lié aux altérations de la structure musculaire induites lors de la formation des cristaux de glace dans le muscle. Ces altérations amplifient le processus de fragilisation de la structure contractile due à la maturation elle-même (Daudin, 1988).

L'utilisation de **la stimulation électrique** afin d'éviter le phénomène de « cold shortening » ne semble pas améliorer la tendreté finale de la viande. Par contre, son association à une réfrigération rapide permet de prévenir toute contraction au froid et donc de préserver la tendreté. Associée à une réfrigération lente (cas des muscles insérés profondément dans la carcasse) la stimulation électrique conduit souvent à l'obtention de viandes exsudatives connues pour mal maturer (Ouali 1990a ; Geesink et al., 1995).

Enfin, **l'utilisation de promoteurs** de croissance (anabolisant, beta-agoniste, hormone de croissance) conduit à une viande plus dure dans la plupart des cas. Ce résultat étant très dépendant du type de muscle étudié (Ouali 1990a).

**La cuisson** est également importante pour la tendreté de la viande. Selon la teneur en collagène des muscles, leur mode de cuisson doit varier. Les muscles pauvres en collagène nécessitent, généralement, une cuisson modéré et rapide, en milieu sec afin de préserver la tendreté. Par contre, pour des teneurs élevées en collagène, la cuisson est préférentiellement en atmosphère humide et de longue durée afin de permettre au collagène de se gélifier et donc de s'attendrir (Moevi, 2003).

## **4 LES MORTS CELLULAIRES**

Nos cellules et nos tissus sont continuellement soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatismes, irradiations, hyper- ou hypothermie ...), infectieuses, chimiques, métaboliques (privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). Ces agressions multiples peuvent conduire à l'activation de mécanismes de mort cellulaire, soit par nécrose soit par apoptose (Buja et *al*, 1993).

La mort cellulaire joue un rôle fondamental dans de nombreux processus tels que le développement, la formation du système nerveux et immunitaire, les infections et aussi l'homéostasie cellulaire (Elle est donc finement régulée par des mécanismes programmés). Cependant, la mort peut être provoquée par des causes extérieures, elle est alors qualifiée de mort accidentelle, car non désirée par l'organisme.

### ***4.1. Les morts accidentelles***

Elles sont caractérisées par la rapidité du processus, l'absence de régulation et de besoins énergétiques.

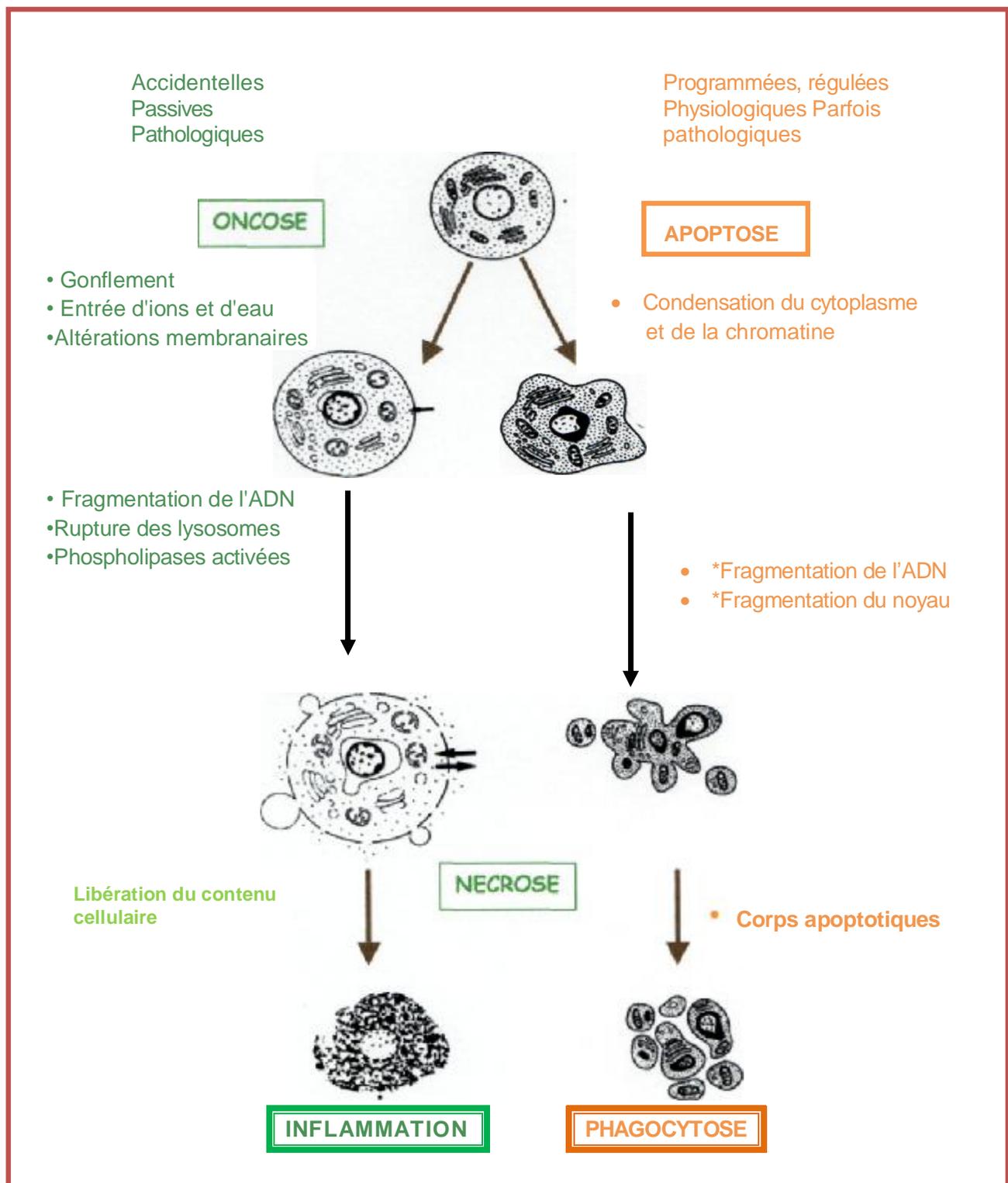
#### ***4.1.1. L'oncose***

Le terme « oncose » est méconnu. Pourtant, il a été utilisé dès 1910 par le médecin Von Reckling-Hausen pour décrire une cellule suffocante. Lorsque la cellule, par manque d'énergie (privation d'oxygène) ne peut plus activer les pompes qui rejettent l'excès d'eau et d'ions calcium rentrant continuellement par diffusion passive, elle gonfle, la concentration en calcium augmente. Rapidement les protéines se dénaturent et la mort s'en suit (**Figure 11**).

Ainsi, l'oncose est un terme spécifique à l'état d'une cellule ischémique. Cependant, les biologistes emploient, généralement, le mot nécrose pour décrire l'oncose, car ces deux types de morts accidentelles sont morphologiquement très proches et touchent principalement des groupes de cellules plutôt que des cellules isolées.

#### ***4.1.2. La nécrose***

La nécrose est un terme issu du grec nekros et qui signifie mort. La nécrose a été la première forme de mort cellulaire mise en évidence qui est considérée comme une mort cellulaire « désordonnée » par opposition à l'apoptose qui, elle, possède différentes phases



**Figure 11. Aspects morphologiques de la mort cellulaire** (d'après Majno et Joris 1995)

L'oncose est caractérisée par une condensation de la chromatine. Une augmentation du volume mitochondrial et un début de rupture de la membrane. La nécrose correspond à un état plus avancé du processus de mort : les membranes des organites sont rompues et la totalité du contenu cellulaire est libéré dans le milieu extracellulaire ce qui peut provoquer un début d'inflammation. La mort par **apoptose** est caractérisée par la condensation de la chromatine qui se regroupe à la périphérie interne de la membrane nucléaire suivi de la fragmentation du noyau et du cytoplasme en corps apoptotiques. Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés dans le milieu extracellulaire sans induire de processus inflammatoire.

(Fidzianska et al., 1991). Elle intervient dans des conditions catastrophiques pour la cellule, après une agression sévère. Elle n'est pas déterminée par des facteurs intrinsèques, mais uniquement par des perturbations de l'environnement. Elle est l'aboutissement de conditions non physiologiques extrêmes et n'est pas déclenchée de façon « volontaire » par l'organisme lui-même. Elle peut survenir à la suite d'une attaque du complément, d'une hypoxie sévère, d'une hyperthermie, d'infections virales lytiques, d'exposition à des toxines et des poisons respiratoires. C'est un mécanisme passif, rapide, non spécifique, qui concerne en général un groupe de cellules (Majino et Jons, 1995).

Mécaniquement, il y a une perte précoce de flux ioniques au niveau membranaire, entraînant la pénétration massive et excessive de l'eau (**Figure 11**). Ce gonflement de la cellule aboutit, alors, à son éclatement. Les organelles ont elles, aussi, tendance à se gorger d'eau. Les lysosomes se rompent en libérant dans le cytoplasme des enzymes hydrolytiques qui contribuent à la destruction de la cellule. De plus, s'ajoutant à la perte d'osmolarité cellulaire, la lyse de la membrane plasmique permet la fuite de constituants intracellulaires vitaux, par diffusion passive vers le milieu extérieur. Cette sortie du contenu intracellulaire se caractérise, *in vivo* par une inflammation, due à la présence de ces débris, phagocytés par les cellules voisines du système immunitaire (Trump et al., 2001). Au cours de la nécrose, l'ADN nucléaire va être dégradé, mais de manière aléatoire par des endonucléases activées, notamment par des sérines protéases (Wyllie, 1980).

Ce processus s'achève généralement par l'apparition d'une cicatrice fibreuse au niveau tissulaire. La nécrose n'induit pas de fragmentation génomique régulière, ni de condensation de la chromatine, ni la formation de corps apoptotiques (Wyllie, 1980 ; Buja et al., 1993 ; Hirsch et al., 1997 ; Trump et al., 2001).

Lorsque l'on constate une mort cellulaire sans pouvoir mettre en évidence des facteurs apoptotiques, on parlera de nécrose. La nécrose se définit néanmoins plus facilement par comparaison avec l'apoptose (Fidzianska et al., 1991).

#### ***4.2. L'apoptose (Mort Cellulaire Programmée « MCP »)***

Une définition simplifiée de la mort cellulaire programmée serait un processus actif utilisant des protéines dont le rôle principal ou unique est de participer au mécanisme engendrant la mort. Ces protéines peuvent être présentes sous forme inactive, séquestrées dans des compartiments cellulaires ou encore néosynthétisées suite à l'induction de la mort.

Le premier rapport publié sur MCP a été par Carl Vogt en 1842 (cité par Clarke et Clarke, 1995).

La MCP fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. On la définit sous le terme d'APOPTOSE en référence à la chute des feuilles à l'automne ; apo- pour l'éloignement et -ptose pour la chute. Ce terme imagé a été introduit dans le vocabulaire biologique et médical par Kerr et *al.* En 1972 pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique.

L'apoptose (Figure 11) est une réponse hautement conservée des organismes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Ce mécanisme de suicide est d'ailleurs fondamental pour le développement des organismes (Williams et Smith, 1993). En 1980, Wyllie et *al.* L'impliquèrent dans la disparition totale des branchies et de la queue de têtard chez la grenouille adulte. Des exemples classiques sont également observés dans le développement embryonnaire et fœtal, dans l'élaboration du système immunitaire, et notamment la sélection thymique, dans la métamorphose larvaire et le renouvellement cellulaire de tissus adultes normaux, qui font massivement appel à cette mort cellulaire programmée (MCP). Le but principal de l'existence de ce phénomène est de permettre l'élimination contrôlée des cellules indésirables pour l'organisme, soit parce qu'elles sont en excès, inutiles ou dysfonctionnelles (Kerr et *al.*, 1972 ; Fidzianska et *al.*, 1991 ; Meier et *al.*, 2000 ; Dirks et Leeuwenburgh, 2005).

Etant donné l'importance biologique de l'apoptose, on comprendra aisément que des dérèglements de ce processus ou de son contrôle, aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, sont à l'origine d'anomalies du développement et de certaines pathologies (Hengartner, 2000).

Ainsi, un excès d'apoptose dans le système nerveux central peut induire des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique ou la maladie de Parkinson. De même, le virus de l'immunodéficience humaine active l'apoptose des cellules T-auxiliaires (TH) nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la défense contre les virus. Un déficit de l'apoptose peut, aussi, causer diverses affections telles que les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) qui se traduisent par une apoptose insuffisante de cellules auto-immunes réactives. Une absence d'apoptose peut, également favoriser la survie et la croissance de cellules anormales, normalement destinées à mourir, et ainsi induire des processus de cancérogenèse (Kerr et *al.*,

1972 ; Kerr et *al.*, 1994 ; Majino et Jons, 1995 ; Gura, 1997 ; Sandri et Carraro, 1999 ; Nicholson, 2000 ; Shi, 2002 ; Tews, 2005).

L'apoptose est considérée comme une mort cellulaire « ordonnée », procédant par différentes étapes clés (Wyllie, 1980 ; Gavrieli et *al.*, 1992 ; Buja et *al.*, 1993 ; Majino et Jons, 1995 ; Martin et *al.*, 1995 ; Bratton et *al.*, 1997 ; Matura et *al.*, 2005 ; Youle et Karbowski, 2005) et ce, quelquesoit la voie d'induction (radiation, présence de molécules chimiques ou hormonales, mitose incomplète, ...). La séquence des événements, alors mis en jeu, semble converger vers une succession d'étapes standardisées et similaires pour toute mort par apoptose.

Le stimulus déclenchant le processus d'apoptose peut provenir de l'extérieur (voie extrinsèque) par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs de mort ou de l'intérieur (voie intrinsèque) en réponse à des conditions très défavorables à la survie de la cellule.

#### ***4.2.1. Caractéristiques morphologiques***

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques. Ces changements morphologiques sont spécifiques à l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire. Alors que la nécrose donne l'image d'un phénomène d'explosion, l'apoptose ressemble à un phénomène d'implosion.

Un des premiers changements constatés, est la réduction du volume cellulaire : la cellule se déshydrate et la perte de l'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme qui résulte en une modification de la forme et de la taille cellulaire. Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec ses voisines. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose. Le noyau présente lui aussi des modifications : une condensation de la chromatine à la périphérie de la membrane nucléaire, une désintégration des nucléoles, une diminution de la taille du noyau, et une augmentation de la densité cellulaire. Le réticulum endoplasmique se dilate et fusionne avec la membrane cellulaire, formant une surface bulleuse. Les invaginations marquées de la membrane nucléaire conduisent à la fragmentation du noyau ainsi qu'à la compartimentation cytoplasmique. De petites sphères rondes et lisses, encore entourées d'une membrane et chargées du contenu intracellulaire, se forment alors : Ce sont les corps apoptotiques. Afin de faciliter la

reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement (Kerr *et al.*, 1994 ; Trump *et al.*, 2001).

#### **4.2.2. Caractéristiques moléculaires et biochimiques**

Deux critères moléculaires principaux servent à identifier une cellule apoptotique d'une cellule nécrotique ou normale.

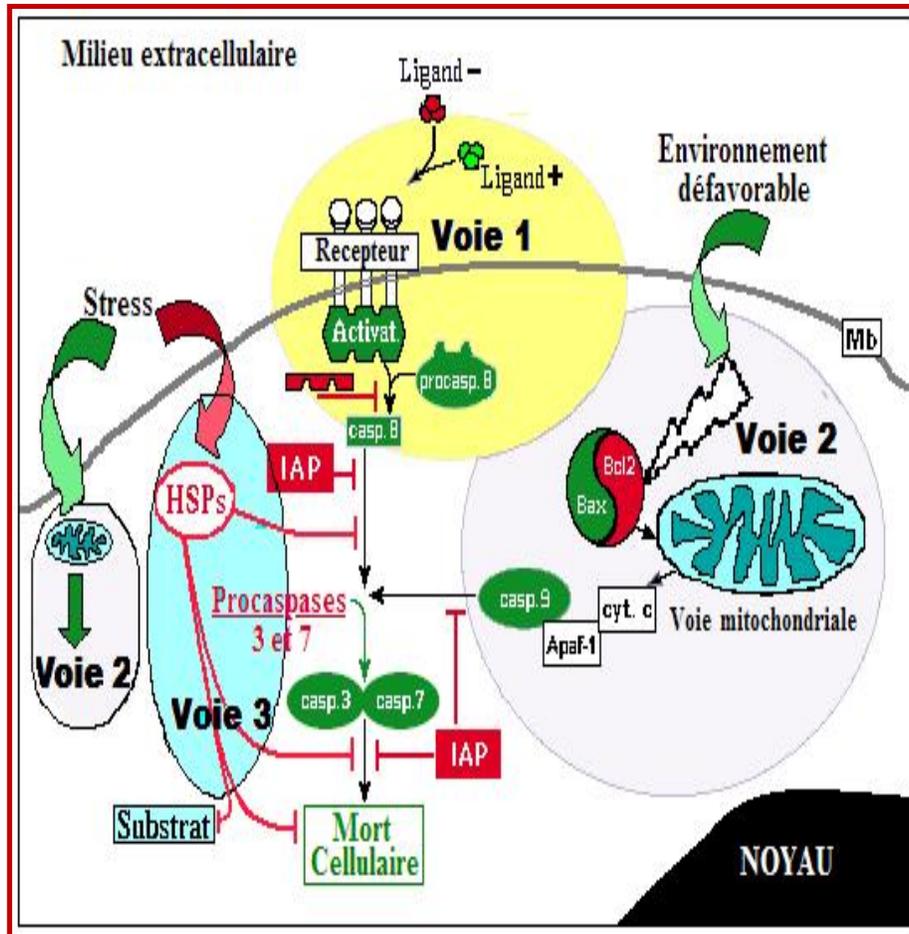
- Le premier critère concerne la membrane cellulaire. En effet, au cours de l'apoptose il y a une altération de la perméabilité membranaire : on observe une asymétrie de la bicouche phospholipidique provoquée par la translocation de la phosphatidylsérine, de la membrane interne vers l'extérieur de la cellule. Les phosphatidylsérines, phospholipides anioniques présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane des cellules normales, vont se déplacer dans le feuillet externe et être externalisés à la surface des cellules. Ceci permet aux cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Martin *et al.*, 1995 ; Bratton *et al.*, 1997 ; Matura *et al.*, 2005).

- Le deuxième critère est la fragmentation de l'ADN en séquences multiples de 150 à 200 paires de bases. Ces 200 paires de bases correspondent à la longueur de l'ADN enroulé autour des octamères d'histones dans un nucléosome (Wyllie, 1980 ; Gavrieli *et al.*, 1992 ; Wyllie *et al.*, 1998). Plusieurs DNase I et II ont été impliquées dans cette étape de fragmentation. Il a été montré qu'une protéine, la DFF45 (DNA fragmentation factor) (Sakahira *et al.*, 1998) serait clivée par la caspase 3 et activerait une desoxyribonucléase soit en pénétrant dans le noyau pour effectuer une interaction directe, soit en liant une protéine au niveau de la surface externe de l'enveloppe nucléaire qui assurerait la transduction du signal vers une nucléase spécialisée dans la dégradation et la fragmentation de l'ADN (Gavrieli *et al.*, 1992 ; Rami *et al.*, 2000).

De plus, lors de l'apoptose, certaines protéines cellulaires sont dégradées. C'est le cas des lamines A, B, etc., formant la membrane nucléaire ou de certaines protéines comme la fodrine et la gelsoline dont le clivage conduit à une altération du cytosquelette. Cette perte du cytosquelette induit la vésiculation membranaire.

#### **4.2.3. Régulation du processus apoptotique**

Les modes de régulation de l'apoptose vont dépendre de la nature du stimulus initial. Sur cette base, on peut distinguer 3 grandes voies de développement du processus de MCP (**Figure 12**).



**Figure 12. Régulation du processus apoptotique (d'après Herrera-Mendez *et al.*, 2006)**

**Voie extrinsèque** : après activation du récepteur de mort par son effecteur proapoptotique, il y a activation du complexe membranaire intracellulaire associé au récepteur qui va fixer diverses protéines pour former un complexe capable d'activer la procaspase 8 par des interactions spécifiques. Cette voie est régulée par des inhibiteurs porteurs des mêmes motifs de liaison de la caspase 8 que ceux qui sont présents sur les complexes activateurs. Ces inhibiteurs vont venir en compétition avec les activateurs pour fixer les procaspases 8 et 10. Si les caspases initiateuses parviennent à être activées, la cellule possède des inhibiteurs d'apoptose (IAP) capables de ralentir voire stopper le processus en inactivant la caspase 8. Ces IAP seraient aussi capables d'inactiver les caspases effectrices (caspases 3 et 7). **Voie intrinsèque** : Sous l'impulsion de Bax (partie en vert), une protéine proapoptotique, il y a formation d'un complexe qui va se fixer sur la membrane externe de la mitochondrie et altérer cette dernière avec une accumulation concomitante de calcium dans la mitochondrie. Cette altération va conduire à la libération de cytochrome c qui va contribuer à la formation, avec d'autres protéines, d'un complexe responsable de l'activation de la procaspase 9. Cette action de Bax peut être contrecarrée par Bcl-2, protéine à activité antiapoptotique. Si le complexe parvient à se former, le processus peut encore être bloqué par les inhibiteurs d'apoptose (IAP) qui vont s'associer à la procaspase 9 et empêcher son activation.

Abréviations : Apaf-1, Appoptose Activating Factor-1 ; IAP, Inhibitor of Appoptose ; Bax et Bcl2: deux protéines de la même famille avec effets opposés ; Activat. : Complexe d'activation des caspases initiateuses ; Cyt c : cytochrome c ; HSP : heat shock proteins ou protéines du stress.

a) **Voie 1 (extrinsèque)** : La plupart de nos cellules expriment au niveau des membranes plasmiques des récepteurs, dont la stimulation par leurs ligands respectifs active les caspases et provoque la mort de la cellule par apoptose. Ces récepteurs sont nommés récepteurs de mort et leurs ligands, ligands de mort.

Cette voie correspond à un stimulus impliquant les récepteurs de mort cellulaire qui sont capables de fixer des protéines inductrices (ligand +) ou inhibitrices (ligand -) du processus apoptotique. Dans le cas d'une protéine inductrice d'apoptose (Inducing Apoptosis Protein), sa fixation au récepteur active un complexe intracellulaire qui peut lier les peptidases initiatrices que sont les caspases 8 et 10, par l'intermédiaire des domaines DED ou CARD. Cette étape est régulée par des protéines inhibant cette interaction et porteuses du même type de domaines. Un excès de ces protéines détourne les caspases de leur complexe activateur cible. La caspase initiatrice active (caspase-8 et 10) peut, à ce stade, être rendue inactive par fixation, au voisinage de leur site actif, des protéines inhibitrices d'apoptose ou IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Salvesen et Duckett, 2002). Dans le cas contraire, ces caspases vont être en mesure d'activer, à leur tour, les caspases exécutrices (caspases 3 et 7) responsables de la destruction de la cellule.

b) **Voie 2 (intrinsèque)** : Elle correspond à des situations particulières où la cellule n'a pas d'autres solutions que le suicide. C'est donc elle-même qui déclenche l'apoptose. Ce processus implique une détérioration des mitochondries par des protéines proapoptotiques de type BAX (Petit et *al.*, 1997 ; Kroemer et *al.*, 1998 ; Mishra et Kumar, 2005 ; Mohamad et *al.*, 2005). Les mitochondries subissent une perte du potentiel membranaire et une perméabilisation de la membrane externe conduisant à la libération du cytochrome c (facteur proapoptotique) dans le cytosol (Waterhouse et *al.*, 2002 ; Ly et *al.*, 2003).

Il existe actuellement au moins deux mécanismes pouvant expliquer la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME), phénomène modulé par les membres de la famille de Bcl-2. Le premier, observé lors de l'apoptose comme de la nécrose, implique un phénomène appelé transition de perméabilité (TP) et s'accompagne d'anomalies fonctionnelles mitochondriales telles qu'une réduction du potentiel de membrane mitochondrial, un découplage de la chaîne respiratoire et la production d'anions superoxydes. Il s'agit de l'ouverture d'un mégacanal mitochondrial ou pore de TP situé aux points de contacts entre les mitochondriales externes et internes (Green et Kroemer, 2004). L'ouverture du pore de TP est régulée par la famille de Bcl-2. Ainsi, la protéine proapoptotique Bax est capable de favoriser la TP (Brenner et Kroemer, 2000) tandis que Bcl-2 prévient l'ouverture

du pore. Ce modèle de perméabilisation de la membrane externe est particulièrement pertinent dans l'apoptose induite par ischémie-reperfusion ou en réponse à un stress cellulaire inducteur de seconds messagers comme le calcium, la production d'espèces réactives de l'oxygène, de céramides ou du monoxyde d'azote capables d'ouvrir le pore de TP.

La perméabilisation de la MME peut s'expliquer par un second mécanisme qui implique directement les membres de la famille de Bcl-2. Lors d'un stimulus apoptotique, les protéines proapoptotiques telles que Bax et/ou Bak sont relocalisées au niveau de la MME pour former un canal capable de libérer le cytochrome c. Ce processus est régulé par les autres membres de la famille Bcl-2. D'autre part, la séquestration des protéines proapoptotiques par les protéines antiapoptotiques empêche celles-ci de perméabiliser la mitochondrie (Cheng et al., 2001). En conséquence, le ratio entre les protéines anti- et proapoptotiques de la famille de Bcl-2 a été décrit comme le rhéostat de la vie et de la mort cellulaire qui définira la vitesse avec laquelle le cytochrome c sera libéré dans le cytosol.

Le cytochrome c libre forme alors, un complexe appelé apoptosome (Adams et Cory, 2002). Le cœur de la structure de l'apoptosome est une protéine cytoplasmique, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), qui change de conformation après interaction avec le cytochrome c. Ce changement conformationnel permet aux oligomères d'Apaf-1 de recruter et d'autoactiver la procaspase-9. L'apoptosome constitue le site d'activation de la caspase-9. Une fois activée, la caspase-9 pourra, à son tour, activer les caspases effectrices (caspase-3 et 7). Cette action peut être bloquée par des inhibiteurs de la famille des IAP (Inhibitors of Apoptosis).

*c) Voie 3 (cas particulier du stress) :* quelque soit sa nature, le stress conduit la cellule à synthétiser des protéines protectrices (protéines de stress) capables de préserver l'ensemble des protéines cellulaires contre tout risque de dénaturation et perte éventuelle de leur fonction. Les protéines de stress ou Heat Shock Proteins (HSP) sont très nombreuses et classées en sous-familles sur la base de leur taille : Hsp 90, Hsp 70, Hsp 40, Hsp 27, etc. Dans la cellule, ces protéines apparaissent dès que celle-ci se trouve en danger. Elles ont un rôle essentiel puisqu'elles contribuent à la bonne conformation spatiale des protéines, conformation indispensable pour que ces dernières puissent assurer convenablement leur rôle. Il faut donc, s'attendre à ce que ces protéines aient, lors d'une mort cellulaire programmée, une fonction antiapoptotique (Arrigo et al., 2002 ; Arrigo, 2005 ; Beere, 2005 ; Flower et al., 2005).

Dans le phénomène d'apoptose, ces HSPs sont capables d'intervenir à différents niveaux :

- Formation d'un complexe avec les caspases actives (initiatrices ou effectrices) les empêchant ainsi d'assurer leur fonction.

- Protection des protéines cibles (substrats) des caspases effectrices empêchant ou retardant ainsi leur dégradation par ces enzymes.

- Réparation ou tentative de réparation des protéines ayant subi des dommages structurels suite au stress lui-même ou à l'initiation du processus apoptotique ou encore, à cause de l'action du stimulus qui est à l'origine de l'entrée en apoptose.

Le stress aura donc, au travers des HSPs, un ensemble d'actions, toutes de nature antiapoptotique. Il pourra en outre, dans le cas de stress intense, induire une mort cellulaire par la voie impliquant les mitochondries (voie 2).

#### **4.2.4. Protéases à cystéine de l'apoptose (les caspases)**

Les caspases constituent une nouvelle famille des peptidases à cystéine. Leur fonction primaire est leur contribution à la mort programmée de cellules ou apoptose. L'apoptose (Mort cellulaire Programmée) est un mécanisme essentiel au cours du développement des espèces, des plus simples aux plus complexes. Ce caractère remarquablement conservé au cours de l'évolution, a permis, en particulier par l'étude du développement d'un petit nématode, *Caenorhabditis elegans*, d'identifier une famille de gènes codant pour des protéases à cystéine. Désormais, regroupées sous le terme générique de caspases, elles représentent les effecteurs de la mort cellulaire apoptotique (Labouesse, 1994 ; Horvitz, 1999).

Au cours du développement de *C. elegans*, 131 cellules disparaissent par un processus ayant toutes les caractéristiques de l'apoptose (Labouesse, 1994). L'analyse des facteurs intervenant dans cette mort naturelle a ainsi permis d'individualiser toute une série de gènes contrôlant l'ensemble des étapes de l'apoptose. Parmi ceux-ci, les gènes EGL-1, CED-3 et CED-4 dont l'expression favorise le programme de la mort cellulaire, alors que CED-9 l'inhibe. Le clonage de CED-9 a révélé une homologie de séquences de son produit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell-lymphoma). Connue chez l'homme depuis 1985 pour sa surexpression dans les lymphomes folliculaires de type B avec translocation t(14, 18), elle a été identifiée depuis comme le membre fondateur d'une grande famille de protéines aux propriétés anti- et pro-apoptotiques (Reed, 1994 ; Cory et Adams, 2002). C'est en fait à ced-3

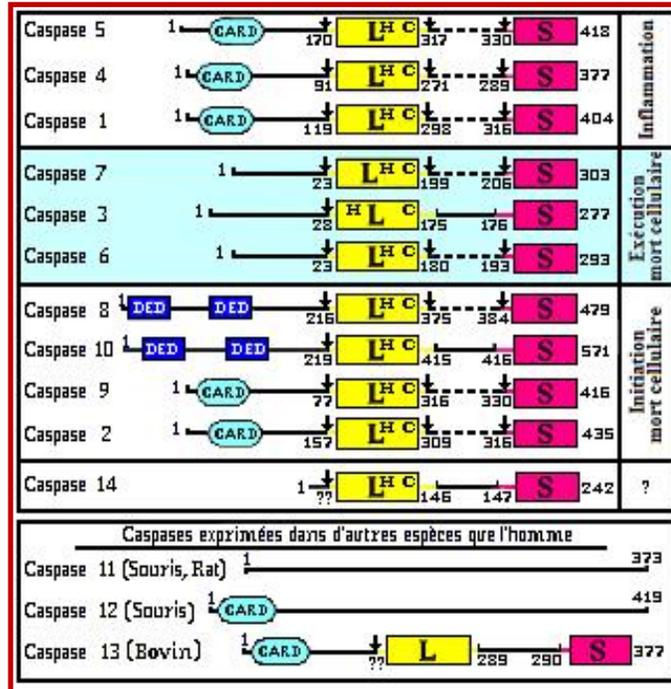
que revient le rôle essentiel dans la mort programmée des 131 cellules au cours du développement de *C. elegans*. L'expression de CED-3 dans les cellules de mammifères induit leur apoptose (Yuan, *et al.*, 1993).

A partir d'un organisme d'un millier de cellules, on a donc pu établir une modélisation des processus apoptotiques, identifiant deux grandes familles de gènes (Bcl-2/CED-9), qui règlent l'engagement définitif ou non vers la mort (Reed, 1994) qui est induite par les produits des gènes pro-apoptotiques, des protéases de la famille ICE/CED-3 (Alnemri *et al.*, 1996). Une dizaine d'analogues de ICE/CED-3 ont été clonés. Les protéases qui ont été déduites possèdent toutes un site actif catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique de type QACRG (Gln-Ala-Cys-Arg-Gly), leur conférant une spécificité de reconnaissance et de clivage au niveau de résidus aspartate en position P1. Cette spécificité de clivage n'est partagée qu'avec une seule autre protéase, le granzyme B (une sérine protéase présente dans les lymphocytes T cytotoxyques). Les résidus entourant l'aspartate dans les substrats influencent la spécificité des différentes protéases. Ces spécificités et l'émergence de nouvelles protéases ont fait naître une nomenclature internationale, on les appelle **CASPASES** (**C**ysteinyln **a**spartate-specific **p**rotein**a**se) (Alnemri *et al.*, 1996).

A ce jour, 14 caspases ont été identifiées et on les numérote selon l'antériorité du clonage de leur ADNc ; certaines caspases semblent propres à une espèce animale. Ainsi, la caspase 11 n'a été trouvée que chez la souris et le rat, alors que la caspase 13 ne semble exprimée que chez le bovin. Pour sa part, la caspase 12 ne serait présente que chez la souris (Alnemri *et al.*, 1996 ; Thornberry et Lazebnik, 1998 ; Nicholson, 1999).

Dans le monde vivant, toutes les caspases ont une structure très conservée (**Figure 13**) comprenant :

- un prodomaine N-terminal de taille variable, ayant un rôle primordial dans les interactions protéine-protéine régulatrices de l'apoptose
- un second domaine qui deviendra après clivage, la grande sous-unité (L pour Large, 17-21 kDa) et qui porte le site actif de l'enzyme avec un résidu cystéine (C) et un résidu histidine (H)
- un troisième domaine qui deviendra, après le clivage, la petite sous-unité (S pour Small, 10-14 kDa) et qui a un rôle conformationnel (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004).



**Figure 13. Structure schématique des précurseurs des caspases identifiées chez l'homme et de quelques caspases exprimées uniquement dans quelques espèces animales mais pas chez l'homme (d'après Herrera-Mendez *et al.*, 2006)**

Les caspases humaines ont été groupées sur la base de leur similarité de séquence. Les homologies de séquence divisent les caspases 1 à 10 en trois sous-familles en accord avec leur fonction physiologique et de leur implication dans les processus inflammatoires, dans la phase d'initiation ou d'exécution de l'apoptose. La caspase 14 se distingue des autres par le fait qu'elle n'est exprimée que dans l'épiderme et qu'elle est clivée, lors de son activation, à des sites ne contenant pas de résidu aspartate. Les caspases actives sont composées d'une grande sous-unité en jaune (L pur large) et d'une petite sous-unité en rouge (S pour small). L'activation de ces caspases passe par un certain nombre de clivages (flèches) qui vont éliminer les extrémités N-terminales et le fragment associant la petite et la grande sous-unité sauf dans le cas des caspases 3, 10, 14 et 13. Les régions N-terminales de plusieurs caspases contiennent divers domaines importants pour les interactions protéine-protéine lors de leur activation (Domaines DED : Death Effector Domain et CARD : Caspase Recruitment Domain). La numérotation correspond à celles des acides aminés de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les lettres C et H dans la grande sous-unité indiquent la position de la cystéine et de l'histidine du site actif.

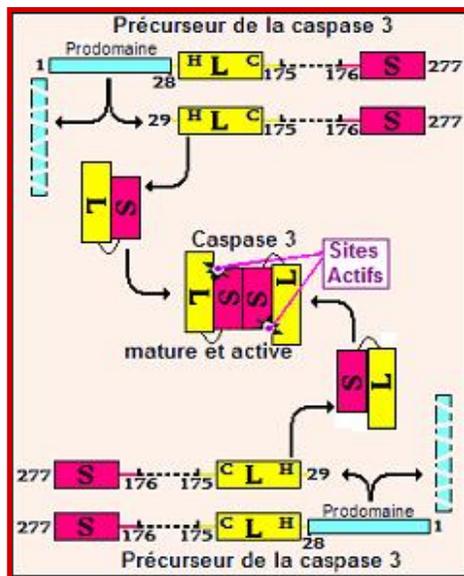
La présence de résidus aspartate sur ces protéases elles-mêmes, est une autre donnée structurale très importante. En effet, toutes les caspases existent sous la forme de proenzymes inactives, et elles subissent un clivage à ces sites qui favorisent la dimérisation de leurs deux sous-unités actives comprenant le site catalytique QACRG. Ce clivage, conduisant à l'activation de la forme proenzymatique inactive des caspases, est le fait d'une auto-activation ou d'un clivage par d'autres protéases à cystéine, schématiquement décrit comme un processus en cascade (Fraser et Evan, 1996). Deux molécules d'enzyme s'associent pour former un dimère, possédant deux sites actifs en position tête-bêche (**Figure 14**). Les sites catalytiques sont actifs seulement quand le dimère est formé.

Il existe plusieurs classifications des caspases :

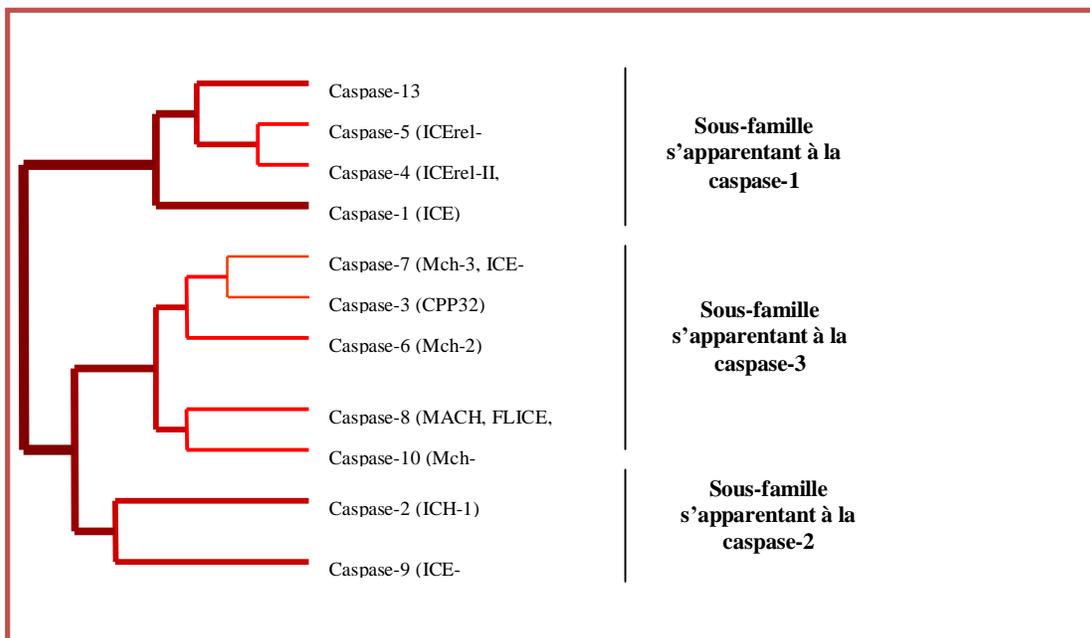
a) Classification phylogénétique.- En se basant sur les homologies de séquence entre les différentes caspases, on peut identifier trois sous-familles (**Figure 15**) (Nicholson, 1999). La première regroupe les caspases s'apparentant à ICE/caspase 1 (caspases-1, -4/-11, -5, -12 et -13). La caspase 11 est probablement l'homologue murin de la caspase-4 humaine. La deuxième regroupe les homologues de la caspase 3 (caspases-3, -6, -7, -8 et 10) tandis que la dernière regroupe les homologues de la caspase-2 (caspases-2, -9 et -14).

b) Classification en fonction des substrats.- Au cours de l'apoptose, une fraction des protéines cellulaires est clivée par les caspases. Des estimations basées sur une analyse comparative en gel, deux dimensions entre cellules saines et cellules apoptotiques suggèrent que le nombre de protéines clivées est de 100 à 200 (Fischer et *al.*, 2003). Par exemple, un des premiers substrats identifiés, la PARP (Poly-ADP Ribose Polymerase), a permis de mettre en évidence l'importance de l'activation séquentielle de ces protéases dans les différentes voies apoptotiques (Liu et al., 1997). Depuis plus de 70 de ces protéines cibles des caspases ont été identifiées, elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires, dont la réparation de l'ADN (PARP), le cycle cellulaire (p21C1P1, p27K1P1), l'inactivation de protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (actine, fodrines, gelsoline), la structure du noyau (lamines), l'inhibition de l'apoptose (Bcl-2, Bcl-XL) ou l'induction de l'apoptose (Bid, RIP) (Martin et Green, 1995).

Les caspases reconnaissent un motif térapeptidique P4-P3-P2-P1 où la position P1 est un résidu aspartate. En utilisant une banque de combinaison positionnelle de peptides, les caspases ont été classées en 3 sous-groupes (**Figure 16**). La position P2 peut être occupée par



**Figure 14.** Schéma de maturation du précurseur de la caspase 3 en caspase 3 active (d'après Herrera-Mendez *et al.*, 2006)  
Enzyme qui est un dimère avec deux sites actifs diamétralement opposés.



**Figure 15.** Analyse phylogénétique de la famille des caspases humaines (d'après Nicholson, 1999)

différents acides aminés. La position P3 est le plus souvent un résidu glutamate. L'élément déterminant de la spécificité de substrat est l'acide aminé en position P4 :

**Caspases du groupe I** (caspases-1, -4, -5 et -13) : préfèrent des acides aminés hydrophobiques (tryptophane, tyrosine) retrouvés au niveau des procytokines, mais pas des protéines clivées au cours de l'apoptose.

**Caspases du groupe II** (caspases-2, -3 et -7) : préfèrent un résidu aspartate. Ce motif DEXD (Asp-Glu-X-Asp) est un motif très conservé, puisque reconnu par CED-3 et majoritairement retrouvé au niveau des protéines clivées lors de l'apoptose.

**Caspases du groupe III** (caspases-6, -8, -9 et -10) : préfèrent les acides aminés aliphatiques (valine, leucine). Ces séquences sont observées au niveau des sites de maturation des caspases des groupes I et II, ce qui s'accorde avec l'hypothèse d'une cascade protéolytique impliquant des caspases initiateuses (groupe III) capables de s'autoactiver et d'activer des caspases effectrices (groupe II).

Il existe, cependant, deux exceptions puisque la caspase-6 (groupe III) se comporterait comme une caspase effectrice en clivant spécifiquement les lamines tandis que la caspase-2 (groupe II) a la structure d'une caspase initiateuse. Le site de reconnaissance de la caspase-12, dont l'homologue humain est inconnu, n'est pas encore identifié.

c) Classification en fonction de la longueur de prodomaine.- Les précurseurs inactifs des caspases ont un prodomaine amino-terminal de longueur variable (**Figure 16**) (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004). On distingue :

- **Classe-I** : Procaspases avec un prodomaine long : Les caspases sont impliquées dans les processus inflammatoires (caspases-1, -4 et -5). La fonction précise de ces caspases est moins bien connue. Caspases initiateuses (caspases-8, -9 et -10) impliquées dans la phase d'initiation de l'apoptose. Ces caspases sont caractérisées par des prodomaines de grande taille contenant souvent des régions essentielles pour leurs interactions avec d'autres protéines. Par exemple, les prodomaines des caspases-8 et -10 contiennent des Domaines Effecteurs de Mort Cellulaire (Death Effector Domains : DEDs). Ces structures vont permettre la liaison de ces caspases aux molécules régulatrices (activateurs ou inhibiteurs) porteuses de domaines similaires au travers d'interactions DED-DED. Certaines autres caspases (caspases-1,-2, -4, -5 et -9) possèdent un Domaine de Recrutement des Caspases (Caspase Recruitment Domain : CARD). Comme les domaines DED, les domaines CARD sont responsables de l'interaction des caspases avec une grande variété de molécules

Substrat potentiel	Site de clivage				
	P4	P3	P2	P1	
<b><u>Groupe I</u></b>	Hydrophobe			Asp	Caspases-1, -4, -5, -13
<b><u>Groupe II</u></b>	Asp	Glu	Xxx	Asp	Caspases-2, -3, -7, CED-3
<b><u>Groupe III</u></b>	Aliphatique			Asp	Caspases-6, -8, -9, -10

**Figure 16.** Classification des différentes caspases humaines en fonction de leur spécificité de clivage (d'après Nicholson, 1999)

régulatrices (activateurs ou inhibiteurs) par le biais d'interactions CARD-CARD. Les prodomaines longs peuvent permettre leur oligomérisation au niveau de complexes multiprotéiques qui peut aussi permettre leur activation par autocatalyse, mais toutes ces caspases ne sont pas activées de la même façon.

- **Classe-II** : Procaspases avec un prodomaine court : Caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7) ne peuvent pas s'autoactiver et nécessitent un clivage par les caspases de la classe-I pour être activées. Elles se situent, donc, en aval des précédentes dans une cascade protéolytique. Ces caspases destructurent la cellule lors de la phase d'exécution.

#### 4.2.5. *Les caspases et l'apoptose en science de la viande*

La mort programmée de cellules (apoptose) a été intensivement étudiée dans les cellules qui contiennent un seul noyau, mais que se passe-t-il avec des cellules qui contiennent plusieurs noyaux comme dans la cellule musculaire mature?. L'occurrence de l'apoptose dans les cellules musculaires est controversée dans la littérature courante. Cependant l'évidence suggère que l'apoptose est une caractéristique de la cellule musculaire (Sandri et Carraro, 1999 ; Adams et al., 2001 ; Liu et Ahearn, 2001 ; Primeau et al., 2002 ; Sandri, 2002 ; Tews, 2002, 2005 ; Leeuwenburgh, 2003 ; Yuan et al., 2003). En accord avec ce rapport, l'expression de différentes caspases (caspases-1, -3, -6, -8 et -9...) et de divers régulateurs de l'apoptose (activateurs ou inhibiteurs) a été vérifiée dans les cellules du muscle squelettique (Biral et al., 2000 ; Belizario et al., 2001 ; Jin et al., 2001 ; Sandri et al., 2001).

La mort dans un tissu vivant peut se produire par nécrose ou apoptose. Puisque la nécrose n'a jamais été rapportée dans le muscle *post mortem*, le déclenchement de la mort cellulaire par le processus apoptotique est l'issue la plus probable. Quelque soit l'espèce animale et quelle que soit la technologie d'étourdissement utilisée, la dernière phase du processus d'abattage est la saignée. Dès lors, toutes les cellules et les tissus vont être irréversiblement privés de nutriments et d'oxygène. Face à ces conditions environnementales très néfastes, les cellules musculaires et les autres n'auront pas d'autre alternative que de s'engager sur la voie du suicide avec toutes les conséquences de l'apoptose.

Mais qu'a pu être la voie de signalisation menant à l'apoptose des cellules après la saignée ? Une possibilité serait un changement irréversible dans les myofibrilles à la jonction neuromusculaire où des activateurs de la cascade apoptotique pourraient être produits. Une telle prétention est soutenue par la diminution rapide de l'efficacité de la stimulation électrique de basse tension (Valin, 1982) qui résulte d'un changement *post mortem* rapide du

système nerveux, le conducteur principal du courant de basse tension (Chrystall et Devine, 1985). De même, la dénervation a été montrée capable d'induire l'apoptose dans le muscle squelettique, un processus souvent lié à une fragmentation des myofibrilles (Sandri et Carraro, 1999 ; Adams et *al.*, 2001 ; Liu et Ahearn, 2001). Une autre hypothèse de l'induction de l'apoptose dans le muscle *post mortem* pourrait être le dysfonctionnement des mitochondries (détérioration de la chaîne oxydante, augmentation intracellulaire de la concentration de radicaux libres, ...) se produisant peu après la mort (Machlin et Bendich, 1987 ; Halliwell, 1991 ; Renerre, 1999). En effet, le changement des mitochondries pourrait être un autre initiateur de l'apoptose par la libération des facteurs proapoptotiques comme le cytochrome c (Adrian et Martin, 2001). Ce sont deux voies possibles menant à l'apoptose dans le muscle post mortem mais d'autres voies peuvent exister (Hirsch et *al.*, 1997 ; Susin et *al.*, 1999 ; Hengartner, 2000 ; Torriglia et *al.*, 2000 ; Van Gurp et *al.*, 2003). En ce qui concerne la science de la viande, rien n'est connu au sujet des mécanismes moléculaires de l'apoptose, mais cette étape préliminaire pourrait être d'importance cruciale dans le muscle post mortem puisque tous les changements suivants qui contribuent à la conversion du muscle en viande dépendront fortement de cet événement.

## **CONCLUSION**

Le défi principal de la science de la viande est d'identifier les marqueurs biologiques de la tendreté qui permettront la classification des carcasses dans des groupes de qualité et l'ajustement des prix à la qualité prédite.

La plupart de programmes de recherche sont limités aux calpaïnes puisque elles sont considérées comme les principaux intervenants dans le processus enzymatique qu'est la maturation de la viande. En ce qui concerne la texture de la viande on doit considérer non seulement les enzymes protéolytiques mais également leurs inhibiteurs endogènes, qui sont souvent de meilleurs marqueurs prédictifs de cette qualité de la viande que les peptidases elles-mêmes (Zamora et *al.*, 2005). A la lumière des données disponibles dans la littérature une série de nouveaux systèmes protéolytiques et de leurs inhibiteurs ont été pris en considération et la recherche actuelle doit être focalisée aussi sur les autres systèmes que ceux seulement des calpaïnes et cathepsines ; par exemple les serpins (inhibiteurs de sérine protéinases), les caspases qui sont des enzymes jamais considérées dans la science de la viande et qui sont spécialisées dans la dégradation des structures cellulaires.

Par ailleurs, si les inhibiteurs de protéinases ont fait l'objet de plusieurs investigations au niveau des tissus de mammifères, très peu de données sont actuellement disponibles concernant le tissu musculaire.

Cette thèse s'insère dans une étude globale qui vise à mieux comprendre les relations qui lient les différents paramètres physico-chimiques et biochimiques intervenant dans le processus d'attendrissage naturel de la viande d'agneau. La deuxième partie de notre travail a été orientée vers la mise en évidence de l'apoptose dans le muscle. Pendant les premières heures de la transformation du muscle en viande, phase considérée depuis des décennies comme une étape essentielle de l'attendrissage. Cette phase visera à suivre et à caractériser l'entrée en apoptose du muscle de rat. Une troisième partie sera consacrée essentiellement à mesurer des cinétiques enzymatiques et, plus particulièrement, à la détermination des constantes d'association caractérisant la vitesse d'interaction des serpinines avec leurs protéases cibles. Pour essayer d'identifier ces derniers et de préciser la nature de leurs protéases cibles *in vivo*, protéases susceptibles de jouer un rôle primordial dans le processus d'attendrissage des viandes.

## Préambule

Rappelons que notre travail comporte trois parties :

Le but de **la première partie** de notre travail est l'étude des paramètres physico-chimiques et biochimiques intervenant dans le processus d'attendrissage naturel de la viande ovine. Pour atteindre cet objectif nous avons mesuré plusieurs caractéristiques biologiques connues pour avoir un rôle dans le processus d'attendrissage au niveau de quelques muscles d'ovins de même race, Ouled Djellel, et d'âge similaire.

Donc le premier objectif de notre travail était l'identification des paramètres physico-chimique et biochimique principalement responsables de la maturation de la viande d'agneau. Mais nous avons été confrontés à plusieurs problèmes d'ordre pratique. De nombreuses mises au point de techniques ont été adaptées aux moyens disponibles au laboratoire. La méthodologie ainsi que les résultats concernant la mise au point des techniques seront présentées dans la première partie du chapitre résultats et discussions. Les techniques déjà connues et qui n'ont pas nécessité de mise au point seront détaillées dans le chapitre matériels et méthodes.

Nous avons pu caractérisée la viande d'agneau par le suivi de l'évolution de la dureté et des paramètres physicochimiques (pH, osmolarité, rétention d'eau) dans différents muscles d'agneau en relation avec les caractéristiques métaboliques de ces mêmes muscles estimées par immunochimie ainsi que la dégradation des protéines myofibrillaires au cours du stockage qui a été estimée par électrophorèse en conditions dénaturantes.

**La deuxième partie** de notre travail était orientée sur l'étude des premières heures de la transformation du muscle en viande, phase considérée depuis des décennies comme une étape essentielle de l'attendrissage. Cette phase visera à apporter des preuves de la mise en place du processus de mort par apoptose dans le muscle *post mortem*. Nous avons en effet émis l'hypothèse que la phase, très mal définie, que l'on désignait jusque là sous le nom de phase pantelante pourrait correspondre à la mise en place du processus d'apoptose. Cette mise en place du processus apoptotique s'accompagne de changements très caractéristiques dont les principaux sont :

§ Inversion de la polarité de la membrane en relation avec l'évolution du pH, ce point sera étudié en histochimie grâce à l'utilisation d'une protéine marquée au FITC (Annexin V

Fluoroscéine- isothiocyanate) et qui possède une très forte affinité vis-à-vis des groupements phosphatidylserine. Un suivi du pH sera fait en parallèle afin vérifier la relation entre la translocation des phospholipides et les phases de stabilité du pH.

- § Altération des mitochondries avec libération du cytochrome c: l'apparition du cytochrome c dans le cytosol des cellules pourra être suivi par western blot, à l'aide d'un anticorps dirigé contre le cytochrome c. Cet anticorps a été préparé en utilisant, comme antigène, du cytochrome c commercial.
- § Les caspases: un suivi de l'apparition des différentes caspases à été réalisé par western blot sur des extraits musculaires prélevés à différents temps *post mortem* grâce à des anticorps préparés au laboratoire sur des lapins.
- § Fragmentation de l'ADN : l'apparition de fragments de tailles uniformes peut être suivie par immunohistochimie grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre ces fragments et disponible dans le commerce.

Toutes ces modifications associées à l'apoptose vont influencer de façon considérable sur le processus de maturation des viandes. Plus le processus de mort cellulaire sera intense et complet (déstructuration du muscle maximale), plus la viande sera tendre. Ceci montre l'importance capitale de cette phase.

**La troisième partie** de notre thèse a été réalisée, pendant mes différents séjours en France, en collaboration avec Carlos HERRERA-MENDEZ, étudiant Mexicain en thèse à l'INRA de Theix-Clermont Ferrand pour la préparation de sa thèse, et Xavier BLANCHET, étudiant en thèse au Laboratoire de Génétique moléculaire Animale à l'Université de Limoges. Ce travail en commun est l'aboutissement de plusieurs années de recherches engagées au niveau du laboratoire sur l'identification des inhibiteurs de sérine protéinases détectées dans le muscle de bovin. Dans le contexte de la viande, ces inhibiteurs étaient d'autant plus importants que leurs concentrations dans le tissu musculaire se sont avérées être le meilleur indice de prédiction de la tendreté de la viande et, cela, parmi une trentaine de variables mesurées (Zamora et al., 2005).

Ces observations ont conduit à une étude plus systématique des inhibiteurs de sérine protéases dans le tissu musculaire pour essayer d'identifier ces derniers et de préciser la nature de leurs protéases cibles *in vivo*, protéases susceptibles de jouer un rôle primordial dans le processus d'attendrissement des viandes. La purification, la caractérisation et la

quantification de trois serpins musculaires ont été réalisées dans le cadre de la thèse de Herra-Mendez (1996). Par séquençage N-terminal, deux de ces inhibiteurs ont été identifiés comme étant des endopines dénommées initialement endopines 1A et 1B (Herra-Mendez et al., 2006) puis bovSERPINA3-1 et A3-3 par Pélissier et al (2008). La troisième serpine a été identifiée comme étant l'antithrombine III.

Leurs propriétés physicochimiques et leurs activités vis-à-vis d'une série de serine et de cystéine protéases ont fait l'objet de deux publications (Tassy et al., 2005; Herra-Mendez et al., 2006). Les séquences des deux serpins purifiées ont été obtenues par nos collègues de l'université de Limoges (Unité de Génétique Moléculaire Animale, UMR1061 INRA-Université, Univ. de Limoges) qui ont identifié et séquencé les gènes codant pour ces protéines. Ce travail a permis de montrer que ces deux serpins de la famille des endopines faisaient en fait partie d'un groupe très homologue de serpins comprenant au moins 8 membres (Pelissier et al., 2008).

Ces travaux ont conduit à la production de serpins recombinantes et en particulier la bovSERPINA3-3. Dans le cadre de la thèse de Xavier BLANCHET, Université de Limoges, des mutations ont été réalisées sur cette protéine pour identifier le site de clivage ciblé par les caspases lors de leur inhibition. La disponibilité des protéines recombinantes permettra une étude plus détaillée des relations structure-fonction de ces protéines et de leur mode d'inhibition des caspases. Ces protéases possèdent deux sites actifs contrairement à toutes les serine et cystéine protéases testées jusque là.

Ma contribution à ces travaux a consisté à caractériser les cinétiques d'interaction (détermination de  $k_{ass}$ ) des bovSERPINA3-1 et A3-3 purifiées à partir de muscles et des formes recombinantes sauvages ou mutées, avec les caspases initiatrices (caspase 8) et exécutrices (caspase 3) humaines prises pour modèle. Ce travail a été publié dans le Journal FEBS Letters en 2009. La séquence des serpins utilisées dans ce travail (bovSERPINA3-1 et A3-3) ainsi que la méthode utilisée pour déterminer la constante d'association ( $k_{ass}$ ) des serpins avec les caspases 3 et 8, a été publiée en document complémentaire avec l'article et inclus dans le chapitre correspondant. (Supplemental data file Chapitre 4 partie résultats et discussion).

---

## Chapitre 1 : CARACTERISATION PYHYSICO-CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE DE LA VIANDE D'AGNEAU

### 1. MATERIEL BIOLOGIQUE

#### 1.1. Animaux

Pour étudier la variabilité de l'attendrissage de la viande liée au facteur animal, et type de muscle nous avons utilisés cinq agneaux de la race Ouled Djellal qui proviennent du même producteur (ferme pilote, Kadri 4 chemin Constantine) afin d'être zootechniquement homogènes. Ces animaux sont âgés de 11 à 13 mois et leur poids de carcasses varie entre 11 et 16 kg, avec une moyenne de 12,68kg.

#### 1. 2. Muscle

Pour les cinq agneaux les muscles étudiés sont : *Muscle Semi Membranosus (SM)*, *Muscle Semi Tendinosus (ST)*, *Muscle Longissimus lumborum (LB)* et le muscle *Rectus Femoris (RF)*.

#### 1. 3. Abattage et prélèvement des échantillons

L'abattage des cinq agneaux ces faits au niveau de l'INATAA selon le rite musulman, les animaux sont transportés la veille de la journée du travail pour éviter le stress du transport. Les muscles sont prélevés immédiatement après l'abattage, ils sont découpés en neuf tranches d'épaisseurs égales.

Une tranche a été immédiatement plongé dans de l'azote, afin de servir au mesure de certains paramètres biochimiques à savoir le dosage de la teneur en myoglobine pour estimé le métabolisme oxydatif, et la teneur en isoformes M4 de l'enzyme LDH pour caractériser le métabolisme glycolytique des muscle au stade d'abattage. Cette tranche a également servie au dosage du collagène du muscle afin d'estimé la dureté de bases des différents muscles étudié. Ces dosages ont été réalisés au laboratoire Biochimie et Protéines Musculaire de la station de recherche sur la viande INRA de Theix.

Les huit tranches qui restent sont emballées dans des sachets en polyéthylène. A part les tranches utilisées pour la première analyse, les autres tranches sont placées dans un bain d'eau à 12°C de façon à éviter le « cold-shortening ». Le lendemain (24 h *post mortem*), les échantillons sont transférés dans un bain à 4°C et stockés ainsi jusqu'à 48 h *post mortem*.

Les paramètres sont étudiés en cinétique aux temps suivants : 1, 4, 6, 8, 10, 12, 24 et 48h *post mortem*. Pour chaque temps de prélèvement, nous avons répété les mesures trois fois pour tous les paramètres sauf pour la mesure de la tendreté au pénétromètre qui a été faite cinq fois.

Les paramètres mesurés en cinétique sont la température, le pH, la conductivité électrique, et la capacité de rétention d'eau des protéines myofibrillaires, les degrés de protéolyse par le suivi du profile électrophorétique, et également la mesure de la dureté par pénétromètre. Ces mesures ont été faites au laboratoire de l'INATAA ainsi que au laboratoire de biochimie et Génétique station l'amélioration des plantes.

## **2. METHODES PHYSICOCHIMIQUES**

### **2.1. Détermination de la température**

La température intramusculaire a été mesurée au différents *post mortem* afin de vérifier l'homogénéité du régime thermique de toutes les tranches de viande. La température est mesurée à l'aide d'un thermomètre électronique (Testo720) à sonde pénétrante. La température est directement lue et exprimée en°C. La mesure est effectuée trois fois pour chaque échantillon.

### **2.2. Mesure du pH**

Pour la mesure du pH, 2g de muscle sont préalablement broyés à la moulinette et homogénéisés au polytron pendant 10 à 15 secondes dans 20 ml d'acide iodoacétique, 5 mM. L'acide iodoacétique n'a pas de pouvoir tampon, donc le pH mesuré est égal au pH réel. De plus, il bloque l'activité des enzymes glycolytiques qui peuvent influencer la valeur du pH, notamment *ante rigor* (Ouali et al., 1994 ; Zamora et al., 1996). La mesure est réalisée sur l'homogénat ainsi obtenu à l'aide d'un pHmètre de paillasse à microprocesseur de type MP220 équipé d'une électrode combinée en verre de même marque. La valeur du pH sera la moyenne de trois essais pour chaque muscle.

### **2.3. Estimation de la capacité de rétention d'eau des PMF**

La quantité de jus extractible est déterminée à partir de viande hachée à la moulinette pendant environ 8 secondes, centrifugée à 18 000 ×g pendant 30 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de type Centrikor T-42K (KONTRO Instrument). Le pouvoir de rétention

d'eau des protéines musculaires est estimé par la quantité de jus relarguée lors de la centrifugation. Il est exprimé en g / g de muscle (Trout 1988 ; Ouali et *al.*, 1994 ; Zamora et *al.*, 1996 ; Lesiak et *al.*, 1996). Pour chaque prélèvement trois essais sont réalisés

#### **2.4. Mesure de la conductivité électrique**

Le conductimètre utilisé est à microprocesseur type LF 196 (WTW, Germany) muni d'une cellule de conductivité type TetraCon 96. L'appareil est étalonné avec une solution prête à l'emploi constituée de chlorure de potassium à 0.01 mol/l de conductivité électrique connue à température de référence de 25°C.

L'échantillon de muscle de masse d'environ 5g très grossièrement haché à la moulinette pendant 8 secondes est ensuite centrifugé à  $18\,000 \times g$  pendant 30 minutes. La totalité du jus relargué est récupéré et complété à 20 ml avec de l'eau pure afin d'avoir un volume suffisant pour plonger la cellule de conductivité.

Les valeurs de conductivité sont ajustées automatiquement par rapport à la température de l'échantillon. Des mesures également ont été faites sur l'eau pure utilisée pour diluer les jus de viande. Cette valeur a été déduite des valeurs de conductivité. La conductivité électrique est exprimée en  $\mu S/cm$  et par gramme de muscle.

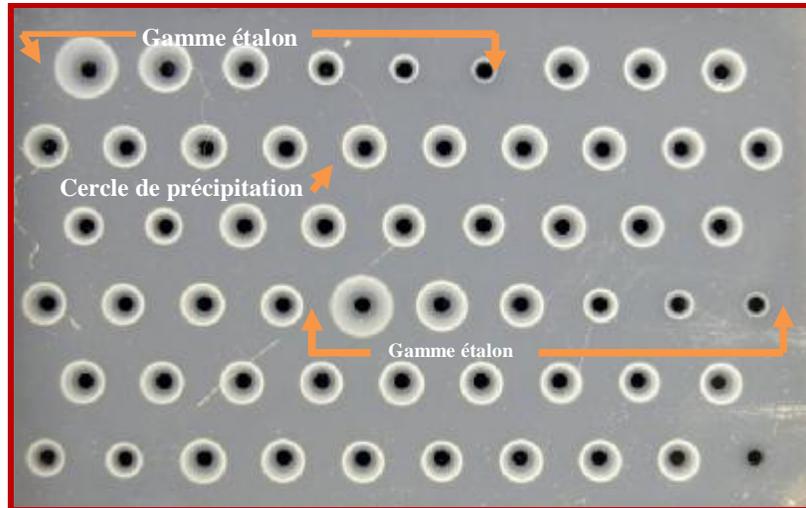
### **3. METHODES BIOCHIMIQUES**

#### **3.1. Détermination immunologique de la teneur en myoglobine et en isoforme M4 de l'enzyme LDH**

A 1h *post mortem* afin de caractériser le muscle au stade d'abattage. Le métabolisme glycolytique des muscles a été estimé par la teneur en isoforme M4 de LDH. Le métabolisme oxydatif a été caractérisé par le dosage de la teneur de la myoglobine. Le dosage a été réalisé avec la technique d'immunodiffusion radiale technique de Mancini (Mancini et *al.*, 1965).

##### **3.1.1. Principe de la technique d'immunodiffusion radiale.**

Les protéines à doser sont déposées dans des plaques de gélose contenant l'antisérum spécifique de celle-ci. Les protéines diffusent dans la gélose jusqu'à l'équivalence entre l'anticorps et l'antigène, qui se traduit par un précipité. La surface du cercle de précipitation est proportionnelle à la concentration en protéines, déterminée à partir d'une droite de



**Figure 17 :** exemple de plaque de la technique *d'immunodiffusion radiale*



**Figure18.** Dispositif de prélèvement du sang de lapin immunisé



**Figure19.** Caractérisation par immunodiffusion double (Ouchterlony, 1948)

Dans le puits central 15  $\mu$ l de la solution de peptide qui a servie à immuniser les lapins est déposés, tandis que dans les puits extérieurs 15  $\mu$ l de chacun de 3 sérums à trois dilutions différentes (pur, au 1/3 et au 1/9<sup>e</sup>) sont déposés. La diffusion s'effectue en chambre humide à 37°C pendant 24 heures

régression définie à partir d'une gamme de concentrations connues et déposée en même temps que les échantillons (**Figure 17**)

### 3.1.2. Production d'anticorps polyclonaux anti myoglobine et anti LDH

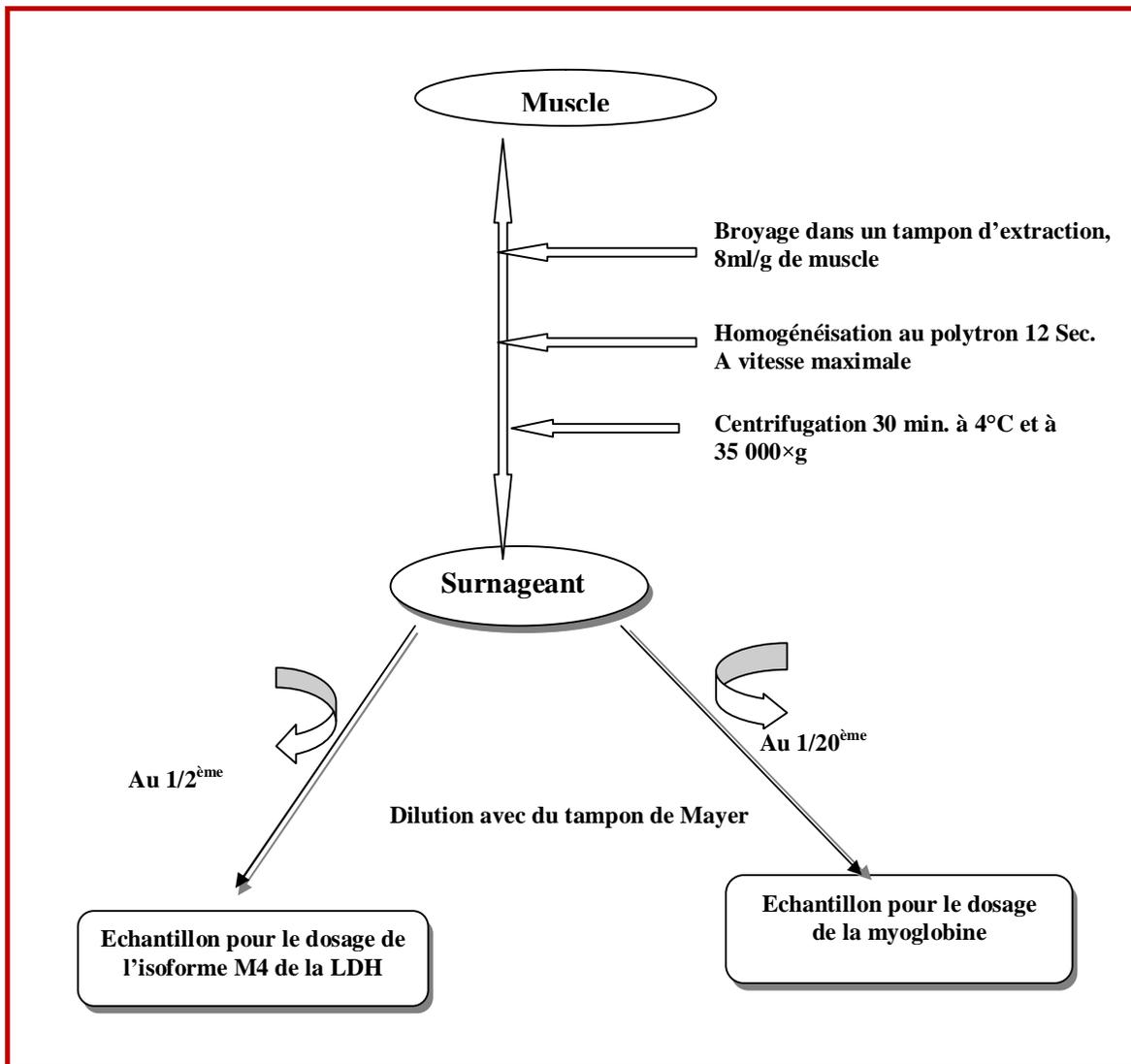
L'antiserum dirigé contre la myoglobine et l'isoforme M4 de LDH sont produits en immunisant 2 lapins. Environ 100µg/µL de la myoglobine (Sigma M0630) et LDH M4 (Sigma L1378) sont émulsionnés dans un volume identique d'adjuvant complet de Freund. Les lapins sont immunisés par injection intradermique en multipliant le nombre de points d'injection. Trois autres injections sont effectuées de la même manière avec 100µg d'antigène émulsionné avec l'adjuvant incomplet de Freund par animal et à quatre semaines d'intervalle.

Une semaine après le dernier rappel, le sang est prélevé par incision de l'oreille de l'animal et le sérum est ensuite récupéré par centrifugation et aliquote (**Figure 18**).

Les sérums sont ensuite analysés quant à la réactivité et la spécificité des anticorps par immunodiffusion double selon la méthode d'Ouchterlony (1948) (**Figure 19**) voir ci-après page 70

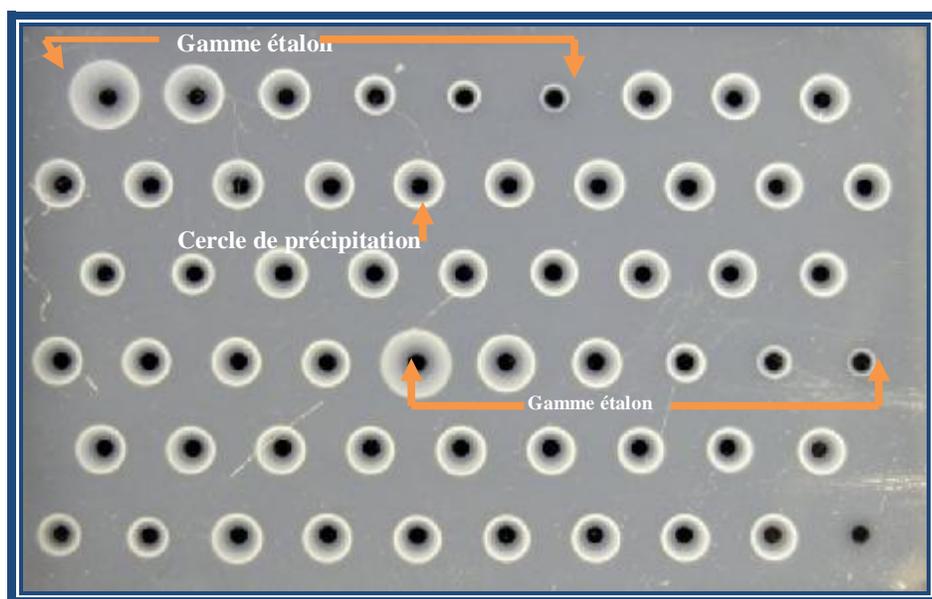
### 3.1.3. Préparation des échantillons

2g de muscle prélevé à 1 h post mortem, sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C dans une pochette plastique thermosoudée. Juste avant l'extraction les échantillons sont découpés grossièrement à l'aide d'un bistouri. Ils sont décongelés à température ambiante et 16 ml de tampon d'extraction Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, sont rajoutés (**Figure 20**). A l'aide d'un polytron les échantillons sont broyés pendant 12 seconds à vitesse maximale. L'homogénat est centrifugé 30 min, à 4°C et à 35000×g et le surnageant récupéré est mesuré par pesée. Les échantillons destinés au dosage de la lactate déshydrogénase sont dilués au tiers avec du tampon de Mayer contenant 0,1% de sérum albumine humaine (SAH). Ce tampon favorise la précipitation des protéines et la SAH empêche leur adsorption sur le plastique lorsque la concentration en protéines est inférieure à 1 mg/ml. Les échantillons destinés au dosage de la myoglobine sont dilués au 20<sup>ème</sup> avec le même tampon. Pour le choix des dilutions à faire des essais ont été réalisés afin d'avoir une surface mesurable du cercle de précipitation sans pour autant avoir une superposition des cercles.

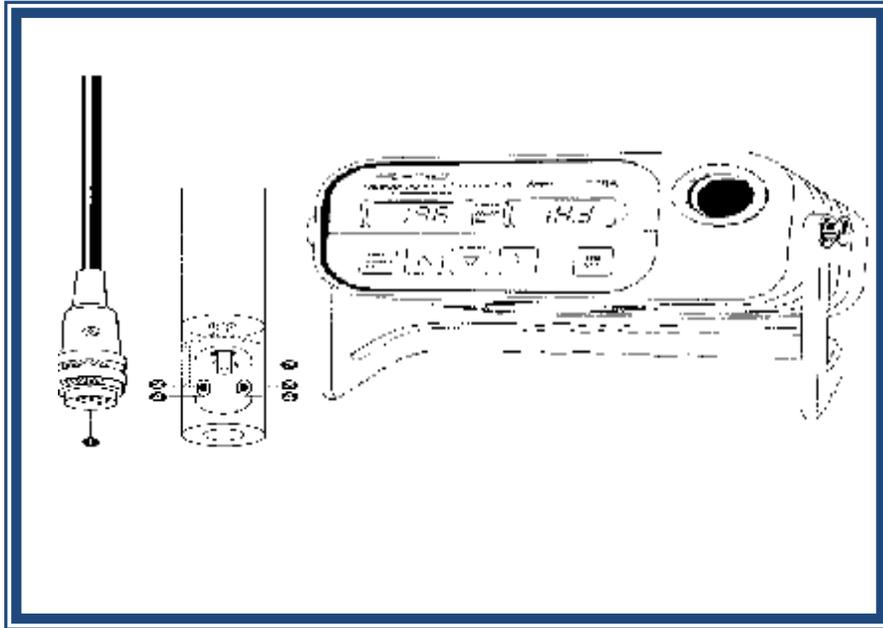


**Figure20.** Protocole de préparation des échantillons servant au dosage immunologique des teneurs en isoforme M4 de la LDH et de la myoglobine

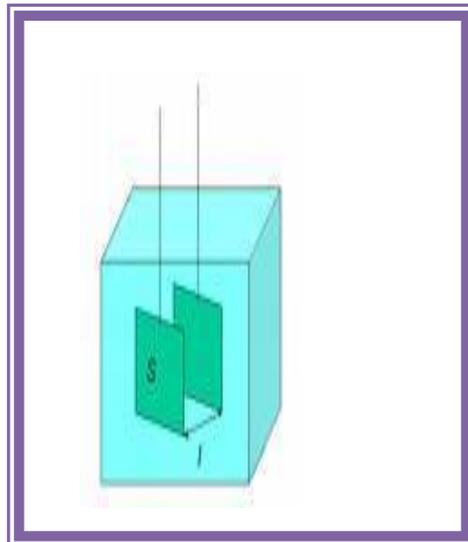
<b><u>Tampon d'extraction :</u></b>	pH 8,5
Tris HCl.....	20mM
<b><u>Tampon de Mayer :</u></b>	pH 7,3
NaCl.....	1,50 mM
Véronal sodique .....	5 mM
HCl.....	1 N
MgCl <sub>2</sub> .....	20,5 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	150 mM



**Figure 8** : exemple de plaque de la technique *d'immunodiffusion radiale*



**Figure 11** : Conductimètre à microprocesseur type LF 196 (WTW, Germany)  
muni d'une cellule de conductivité type TetraCon 96



### 3.1.4. Préparation de la gamme étalon

La gamme de LDH est réalisée à partir d'une solution de LDH bovine commercialisée (sigma). Les différents points de la gamme, réalisés à l'aide du tampon de Mayer, sont 500, 250, 125, 50 et 25  $\mu\text{g/ml}$ .

La gamme de la myoglobine est effectuée à l'aide de myoglobine ovine purifiée à partir du muscle diaphragma de mouton selon le protocole décrit par Gatellier et al., 1992. Les différents points de la gamme, réalisés à l'aide du tampon de Mayer, sont 500, 350, 175, 87,5 et 43,5  $\mu\text{g/ml}$ .

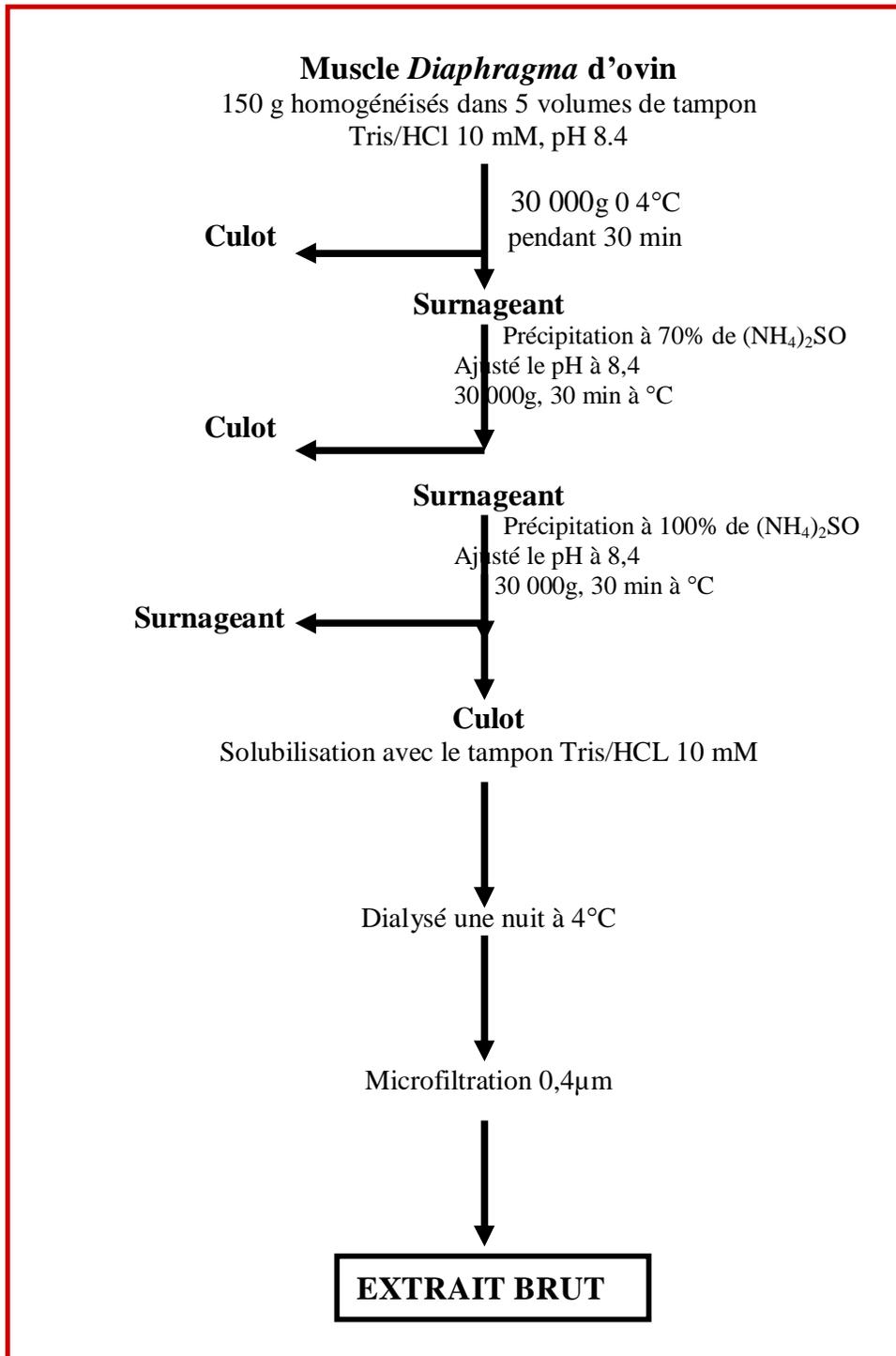
- **Obtention de la myoglobine ovine pour la gamme étalon :**

La méthode de purification mise en œuvre est celle décrite par Gatellier et al., 1993 et Levieux et Levieux 1996.

La myoglobine est purifiée à partir du muscle l'anglais de mouton, après extraction et précipitation avec le sulfate d'ammonium, l'extrait brut est ensuite fractionné par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne Mono-Q. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes avec une coloration à l'argent a été réalisée afin de vérifier la pureté de la fraction purifiée.

- **Extraction et fractionnement avec le sulfate d'ammonium (Figure 21)**

Le muscle est prélevé immédiatement après abattage 1 post mortem (environ 150 g) a été découpé en petits morceaux puis broyé à la moulinette. Le broyat a ensuite été homogénéisé au polytron dans 5 volumes de tampon d'extraction Tris HCl 10 mM pH 8,4. Cette étape est réalisée dans de la glace afin d'éviter l'oxydation de la myoglobine. L'extrait a ensuite été centrifugé à 30 000  $\times g$  pendant 30 min et à 4°C. le surnageant a été fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium jusqu'à 70 % de saturation, par ajout de cristaux à raison de 1g/min. sous agitation. L'addition de quantités importantes de sulfate d'ammonium entraîne une baisse du pH pouvant atteindre 1 unité pH. Au cours de la précipitation, le pH est donc régulièrement réajusté par une solution de NaOH 1N. Le surnageant a été centrifugé 30 000  $\times g$  pendant 30 min et à 4°C. Après élimination du culot, le surnageant a été de nouveau fractionné au sulfate d'ammonium jusqu'à 100% de saturation avec ajustement du pH à 8,4. L'échantillon est ensuite centrifugé 3 min à 30 000  $\times g$  et à 4°C. Le culot est alors repris dans



**Figure 21.** Préparation de l'extrait brut à partir du muscle *Diaphragma* d'ovin (Levieux et Levieux 1996)

un minimum de tampon Tris HCl 10 mM pH 8,4. L'échantillon a ensuite été dialysé pendant 12h contre le tampon Tris HCl 10 mM pH 8,4, afin d'éliminer le sulfate d'ammonium. Le dialysat a ensuite été filtré à 0.4µm pour éliminer les protéines insolubles. Ensuite concentration totale en protéines dans le dialysat est dosé par la méthode de Bradford (voir ci-après page 66)

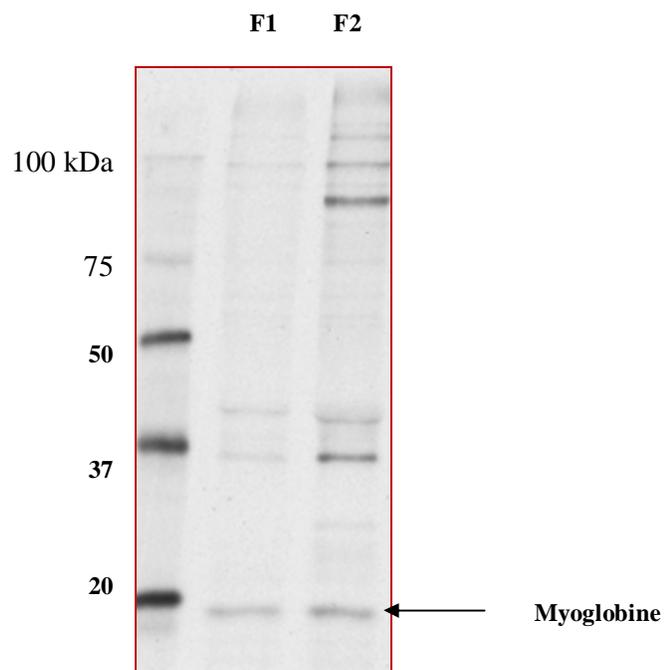
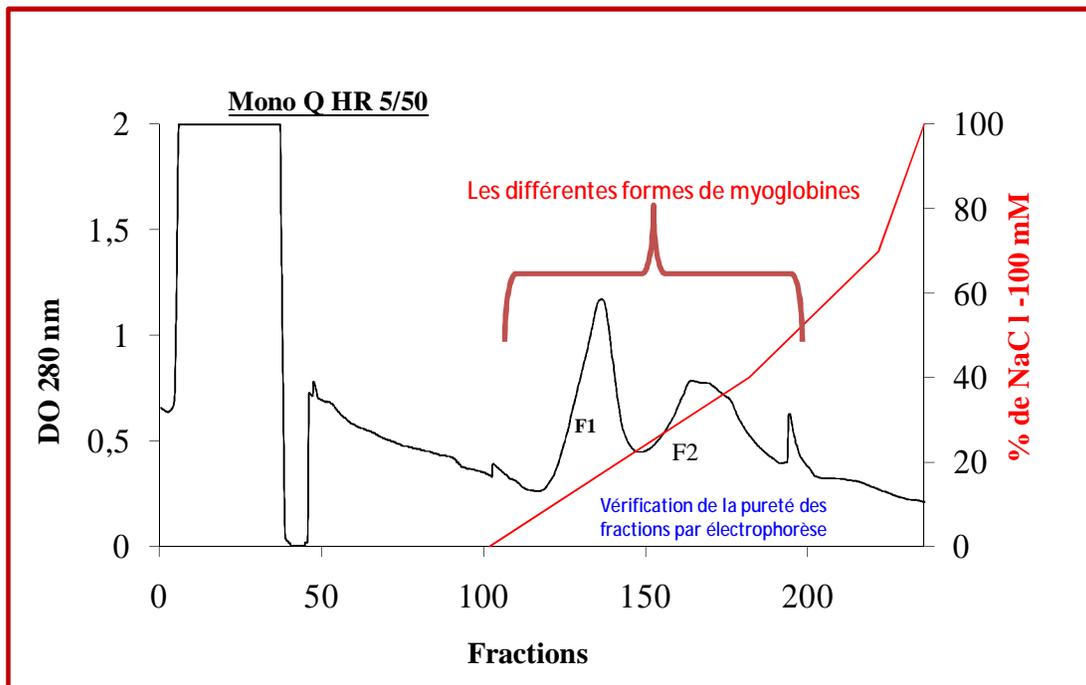
- **Purification**

La purification de la met et oxymyoglobine est faite sur une chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q HR 5/50 GL Tricorn columns 17-5166-01). Une échangeuse anionique est constitué d'une matrice insoluble sur laquelle sont fixés des groupements chargés positivement. Les protéines seront plus ou moins liées à la résine en fonction de leur charge globale. Le décrochage séquentiel des protéines est réalisé par modification d'un gradient de force ionique. Après équilibration de la colonne avec du tampon Tris HCl 10mM pH 8,4. L'extrait brut dialysé sur la nuit est chargées sur la colonne (5/50 GL) à un débit de 1 ml/min. Un volume de 10 ml à été injecté avec une concentration total en protéine de 200mg. Après injection, le retour à la ligne de base, suivi par mesure de la DO à 280nm, est obtenu par passage de tampon d'équilibration. A l'aide d'une FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, pharmacia). Les différentes forme de myoglobine sont ensuite séparées par un gradient de NaCl allant de (1-100mM) dans du tampon Tris HCl 10mM pH 8,4. L'élution est réalisée à un débit de 90ml/h. des fractions de 1ml sont collectées. Un profil dilution est présenté sur la **figure 22**. Les fractions colorées en rouge ont été conservées à 4°C, la vérification de leur pureté a été faite par Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes avec une coloration à l'argent (voir ci-après page 67)

### **3.2. Estimation de la protéolyse par électrophorèse coloration au bleu de coomasie**

#### **3.2. 1. Extraction des protéines myofibrillaires**

Le culot de myofibrilles est obtenu à partir de 1 g de muscle broyé dans une solution modifiée de Ringer, homogénéisé 15 secondes au polytron, et filtré sur de la gaze pour éliminer la fraction insoluble, notamment le collagène (**Figure 23**). Le filtrat est laissé à 4°C pendant 30 minutes pour un complément d'extraction, les protéines sarcoplasmiques sont éliminées par centrifugation 15 minutes à 10 000 × g. Le culot obtenu est lavé deux fois dans un tampon de KCl 50 mM, pH 6.5, puis il est repris dans ce même tampon sans EDTA (Bar et Pette 1988 ; Heize et Bruggemann 1994).



**Figure 22.** Purification de la myoglobine sur une chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q HR 5/50 GL Tricorn columns 17-5166-01), et profil électrophorétique des fractions colorées en rouge F1 et F2 (la couleur indique la présence de myoglobine). La fraction la plus pure (F1) a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage pour le dosage de la myoglobine dans le muscle.

### 3.2. 2. Methode électrophorétique

L'analyse électrophorétique des échantillons, en conditions dénaturantes, est effectuée en présence de SDS (3%) et de 2-mercaptoéthanol (1%) sur des gels d'acrylamide à 10% (bis-acrylamide 0,8% ou 0,4%) ou à 12,5% (bis-acrylamide 0,8%) selon la méthode décrite par Laemmli (1970).

Le SDS, en solubilisant les protéines (1,4 g de SDS par gramme de protéines) et en leur conférant une charge négative identique, permet la séparation des protéines uniquement sur la base de leur poids moléculaire. Leur vitesse de migration sera donc fonction de la taille des protéines et de la taille des mailles du gel. Le 2-mercaptoéthanol est un agent réducteur des ponts disulfures et permet de mettre en évidence les différentes sous-unités d'une protéine.

Cette méthode permet donc de déterminer la masse moléculaire de protéines inconnues en comparant leur déplacement à celui de protéines connues (marqueurs). Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont : la phosphorylase b (94 kDa), le sérum albumine bovine (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'inhibiteur trypsique du soja (20 kDa) et l' $\alpha$ -lactalbumine (14 kDa). La masse moléculaire est estimée à partir d'une courbe d'étallonnage **Figure 24**.

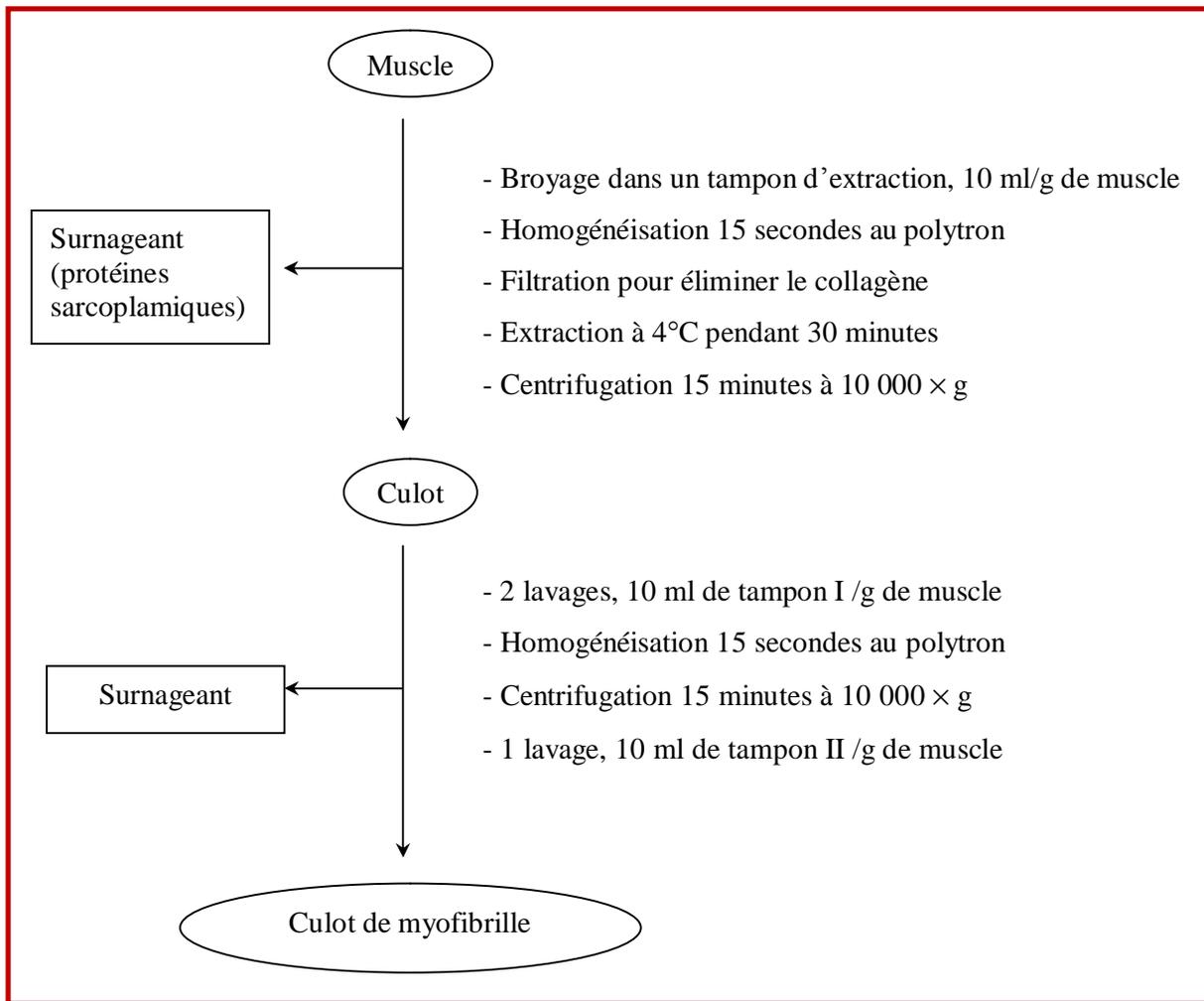
La séparation des protéines est réalisée à 100 volts pendant environ 2h dans un tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, 2-mercaptoéthanol 0,05%, pH 8,3.

#### - Coloration au bleu de Coomassie R-250

Après migration, les protéines sont fixées dans une solution d'éthanol 30%, acide acétique 5%, puis colorées dans la même solution contenant 0,12% de bleu de Coomassie R-250. Le gel est ensuite décoloré avec la même solution que celle ayant servi à la fixation des protéines. La méthode de coloration des protéines utilisées au bleu de Coomassie a été choisie car la quantité de protéines était suffisamment importante.

### 4. SPECTROMETRIE DE MASSE

Cette analyse consiste en la mesure des masses d'un mélange peptidique obtenu par digestion enzymatique d'une protéine inconnue et son identification par des outils informatiques reliés aux bases de données.



**Figure 23.** Schéma d'extraction des myofibrilles

**Tampon d'extraction (solution de Ringer) :** pH 6.5

NaCl	150 mM
KCl	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
EDTA	4 mM

**Tampon I :** pH 6.5

KCl	50 mM
β Mercaptoéthanol	5 mM
EDTA	1 mM

**Tampon II :** pH 6.5

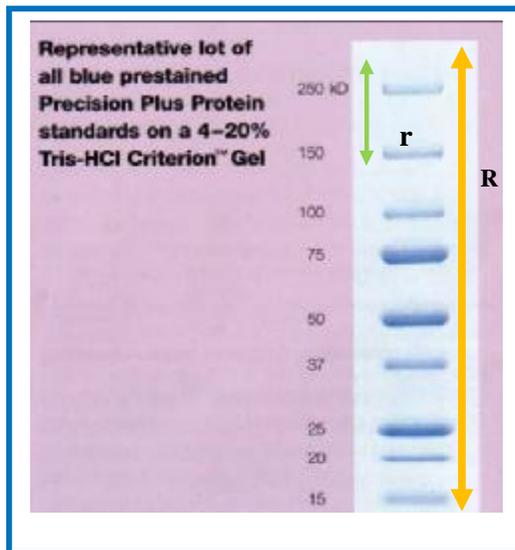
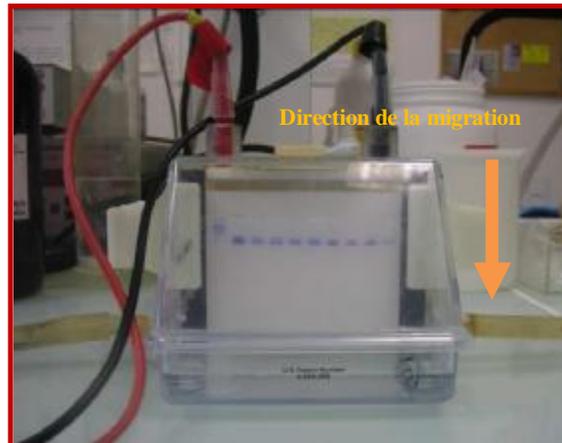
KCl	50 mM
β Mercaptoéthanol	5 mM

## L’empreinte peptidique massive par MALDI-TOF

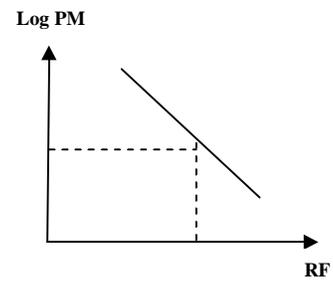
**Principe de la méthode :** Le principe de cette technique se résume en deux étapes. La première repose sur l’ionisation des peptides de digestion des protéines à étudier (les bandes protéiques à identifier sont prélevées sur un gel d’électrophorèse coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d’argent). Elles sont décolorées et déshydratées. La protéine est ensuite hydrolysée en peptides par la trypsine. Le mélange peptidique obtenu est déposé sur une cible en présence de matrice puis il est analysé par MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) - TOF (Time of Flight). C’est une technique d’ionisation dite douce puisque elle génère des ions moléculaires relativement stables. La deuxième étape consiste en la mesure du temps de vol (de l’ordre des nanosecondes) des ions formés dans un tube de vol dans lequel est réalisé un vide poussé (10<sup>-7</sup> millibare). Le temps de vol est déduit de l’équation générale  $EC = \frac{1}{2} mv^2$  est égal à  $t_2 = (m/q) \times A$  (A=terme constant fonction de la différence de potentiel appliquée lors de la mesure et de la distance entre la cible et le détecteur). Cette méthode permet d’analyser une large gamme de masse (0,5 à 300 kDa), l’acquisition des données est rapide.

L’identification des protéines. L’identification se fait par interrogation des moteurs de recherche (ex : ProFound, MS-FIT) à partir des masses des peptides obtenus et sélectionnés et des critères à renseigner : la banque de donnée à interroger, la famille, le genre, l’espèce à partir desquels la protéine est isolée, toutefois la recherche sans renseigner ce critère est plus objective, l’enzyme de digestion, les modifications liées aux traitements de la protéine, la tolérance vis-à-vis des masses des peptides mesurées par rapport aux masses théoriques, une valeur de 25 ppm est généralement choisie, le type de ions détectés.

Ces moteurs de recherche comparent le spectre de masse aux spectres de masse virtuels des protéines dont le gène est caractérisé et qui sont rassemblées dans des banques de données spécialisées (ex : SWISS-PROT). Cette comparaison est associée à un score fondé sur le nombre de fragments protéolytiques obtenus dont les masses peuvent correspondre à celles des fragments protéolytiques des banques de données, et par la précision avec laquelle les masses sont déterminées. Les meilleurs scores correspondent aux comparaisons les plus fiables.



$\text{Log (MM) = mobilité relative (r/R) = RF}$



**Figure 24.** Principe de la séparation des protéines par l'électrophorèse (SDS PAGE)



## 5. Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTA 2008 (INRA de Theix)

D'une manière générale, les données chiffrées sont présentées dans ce travail comme la moyenne  $\pm$  écart-type. Quand il s'agit de la moyenne des moyennes, les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur type.

- **Le coefficient de variation (CV)** est calculé selon la formule :

$$CV = (\text{écart-type} / \text{moyenne} \times 100)$$

- **La corrélation** entre la mesure instrumentale et l'appréciation sensorielle de la tendreté de la viande est calculée suivant le test de tendance générale utilisant le coefficient de corrélation des rangs de Spearman.(ROUQUETTE et coll. 1985).
- L'évolution des paramètres suivis en cinétique (pH, osmolarité, rétention d'eau et quantité de protéines myofibrillaires) a été caractérisée à partir de la courbe obtenue en fonction du temps post mortem (**Figure 25**). Les courbes sont ajustées sur le modèle mono moléculaire pour déterminer la vitesse d'évolution des différents paramètres mesurés, la valeur ultime et l'amplitude d'évolution des paramètres suivis en cinétique (Dransfield 1994 ; Zamora et al ; 1996).

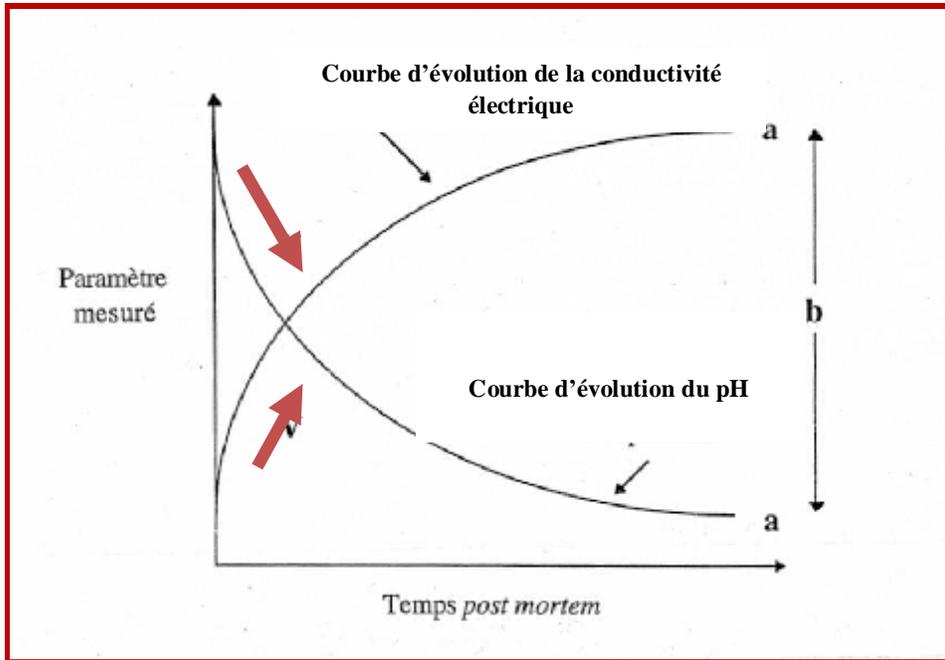
Le modèle monomoléculaire est non linéaire (NEWTON RAPHSON algorithme) dont l'équation est

$$Y = a - b \times \exp(-k X)$$

a : la valeur ultime du paramètre  
b : l'amplitude d'évolution du paramètre  
k : constante de vitesse  
Y : les différents paramètres étudiés  
X : le temps post mortem

- **Analyse de variance**

L'analyse de variance est une méthode statistique qui permet de tester l'hypothèse d'homogénéité d'un ensemble de moyennes. Réaliser une analyse de variance consiste à tester si les effets des traitements sont identiques. Des analyses de variance ont été réalisées, afin de



**Figure 25.** Détermination de la valeur finale, la vitesse et l'amplitude d'évolution des paramètres suivis en cinétique

déterminer si l'influence du facteur animal et du facteur type de muscle ainsi que l'interaction de ces deux facteurs, est significative ou non sur les valeurs des variables mesurées.

- **L'analyse en composantes principales (ACP)**

Cette analyse statistique a été utilisée dans notre étude lors de la caractérisation de la viande d'agneau. Le but de l'analyse en composante principale (ACP) est de représenter, sans les déformer, les informations fournies par une série de variables mesurées. A partir de combinaisons linéaires, les variables initiales sont transformées en variables indépendantes, ou composantes principales (axe), parmi lesquelles un nombre restreint est choisi. Le but est de chercher un sous-espace ayant un petit nombre de dimensions dans lequel les individus puissent être représentés sans trop déformer les distances initiales entre les points.

La stratégie consiste à choisir la droite passant par le centre de gravité des points représentant les individus et pour laquelle la somme des carrés des distances entre les points projetés est maximale, c'est-à-dire pour que les individus soient les plus dispersés possible. Cette droite forme l'axe principal. La méthode se poursuit en déterminant un deuxième axe qui vérifie la même propriété avec la contrainte d'être perpendiculaire au premier : on détermine ainsi un plan. La stratégie continue de la même manière jusqu'à ce que la part de variance expliquée soit suffisante, compte tenu du nombre des dimensions initiales de l'espèce des individus : on obtient ainsi un espace de 3 dimensions, puis de 4,...

Les axes obtenus sont interprétés par l'étude des corrélations entre les variables mesurées et les axes principaux.

- **L'analyse factorielle discriminante (AFD)**

L'analyse factorielle discriminante (AFD) est une méthode qui permet de comparer des groupes (nombre de groupe  $\geq 2$ ) à l'aide de plusieurs variables. Chaque axe est représenté par une ou plusieurs variables. Cette méthode se confond, au moins partiellement, avec l'analyse de variance à un facteur. Elle est également voisine de l'analyse en composantes principales.

Les groupes peuvent contenir un nombre différent d'individus :  $n_1$  pour le premier,  $n_2$  pour le second, ...  $n_G$  pour le dernier. Il y a donc un total  $N$  ( $N = n_1 + n_2 + \dots + n_G$ ) d'individus analysés. L'analyse en composantes principales ne prend pas en compte cette information :

elle traite les N individus sans aucune distinction à priori. L'analyse factorielle discriminante tient compte de cette information supplémentaire dans un double objectif :

- Objectif de discrimination : c'est-à-dire de séparation des groupes ;
- Objectif de classement : c'est-à-dire d'affectation d'individus à l'un des groupes.

Cette affectation se fera au groupe dont l'individu est plus voisin. Les individus peuvent être ceux qui ont servi à faire l'analyse et on pourra donc construire un tableau d'appartenance des N individus. C'est une façon de s'assurer du bien fondé de l'existence des groupes ; des individus supplémentaires peuvent aussi être classés dans un des groupes en fonction de leur plus ou moins grande proximité.

---

## Chapitre 2. MISE EN PLACE DU PROCESSUS D' APOPTOSE JUSTE APRES LA MORT DE L' ANIMAL

### 1. Matériel biologique

#### 1.1. Animaux :

Tout cette partie est réalisé sur du rat de race Wistar de 10 à 12 semaines. Ces animaux proviennent de l'animalerie du centre de l'INRA de Theix.

Nous avons utilisé le muscle de rat comme modèle pour la mise en évidence de l'apoptose, car la réalisation du prélèvement *ante mortem* et du deuxième prélèvement peu de minutes après la saigné de l'animal est plus pratique sur le rat par rapport aux autres espèces ovin ou bovine.

#### 1.2. Muscle :

En fonction des expériences, différents types de muscle ont été prélevés. Pour la recherche de la fragmentation d'ADN et la recherche des marqueurs de la voie apoptotique nous avons utilisé le muscle *Longissimus dorsi*. Tandis que pour la mise en évidence de l'inversion de polarité de la membrane cellulaire nous avons utilisé deux muscle de la cuise *le Gastrocnemius* et le *Plantaris*. Concernant les temps de prélèvement ainsi que le traitement des muscles, ils seront expliqués en fonction du point à vérifier

## 2. RECHERCHE DE MARQUEUR DE LA VOIE APOPTOTIQUE PAR WESTERN BLOT

### 2.1. Prélèvement et traitement du muscle :

Le premier prélèvement *ante mortem* a été fait sur un rat anesthésié à l'aide de l'isoflurane, et un morceau d'environ un gramme est prélevé a partir du muscle *longissimus dorsi*. Après abattage de l'animal par décapitation et éviscération, nous procédons au 1<sup>er</sup> prélèvement juste après la saignée (T0). La carcasse est ensuite enveloppée dans un sac congélation imperméable et plongée dans un bain marie à 12°C pendant 24h puis transférée à 4°C où des prélèvements en cinétique à différents temps post mortem sont effectués (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 48, 72.h). Le muscle *Longissimus* est dégagé au fur et à mesure des prélèvements pour éviter le dessèchement.

Les prélèvements ont été utilisés pour la mesure du pH et pour la préparation des extraits de muscle de rat destinés à l'analyse par Western Blot.

## 2.2. Préparation des extraits du muscle de rat

Un gramme de muscle est mélangé avec quatre volume du tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, KCl Chlorure de potassium, 150 mM, et EDTA 4mM, pH7,6) puis broyé au polytron 10 a 15s. Une première centrifugation est réalisée à 1000 g pendant 5 min, puis une seconde à 2000 g pendant 30 min. Le surnageant est récupéré puis centrifugé de nouveau à 20000 g pendant 30 min. On obtient deux fractions : un culot et un surnageant (**Figure 26**).

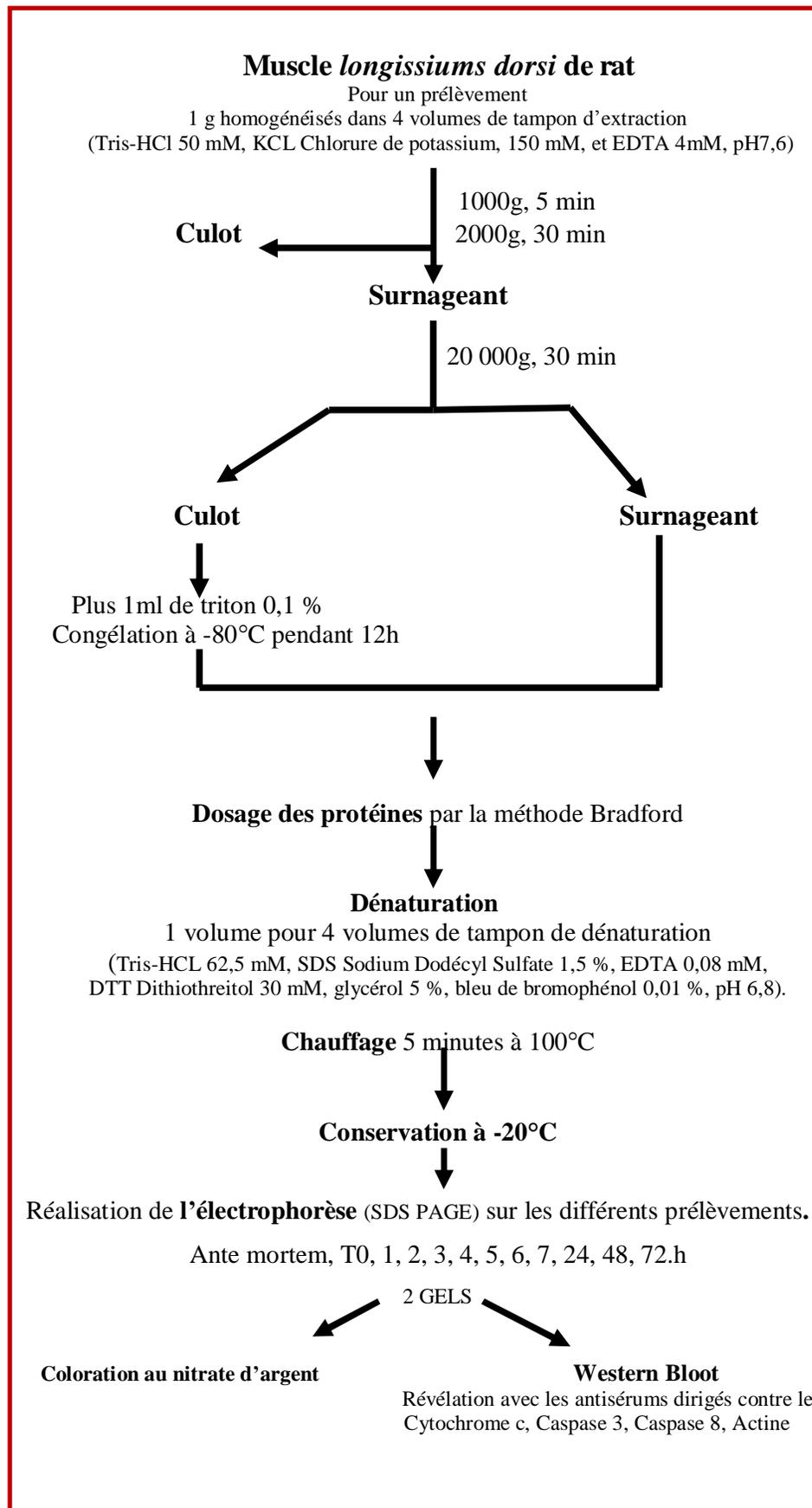
Le surnageant est dénaturé directement par l'addition de 160  $\mu$ L d'échantillon à analyser avec 40  $\mu$ L de tampon dénaturant composé de Tris-HCL 62,5 mM, SDS Sodium Dodécyl Sulfate 1,5 %, EDTA 0,08 mM, DTT Dithiothreitol 30 mM, glycérol 5 %, bleu de bromophénol 0,01 %, le tout ajusté a pH 6,8. Les échantillons sont ensuite portés à ébullition pendant 5 min. Les échantillons sont conservés à une température de -20°C.

Pour le culot 1 ml de triton est ajouté au culot, puis congelé à -80°C afin de faire éclater les mitochondries. Après congélation pendant une nuit, les extraits des culots sont dénaturés de la même manière que les surnageant

## 2.2. Dosage des protéines par la méthode Bradford

Le dosage des protéines selon Bradford est une méthode colorimétrique utilisant comme colorant le bleu de Coomassie G 250 (réactif Bio-rad : acide phosphorique et méthanol). Ce réactif est rouge / brun à l'état libre et quand il est lié aux protéines, il prend une teinte bleue. Il possède donc un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (595 nm) qui rend donc le dosage protéique très sensible. L'intensité de la coloration est donc proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. On mesure la DO à 595 nm au spectrophotomètre (Beckman).

La solution mère étalon est établie à partir d'immunoglobulines de lapin a une concentration de 1,33 g/L (conservation au congélateur à - 20°C). La gamme d'étalonnage d'Ig G est préparée dans des tubes à hémolyse à des concentrations de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 et 1.33 mg/mL. Ensuite 1 mL de réactif Bio-rad (Kit Bio-rad Protein Assay) est ajouté à 4 mL d'eau ultrapure dans chaque tube. Les tubes sont incubés 20 min. à l'obscurité et l'absorbance est lue à 595 nm contre l'eau ultrapure. La courbe d'étalonnage est tracée sur



**Figure 26.** Préparation des l'extraits a partir du muscle *longissimus Dorci* de Rat

tableur Excel, les absorbances des essais sont reportés sur la droite et le calcul de la concentration des protéines des essais est réalisé.

### **2.3. Electrophorèse et Western Blot**

Le Western Blot est l'analyse de détection immunochimique par excellence. Cette technique nous a permis de détecter dans les fractions séparées nos protéines d'intérêt.

Pour la réalisation de cette technique nous avons besoin de séparer nos protéines selon leur poids moléculaire à l'aide d'une électrophorèse unidimensionnel en milieu dénaturant.

Nous avons également établie des dosages de protéines sur tout les surnagent et les culots afin d'avoir la même quantité de protéine dans chaque puits. Le dosage des protéines totales est fait par la méthode Bradford

Des colorations de nitrate d'argent ont été faites sur le double des gels qui ont servie pour les Western Blot afin de vérifier la migration et la bonne séparation des protéines.

#### **2.3.1. Réalisation de l'électrophorèse.**

Les gels d'acrylamides sont préparés généralement à 12 % de Resolving (séparation) et Stacking à 8 % (concentration). Les dépôts sont réalisés dans la cuve à électrophorèse avec le tampon de migration (composé de Tris 0,025 M, Glycine 0,192 M, SDS 0,1 %, MCE 0,05 %, pH = 8,3), Sur chaque gel, on dépose également une solution contenant des marqueurs pré-marqués de masses moléculaires (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15) de chez BIO-RAD 161-0373. Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode. La structure primaire des protéines permet leur migration à travers le gel acrylamide. Elles vont donc être séparées suivant leurs poids moléculaires : les protéines de fortes tailles auront des difficultés à traverser les « mailles » du gel acrylamide. La migration est de 10 min. à 80V puis 1h à 130V (**Figure24**).

#### **2.3.2. Coloration au nitrate d'argent.**

La coloration au nitrate d'argent permet d'observer les protéines totales obtenues après les différentes étapes chromatographiques. Le gel après électrophorèse est démoulé, le stacking est découpé puis le gel est plongé 2 fois 15 min. dans le tampon de fixation (acide acétique 10 %, éthanol 40 %, eau 50 %). Le gel d'acrylamide est ensuite immergé 30 min.

dans le tampon de sensibilisation (sodium acétate 6,8 %, éthanol 30 %, eau 63 % + ajout extemporanément sodium thiosulfate 0,2 %). Trois lavages de 5 min. en eau ultrapure sont réalisés. La coloration au nitrate d'argent (0,25 %) se fait pendant 20 min. à l'abri de la lumière et la solution est préparée au dernier moment. Deux lavages de 1 min. en eau ultrapure sont effectués. Le gel d'acrylamide est ensuite plongé dans le tampon de développement (sodium carbonate 2,5 %, formaldéhyde 0,04 %) jusqu'à obtention de la coloration désirée. Enfin, le gel est mis 10 min. dans le tampon STOP (EDTA 1,46 %) qui permet d'arrêter la réaction. À la fin, 3 lavages de 5 min. en eau ultrapure sont réalisés. On peut ainsi observer toutes les protéines contenues dans les fractions à des tailles différentes.

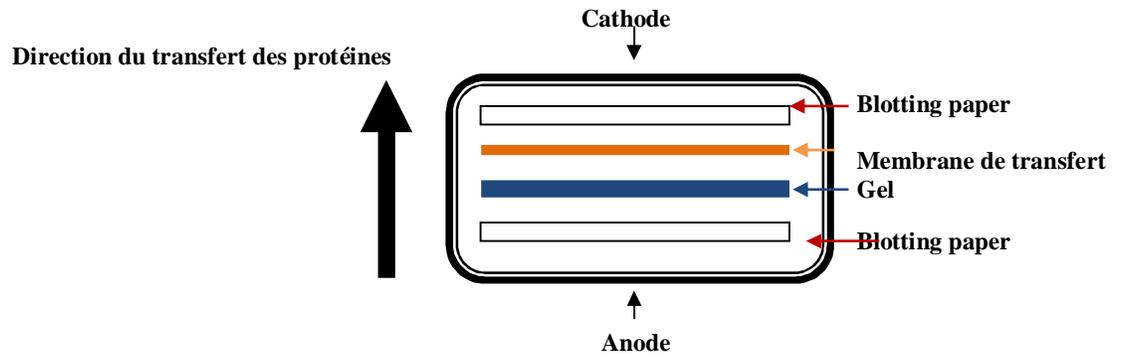
### 2.3.3. Western Blot.

Les échantillons sont d'abord soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (en présence de SDS) sur un gel de polyacrylamide à 12% dans les conditions décrites ci-dessus. L'échelle de masse moléculaire utilisée est différente, puisqu'elle est colorée afin d'être visualisée sur une membrane après transfert (marqueurs Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). Après la migration, le gel est rincé dans le tampon de transfert contenant du Tris 48 mM, glycine 39 mM, méthanol 20%, pH 8,7, puis les protéines sont transférées sur une membrane de transfère immobilon PVDF Sigma P2563. Cette dernière est plongée 5 min. dans l'éthanol pure puis 5 min. dans le tampon de transfert.

Le sandwich de transfert est réalisé : un blotting paper de chez Amersham 80-6205-40 (humidifié avec du tampon de transfert) est déposé dans la cuve à transfert puis le gel et la membrane sont déposés dessus (la membrane PVDF est sur le gel acrylamide). Un autre blotting paper est déposé par-dessus pour finir le sandwich de transfert. Le transfert est réalisé pendant 30 min. à 10 V par membrane (6 x 9 cm) (**Figure27**).

À la fin du transfert, la membrane est saturée dans le tampon de saturation (PBS 1X + 10 % lait écrémé + Tween 20 à 0,1 %) pendant 1h à température ambiante. La membrane est lavée 2 fois 5 min. avec du tampon de lavage/dilution (PBS 1X, Tween 0,1 %, lait 1 %).

Après saturation des sites non spécifiques, la membrane est ensuite incubée avec le premier anticorps dilué au 1/300ème pour la caspase 3, 8 et le cytochrome C dans du PBS contenant 1% de lait écrémé pendant 1h à température ambiante sous agitation douce.



**Figure 27.** Schéma du sandwich de transfert pour le Westen Blot

Lavage de la membrane 4 fois 5 min. avec le tampon PBS contenant 1% de lait écrémé, est incubée avec le second anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la phosphatase alcaline) dilué au 1/2000<sup>ème</sup> dans du PBS contenant 1% de lait écrémé pendant 1h sous agitation et à l'abri de la lumière.

Lavage de la membrane 4 fois 5 min. avec le tampon lavage/dilution puis 2 fois 2min. avec le tampon PBS 1X (sans lait ni Tween). La révélation des protéines est réalisée par passage sur la membrane de 1,5 mL d'un kit de chimioluminescence (Lumiphos Pierce) pendant 5 min. La membrane est égouttée puis placée entre 2 feuilles plastiques transparentes. La feuille est ensuite placée dans une cassette (protégeant de la lumière).

La suite de la révélation se fait en chambre noir (travail avec lumière rouge). La membrane est mise en contact d'un film photographique (Amersham Pharmacia) pendant un temps voulu (le temps d'exposition varie en fonction de l'intensité du signal).

Après, ce film est plongé dans un bac de révélateur photo (10 à 15 secondes) puis rincé brièvement dans un bac d'eau et enfin il est plongé dans un bac de fixateur pendant 30 secondes.

## **2.4. Préparation des anticorps polyclonaux**

Les antisérums dirigés contre la caspase 3 et 8 ainsi que le cytochrome c ont été obtenus au laboratoire selon les protocoles décrits ci-dessous.

### **2.4.1. Préparation des anticorps polyclonaux dirigés contre la Caspase 3 et la Caspase 8**

Les anticorps anti-Caspase 3 et 8 ont été obtenus à partir de peptides de synthèse, le choix de la séquence peptidique a été effectué à partir d'une séquence humaine dans les banques de données existantes. Ces peptides ont été injectés à des lapins afin de produire des anticorps reconnaissant uniquement les protéines ciblées. Ces séquences correspondent à des régions sur les protéines n'ayant aucune homologie de séquences avec d'autres protéines. Pour les différentes protéines, les séquences sélectionnées sont les suivantes :

La Caspase3s KYVDAANLRETFMGLKYQK

La B Caspase 3 : KYFMHILTRVNRKVATEYK

La Caspase8s : KYDDCTANEIHEILEGYQSK

La B Caspase 8 : KILTIILTEVNYEVSNK

- **Fixation du peptide sur l'hémocyanine (copolymérisation).**

Le couplage consiste dans un premier temps à dissoudre 5 mg de peptide dans 500\*1 de 2,2,2-trifluoroéthanol (sigmat-8132), puis à rajouter 4 ml d'eau distillée. D'in autre côté une solution de (5 ml) d'hémocyanine (Sigma H-1757) à 2 mg/ml est préparée dans du tampon phosphate de sodium à 0.2M pH7. Les deux solutions sont mélangées volume à volume et le mélange laissé toute la nuit à température ambiante toujours sous agitation douce (agitateur à mouvement rotatif) la solution est ensuite dialysée contre le même tampon que ci-dessus et aliquotée en fraction de 2ml dans des cupules qui seront stockées à -20°C.

- **Injection de peptides.**

L'immunisation consiste à injecter 200µg (400µl) de peptide couplé à l'hémocyanine par lapin en émulsion dans de l'adjuvant complet de Freund. Il s'agit de faire une émulsion épaisse en mélangeant 400µl de peptide avec 400µl d'eau distillée et d'injecter le tout dans 800µl d'adjuvant de Freund. Cet adjuvant permet d'augmenter la réponse immunitaire en créant une inflammation locale plus importante. L'injection intradermique de l'émulsion se réalise en de multiples points sur le dos de l'animal. Quatre rappels avec l'adjuvant incomplet ont lieu à deux semaines d'intervalle. Le sang est prélevé par incision de l'oreille de l'animal. Les antisérums sont obtenus après coagulation et centrifugation du sang prélevé après le dernier rappel (**Figure 28**).

Les sérums sont ensuite analysés quant à la réactivité des anticorps par immunodiffusion double selon la méthode Ouchterlony 1948.

- **Caractérisation par immunodiffusion double (Ouchterlony, 1948)**

La gélose est préparée en dissolvant 12 g d'agar noble dans un litre de tampon de Mayer (NaCl 150 mM, diéthyl-5,5-barbiturate sodique 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM, azide de sodium 0,1%, pH 7,3). 4 ml de ce milieu sont coulés dans une boîte de Pétri de 5,3 cm de diamètre, mis à refroidir à température ambiante, puis à 4°C. Après solidification de la gélose, des puits périphériques à équidistance d'un puits central sont percés à l'emporte-pièce. Les sérums sont dilués dans le tampon de Mayer. Dans le puits central 15 µl de la solution de peptide qui a servie à immuniser les lapins est déposés, tandis que dans les puits



**Figure28. Etape d'injection des peptides**

L'injection intradermique de l'émulsion se réalise en de multiples points sur le dos de l'animal

extérieurs 15 µl de chacun de 3 sérums à trois dilutions différentes (pur, au 1/3 et au 1/9<sup>e</sup>) sont déposés. La diffusion s'effectue en chambre humide à 37°C pendant 24 heures (**Figure19**).

#### 2.4.2. Production d'anticorps contre le cytochrome C

La production d'anticorps polyclonaux de lapin a été réalisée en utilisant le cytochrome C commercial comme antigène (Sigma, C2037 from bovine heart). Ce dernier étant de faible masse moléculaire (12300 Da), il a fallu le coupler à une molécule, l'hémocyanine, pour le rendre plus immunogène. La préparation de la copolymérisation est effectuée suivant le protocole déjà décrit pour la caspase 3 et 8.

L'immunisation c'est fait sur trois lapins différents nommés «dos», «tête» et «cou». Ces trois animaux ont été immunisés car la réponse à l'antigène varie d'un animal à l'autre. Cinq rappels ont été fait avec un écart de deux semaines environ.

Des prélèvements de sang sont réalisés la semaine suivante afin de tester la réactivité du sérum par Western Blot sur divers échantillons pour confirmer la présence d'anticorps. Les échantillons analysés correspondent à 10 g de muscle (collier et épaule) d'une génisse de boucherie. Une extraction a été réalisée comme pour les extraits de rat (**Figure26**). Les fractions culot et surnageant ont donc été analysées en Western Blot et en parallèle révélées par une coloration au nitrate d'argent. Ainsi que, sur un échantillon de cytochrome C de commerce ainsi que sur des extraits de muscle de bovin traité de la même manière que la préparation des extraite de muscle de rat (voir la page 66).

### 3. Mesure du pH

Pour la mesure du pH, 1g de muscle sont préalablement broyés à la moulinette et homogénéisés au polytron 9 volumes d'acide iodoacétique, 5 mM. L'acide iodoacétique n'a pas de pouvoir tampon, donc le pH mesuré est égal au pH réel. De plus, il bloque l'activité des enzymes glycolytiques qui peuvent influencer la valeur du pH, notamment *ante rigor* (La mesure est réalisée sur l'homogénat ainsi obtenu à l'aide d'un pHmètre de paillasse à microprocesseur de type WTW pH meter (Amilabo, Chassieu, France) équipé d'une électrode combinée en verre de même marque.

#### 4. MISE EN EVIDENCE DU RETRECISSEMENTS DES CELLULES MUSCULAIRE

Les muscles *Gastrocnemius* et le *Plantaris* sont prélevés a 1h et 24 H post mortem partir de la cuise de rat Les morceau de muscle sont immergés dans une solution de fixation (paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,1%, tampon phosphate de sodium 0,1M, pH 7,4) pendant 45 min a température ambiante.

Les muscles sont ensuite rincés trois fois dans du PBS (Phosphate Buffer Saline :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 8 mM, NaCl à 137 mM, KCL à 2,7 mM, pH 7,4) pendant 5 minutes. Puis incubés avec de sucrose à 30% préparer avec du tampon phosphate jusqu'à équilibre.

Les morceaux de muscle et congelé in situ à -20. Des coupes transversales de 10 $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome Reichert Frigocut 2800 (Leika, Heidelberg, Allemagne). L'observation des coupes est faite sans ajout de milieu de montage avec un microscope optique d'Axioplan È Zeiss (Zeiss, Lyon, France).

#### 5. MISE EN EVIDENCE DE L'INVERSION DE LA POLARITE DE LA MEMBRANE CELLULAIRE

La révélation de l'inversion de la polarité au niveau de la membrane cellulaire lors de l'apoptose est basée sur une détection par immunocytohimique par l'annexine V.

L'annexine V (marquée à la Fluorescèin IsoThioCyanate) est une protéine présentant une très forte affinité pour la phosphatidylsérine, exposée sur le feuillet externe de la membrane des cellules apoptotiques. La présence de fluorescence dans l'espace extracellulaire est la preuve que ces phospholipides ont été transférés sur la face externe de la membrane. Les cellules mortes fluorescent en vert.

Nous avons jugé utile de faire un deuxième marquage à la laminine qui est une glycoprotéine de la membrane basale des cellules jouant un rôle dans l'attachement et la migration des cellules lors de l'embryogenèse. Cette protéines est révélé avec un anticorps secondaire marqué à la cyanine 3 fluorochrome.

##### 5.1. Marquage à l'annexine V :

Les muscles *Gastrocnemius* et le *Plantaris* sont prélevés a partir de la cuise dans l'heure qui suit la saigné de l'animal. Les muscle sont maintenue par des aiguilles sur du liège

est immergé dans une solution de fixation (paraformaldéhyde 1%, glutaraldéhyde 0,1%, sucrose 0,1M, tampon phosphate de sodium 0,1M, pH 7,2) pendant 15 min.

Les muscles sont ensuite rincés trois fois dans du PBS (Phosphate Buffer Saline :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 8 mM, NaCl à 137 mM, KCL à 2,7 mM, pH 7,4) pendant 5 min. Puis incubés avec de l'AnnexinV marqué au FITC (Sigma-Aldrich A9210, Saint-Quentin Fallavier, France) dilué au 1/150<sup>ème</sup> dans du tampon PBS (concentration finale de 1,8  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 24 h à 4°C avec une agitation douce. et à l'abri de la lumière.

La rat est conservé dans un bain marie entre 8 à 10 C pendant 7 h post mortem. Ensuite conservé à 4 °C jusqu'au le lendemain pour le prélèvement de 24 h post mortem. Les même muscle sont prélevé et traités de la même manière et dans des conditions semblable que le prélèvement 1 h post mortem

Les témoins sont effectués dans les même conditions en incubant un muscle de la cuise à 1h et un autre à 24 h post mortem dans une solution de PBS sans AnnexinV

Après les 24 h d'incubation avec l'AnnexinV les muscle sont rincés trois fois dans du PBS (Phosphate Buffer Saline :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 8 mM, NaCl à 13,7 mM, KCL à 2,7 mM, pH 7,4) pendant 5. Les muscle sont découpés en dés de 2 à 3 cm de coté, les morceaux du muscle sont fixés sur un moule de liège adapté à la taille de notre échantillon à l'aide d'une résine qui va durcir à la congélation (Tissutech chez Labonord). Cette résine étant fluide à température ambiante. Ensuite les échantillons sont congelé à -160°C dans de l'isopentane (Prolabo) refroidi dans de l'azote liquide pendant 1 à 2 min selon la grosseur de l'échantillon.

Des coupes transversales de 10 $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome Microm HM5M. Les coupes sont séchées à l'air libre mais à l'abri de la lumière. Ensuite fixées pendant 15 min avec une solution PBS contenant 2% de formol. Trois rinçages de 5 min avec du PBS, les lames sont égouttées. Des gouttes d'agent Aqueous Mounting Medium comme liquide de montage sont rajoutées entre lame et lamelle. On laisse sécher et on observe au microscope Nikon Labphot2 les observations sont faite à une a une longueur d'onde excitation  $\lambda_{\text{exc}}$  488 nm et a une longueur d'onde d'émission  $\lambda_{\text{emm}}$  530 nm. Les images sont visualisés à l'aide d'une caméra relié à un ordinateur le logiciel utiliser pour la capture des images est VISILOG. La présence ou l'absence de marquage étaient les seuls critères d'évaluation.

## 5.2. Le double marquage à la laminine

Le marquage à la laminine se fait directement sur des coupes transversales des muscles déjà marquées à l'annexinV FITC préparer de la même manière que pour le marquage à l'annexinV (voir page 72). Toutes les étapes de ce marquage sont faites à l'abri de la lumière pour éviter la perte du premier marquage à l'FITC.

Après séchage et fixation et rinçage des coupes, les sites non spécifiques sont saturés par une solution de PBS contenant 10% de sérum de chèvre (Sigma S2007) pendant 30 min. Après lavage, les coupes sont incubées en chambre humide avec le premier anticorps dirigé contre la laminine produit chez le lapin (Sigma L9393) dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans une solution de PBS pendant 1h à température ambiante. Trois rinçage de 10 min chacun sont ensuite effectués avec du PBS. Enfin le deuxième anticorps anti IgG de lapin marqué à la cyanine 3 (produit chez la chèvre Santacruz SC-58797) est utilisé à la dilution de 1/150<sup>ème</sup> l'incubation a lieu à température ambiante durant 1h. De nouveau il faut procéder à 3 lavages PBS pour éliminer les anticorps marqués non fixés. Des gouttes d'agent Aqueous Mounding Medium comme liquide de montage sont rajoutées entre lame et lamelle. On laisse sécher et on observe au microscope Nikon Labphot2. les observations sont faite à une a une longueur d'onde excitation  $\lambda_{exc}$  554 nm et a une longueur d'onde d'émission  $\lambda_{emm}$  568 nm Les images sont visualisés à l'aide d'une caméra relié à un ordinateur le logiciel utiliser pour la capture des images est VISILOG.

## 5. 3. Microscopie électronique

Pour l'étude de L'ultrastructure du muscle. Les coupes ont été faites sur le muscle *longissimus* de rat. Les coupes ont été traitées selon le protocole décrit par VignonX., Beaulaton J. Et Ouali A., 1989

## 6. .LA MISE EN EVIDENCE DE LA FRAGMENTATION D'ADN DANS LES CELLULE MUSCULAIRE

La Fragmentation de l'ADN a été suivie par immunohistochimie grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre ces fragments et disponible dans le commerce anti-ssDNA/APOSTAIN.

### 6. 1. Principe de la méthode :

Des coupes minces ont été préparées comme décrit ci-dessus et coloré en utilisant la méthode traditionnelle de Hematoxylin / érythrosine.

Le test présenté ici est basé sur la sensibilité accrue de l'ADN à la dénaturation thermique chez les cellules apoptotiques. Cette méthode permet la dénaturation de l'ADN par chauffage à 56 °C en présence de formamide, et son marquage par l'anticorps monoclonal (Mab F7-26) spécifique de l'ADN simple-brin (ADNsb).

Des coupes minces ont été préparées comme décrit ci-dessus (voir cf 5.1.) et coloré utilisant la méthode traditionnelle de Hematoxylin / érythrosine. L'ADN réduite en fragments a été indiquée en utilisant un anticorps monoclonal (apostain, AbCys SA, Paris) identifiant les fragments spécifiquement de l'ADN simple-brin caractérisant les cellules apoptotic. Ce marquage a été effectué conformément à la recommandation du fabricant.

### 6.2. Préparation des échantillons

Après anesthésie du rat avec du pentobarbital sodique 0,1ml/100g de rat in intra-péritonial. Le prélèvement d'un morceau de muscle *longissimus dorsi* sous anesthésie puis après saignée de l'animal, à différents temps *post mortem* (15, 30 min et 1, 2, 4, 7, 24 et 48h.). Le rat est conservé à température ambiante les 7 premières heures. Enlèvement de l'appareil digestif après le premier prélèvement après saignée. Dégagement du muscle au fur et à mesure des prélèvements pour éviter de dessèchement.

## Chapitre 3. INHIBITION DE CASPASES INITIATRICES ET EXECUTRICES PAR LES bovSERPINA3-1 ET A3-3

### 1. Titration et mesure de l'activité enzymatique

#### 1. 1. Préparation des enzymes

La trypsine se présente sous forme de poudre et est reprise dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 10 mM.

La caspase-3 et la 8 sont préparées dans un tampon HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0.1 %, Sucrose 10 % auquel est ajouté extemporanément du DTT 10 mM.

#### 1. 2. Titration des enzymes

##### 1. 2. 1. Titration de la solution de trypsine utilisée

La trypsine est titrée en utilisant du 4-nitrophényl-p-guanidinobenzoate (NPGB) selon la méthode décrite par Chase et Shaw (1970). Les sérine protéinases sont particulièrement faciles à doser car elle ont l'avantage de former, lors du processus catalytique, un intermédiaire qui est une acyl enzyme. Cet acyl enzyme est ensuite hydrolysée en acide et enzyme. Si cette hydrolyse est très lente, l'alcool libéré lors de la formation de l'acyl enzyme est équivalent au nombre de moles d'enzyme active que l'on peut déduire en mesurant l'absorbance de l'alcool chromogénique formé.



Le substrat de la trypsine utilisé est le p-NPGB (p-nitrophényl-p'Guanidinobenzoate HCL) (Sigma). Ce substrat est choisi préférentiellement car l'acyl-enzyme formée lors du processus catalytique est particulièrement stable. La poudre de p-NPGB est dissoute dans du diméthylformamide et la solution obtenue, pour être plus stable, est diluée dans 4 volumes d'acétonitrile (concentration finale 0,01 M). Le p-NPGB ainsi préparé peut être conservé plusieurs semaines à 4°C.

Dans une microcuve, 100µl d'une solution de trypsine, préparé 2mg/ml à l'aide d'un tampon Tris-HCL 50mM, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, pH 8, sont dilués avec 890 µl de tampon véronal, pH8,3, après mélange 10µl de la solution de p-NPGB sont ajoutés dans la microcuve. Le p-NPGB réagit avec la trypsine et alcool formé, le p-nitrophénol, donne à la solution une

couleur jaune visible dont l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 480nm à l'aide du spectrophotomètre Uvikon 860 (Kontron).

La mesure est réalisée contre une référence qui contient 100µl de tampon sans trypsine, 890 µl de tampon véronal et 10µl de substrat.

La molarité du p-nitrophénol produit peut être calculée selon la formule :

$$[\text{p-Nitrophénol}] = \text{DO} \times 6,025 \times 10^{-5} \times 10$$

Où DO représente la densité optique du p-nitrophénol libéré,  $6,025 \times 10^{-5}$  le coefficient d'extinction molaire du p-nitrophénol, et 10 le facteur de dilution de la trypsine. La molarité du p-nitrophénol produit permet de déduire la molarité de trypsine active

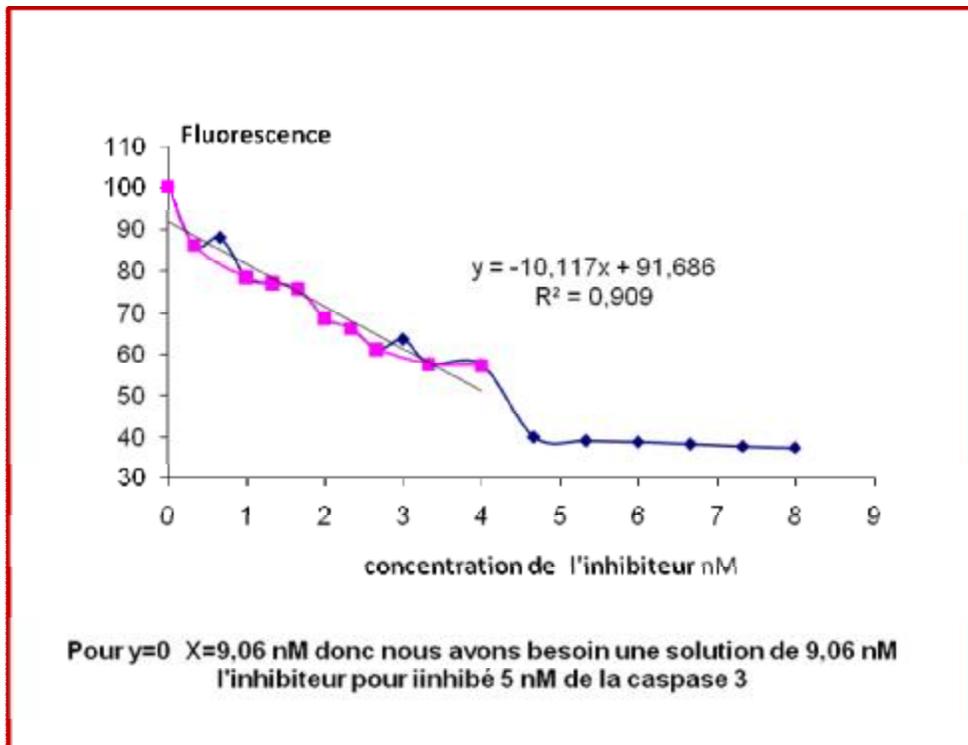
### 1. 2. 2. Titration de la caspase 3 et 8

La caspase 3 (EC 3.4.22.B9) provient de chez sigma est titrée avec l'inhibiteur irréversible Z-Asp-Glu-Val-Asp-chloromethylketone et la caspase 8 (EC 3.4.22.B12) provient de chez Sigma est titrée avec l'inhibiteur irréversible Z-Val-DL-Asp-fluoromethylketone, les inhibiteurs proviennent de chez Bachem.

Les caspases sont titrées selon la méthode de Stennicke et Salvesen (1999). Les caspases 3 et 8 sont repris dans un tampon HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1 %, sucrose 10 % auquel sont ajoutés 10 mM de DTT au moment de son utilisation.

La quantité (0,136 mg/ml) de la poudre de la caspase 8, diluée 8 fois, est utilisée à une concentration de  $5,66 \times 10^{-7}$  M. Une solution à 5 nM de l'enzyme sera titré par une gamme de dilution de l'inhibiteur irréversible Z-Val-DL-Asp-fluoromethylketone. Après une préincubation de 5 minutes à 25°C, 50 µL du substrat N-Acetyl-ASP-Glu-Val-Asp-NHmec à 100 µM est ajouté. La lecture de la fluorescence pendant 5 à 10 minutes à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 440 nm.

La concentration de la caspase 3 est de 0,29 mg/ml elle est diluée 10 fois avec tampon HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1 %, sucrose 10 % auquel sont ajoutés 10 mM de DTT au moment de son utilisation. Donc la molarité de la caspase 3 est de  $9,6 \times 10^{-7}$  M. Une solution de 5 nM de la caspase 3 est titré avec un gamme de dilution de



**Figure 29.** Exemple de titration de la caspase 3 par l'inhibiteur irréversible Z-Asp-Glu-Val-Asp-chloromethylketone

l'inhibiteur (Z-Asp-Glu-Val-Asp-chlorométhylketone) allant de 0 à 50  $\mu\text{M}$  le en estime Après une préincubation 5 minutes à 25°C , 50  $\mu\text{L}$  du substrat N-Acetyl-ASP-Glu-Val-Asp-NHmec 100  $\mu\text{M}$  est ajouté. la Lecture de la fluorescence pendant 5 à 10 minutes à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 440 nm.

Le calcul de la concentration de l'enzyme active dans notre solution est déterminé par la formule : **figure 29**

$$[E]_{\text{active}} = [I] (V_I/V_E) \text{ facteur de dilution}$$

Où  $[E]_{\text{active}}$  : concentration réelle de l'enzyme active (en nM)

$[I]$  concentration de l'inhibiteur (pour notre exemple nous avons 9,06 nM)

$V_I$  : volume de 20  $\mu\text{l}$  des différentes dilutions de l'inhibiteur

$V_E$  : volume de l'enzyme de 30  $\mu\text{L}$

La concentration moyenne des caspases après titration est de  $884,48 \pm 232,48$  nM

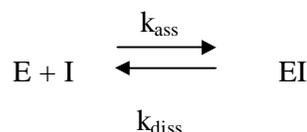
### 1. 3. Mesure des activités enzymatiques

L'activité des deux enzymes est mesurée en suivant l'hydrolyse d'un substrat synthétique fluorescent. La fluorescence du 7-amino-4-méthylcoumarin (AMC), libérée après hydrolyse du substrat de la trypsine ou de la caspase, est mesurée à une longueur d'onde d'émission de 440 nm après excitation à 360 nm.

### 2. Caractérisations des cinétiques de l'inhibiteur

L'inhibition d'une enzyme par un inhibiteur protéique endogène implique une interaction forte entre les deux protéines. Dans ce cas, l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme est élevée et la concentration de l'inhibiteur est fortement diminuée après la formation du complexe enzyme-inhibiteur. On distingue ainsi trois types d'inhibition : l'inhibition réversible, irréversible et temporaire.

*Inhibition réversible* : une inhibition réversible est caractérisée par un équilibre rapidement atteint entre l'inhibiteur et l'enzyme. La protéase E réagit avec l'inhibiteur I pour former un complexe EI selon la réaction :



$k_{\text{ass}}$  représente la constante d'association du complexe EI et  $k_{\text{diss}}$  est la constante de dissociation du complexe. La constante d'équilibre, dite constante d'inhibition est définie par ces deux constantes par la relation :

$$K_i = k_{\text{diss}} / k_{\text{ass}}$$

D'après Bieth (1980), ces constantes sont suffisantes pour expliquer le rôle physiologique de l'inhibiteur.

*Inhibition irréversible* : une inhibition irréversible a lieu dans le cas où le complexe enzyme-inhibiteur ne se dissocie pas dans des limites de temps raisonnables. La réaction s'écrit alors :



Cela peut-être dû au fait que soit l'inhibition est réversible mais la constante  $k_{\text{diss}}$  (constante de dissociation) est très faible, soit la formation du complexe s'accompagne d'une hydrolyse partielle de l'inhibiteur. Il devient alors inactif après la réaction.

*Inhibition temporaire* : un autre cas de figure peut se présenter lorsque l'enzyme se libère totalement du complexe sous forme active. Cette réaction conduit à l'hydrolyse partielle de l'inhibiteur ou relargage de l'enzyme. La libération des produits d'hydrolyse, plus ou moins rapide, constitue un élément clé dans la détermination de la valeur de la constante globale. C'est ce que l'on appelle l'inhibition temporaire qui est définie par la réaction :



### 2.1. Détermination de la constante de vitesse d'association $k_{\text{ass}}$

Lors d'une réaction réversible, la vitesse d'association est définie par l'équation :

$$v = -d[E] / dt = k_{\text{ass}} [E] [I] - k_{\text{diss}} [EI]$$

Par contre dans le cas d'une inhibition irréversible, la constante de dissociation  $k_{\text{diss}}$ , est particulièrement lente, et peut donc être négligée. L'équation devient alors :

$$v = -d[E] / d(t) = k_{\text{ass}} [E] [I]$$

Si la valeur de  $k_{\text{diss}}$  est suffisamment faible, l'équation peut être utilisée pour décrire une inhibition réversible, au moins pendant les premières étapes du processus d'inhibition.

Lorsque l'association enzyme-inhibiteur est suffisamment rapide, on peut déterminer la constante d'association en incubant des quantités équimolaires d'enzyme et d'inhibiteur.

Avec la trypsine, la méthode utilisée est celle décrite par Beatty *et al.* (1980) basée sur l'équation :

$$t_{0,5} = 0693/k_{\text{ass}} [I]$$

La représentation semi-logarithmique de  $v_i/v_o$  ( $v_o$  : vitesse de réaction en l'absence d'inhibiteur ou  $v_i$  : vitesse de réaction en présence d'inhibiteur) en fonction du  $\log(t)$  est une droite dont l'équation permet de déterminer  $t_{0,5}$  c'est-à-dire le temps nécessaire à l'inhibiteur pour réduire l'activité enzymatique de 50 %. Connaissant  $t_{0,5}$ , la constante d'association est alors calculée à partir de l'équation ci-dessus selon des conditions de pseudo-premier ordre.

En pratique, des concentrations équivalentes en trypsine et inhibiteur purifié (5 nM) sont préincubées dans le tampon Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8,0 dans un volume réactionnel final de 200  $\mu$ l pendant une durée allant de 0 à 10 minutes. Le substrat N-CBZ-Phe-Arg-NHMec est ensuite ajouté (50  $\mu$ l à 100  $\mu$ M) puis l'activité résiduelle est mesurée.

Dans le cas de la caspase-3, la constante d'association est déterminée par la méthode de courbes décrite par Zhou *et al.* (1997).

Une solution à 2 ou 5 nM de caspase-3 (dans un volume de 30  $\mu$ l) est incubée en présence de 50  $\mu$ l (à 100  $\mu$ M) de substrat. La mesure de la fluorescence est alors faite. Quand une vitesse constante est obtenue, une concentration d'inhibiteur (de 1 à 50 nM) est ajoutée au mélange et la fluorescence est mesurée pendant 20 minutes au minimum.

Pour chaque concentration d'inhibiteur, la constante de premier ordre  $k_{\text{obs}}$  est déterminée par l'équation :

$$\ln ([P]_{t+\Delta t} - [P]_t) = C - k_{\text{obs}}t$$

Où  $[P]_{t+\Delta t}$  est la concentration de produit au temps  $t + \Delta t$  de la réaction d'association et  $[P]_t$  est la concentration de produit au temps  $t$ .

La représentation graphique de la concentration en inhibiteur en fonction des différentes valeurs de  $k_{obs}$  obtenues permet d'obtenir une droite dont la pente est  $k'_{obs}$ .

La constante de vitesse de deuxième ordre ( $k_{ass}$ ) est alors déterminée par la relation suivante :

$$k_{ass} = (k'_{obs}/I)(1 + S/K_m)$$

## 2.2. Détermination de la stœchiométrie de l'interaction enzyme-inhibiteur (SI)

Parmi les inhibiteurs de sérine protéinases, les serpins ont la caractéristique de former un complexe irréversible (rapport 1:1) avec leurs protéines cibles. Cette propriété a été testée dans le cadre de ce travail.

La stœchiométrie d'inhibition (SI) est définie comme le rapport des moles d'inhibiteur requis pour inhiber une mole d'enzyme (Gettins, 2002).

La méthode pour déterminer la SI est réalisée par la titration de l'enzyme (Schechter et Plotnick, 2004). L'enzyme en concentration connue et constante  $[E_0]$  est incubée avec des concentrations croissantes d'inhibiteur  $[I_0]$ , après incubation, l'activité enzymatique résiduelle est mesurée (comme est indiqué dans le paragraphe 1.3). La diminution de l'activité enzymatique résiduelle observée doit être proportionnelle à la concentration croissante de l'inhibiteur. Les données sont extrapolées à l'activité zéro donc, cette valeur définit la quantité requise de moles d'inhibiteur pour inhiber une mole d'enzyme.

## 3. Préparation de peptides et analyse de séquences

Après l'électrophorèse en conditions dénaturantes et réductrices (coloration à Bleu de Coomassie), la bande du gel correspondant à l'inhibiteur a été coupée et partiellement déshydratée dans un SpeedVac. L'échantillon du gel a été alors soumis à l'hydrolyse par l'addition de 0,1  $\mu$ g de trypsine de porc (Sigma) dans 200  $\mu$ l du tampon Tris/HCl, pH 8,06, contenant 0,01% de Tween 20. Des peptides ont été extraits, fractionnés par HPLC sur une colonne DEAE-C18 (1 millimètre de diamètre) et élués avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 2-70% dans 0,1% de TFA (acide Trifluoroacétique). Ces peptides ont été alors soumis au séquençage N-terminal. L'analyse de séquence a été réalisée en utilisant le protocole d'Edman : la fonction NH<sub>2</sub> de l'acide aminé N-terminal fixe une molécule de

phénylthiocyanate (PITC), puis il y a clivage par l'acide trifluoroacétique. L'acide aminé alors sous sa forme Anilinothiozolinone (ATZ) est ensuite transféré dans une autre partie du séquenceur, où il subit une réaction d'isomérisation permettant la stabilisation de la molécule : C'est l'étape de conversion de la réaction d'Edman. L'acide aminé N-terminal est alors sous la forme PTH (PhénylThioHydantoïne), il est ensuite injecté sur une colonne phase reverse adaptée à un système H.P.L.C (l'analyseur d'acide aminé 120 A Applied Biosystems), où il est identifié en fonction du temps de rétention et quantifié grâce à sa hauteur de pic. Cette réaction récurrente a permis de déterminer à partir de 50 picomoles, l'enchaînement des 15 premiers acides aminés de la chaîne polypeptidique.

---

## CHAPITRE I : MATURATION DE LA VIANDE D'AGNEAU

### I. DEVELOPPEMENT D'OUTILS INDISPENSABLES

Avant de présenter les résultats et pour une meilleure compréhension de l'organisation de la présentation de ces derniers, rappelons ici les objectifs de ce travail de thèse. Le premier objectif était d'identifier les paramètres physico-chimiques et biochimiques potentiellement susceptibles de prédire la tendreté ultime de la viande d'agneau, mais nous avons été confrontés à plusieurs problèmes d'ordre technique. Ne disposant pas d'un certain nombre d'outils indispensables à la mise en place de ce travail, nous avons été amenés à développer des outils avec le matériel dont nous disposions ou qu'il était possible d'acquérir sur place. Cela concernait principalement l'estimation de la texture de la viande en cours de maturation et la mesure de l'osmolarité, mesure pour laquelle nous ne disposions pas d'osmomètre.

Quant au modèle animal, le choix étant limité, nous avons rapidement convenu de sélectionner l'agneau comme modèle. L'agneau fournit en effet une très grande proportion de la viande consommée en Algérie et cet animal de boucherie est d'un accès plus facile que d'autres espèces animales traditionnellement utilisées pour ce genre d'étude, comme le bovin. Par contre, pendant mes séjours successifs en France, le modèle utilisé était le bovin, viande facilement accessible à l'abattoir du centre INRA de Clermont-Theix et qui permettait l'obtention des échantillons dans l'heure qui suivait l'abattage.

Dans ce premier chapitre, nous développerons successivement les mises aux points réalisées pour estimer la texture à l'aide d'une méthode penetrométrique, puis celles relatives à la mise en place d'une méthode électrométrique pour estimer la pression osmotique du tissu musculaire.

#### 1. Estimation de la texture des viandes

L'étude de la texture, composante importante de la qualité et de l'acceptabilité des viandes, fait intervenir des connaissances pluridisciplinaires dans le domaine de la rhéologie et dans le domaine de l'analyse sensorielle. Les techniques rhéologiques cherchent à prédire les jugements émis par les dégustateurs. Cependant, la valeur explicative des résultats de l'analyse sensorielle par la rhéologie n'est pas totalement satisfaisante.

De nombreux outils et méthodes d'évaluation de l'état de maturation de la viande ont été décrits. Si certaines méthodes sont basées sur des mesures biochimiques (Ouali 1984 ; Yano et al., 1995), la majorité d'entre elles sont basées sur des méthodes mécaniques (cisaillement de carottes de viande ou compression de carottes de viande à l'état frais ou cuit selon les cas) (Lepetit and Culioli, 1992). C'est le cas de la méthode développée par Lepetit et al. (1996) et basée sur un test de compression à 20% de déformation d'un échantillon de viande fraîche, mesure qui permet d'estimer la résistance myofibrillaire de la viande et de pouvoir établir des comparaisons de l'état de maturation de muscles à taux de collagène variable. Cette mesure est en effet indépendante du taux de collagène dans le muscle considéré. Au centre INRA de Clermont-Ferrand-Theix, elle fait référence et est systématiquement utilisée dans toutes les études développées sur les facteurs de variation de la texture de la viande.

Ne disposant pas d'un tel appareil, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'une méthode pénétrométrique.

## **1.1. Evolution de la tendreté de la viande d'agneau**

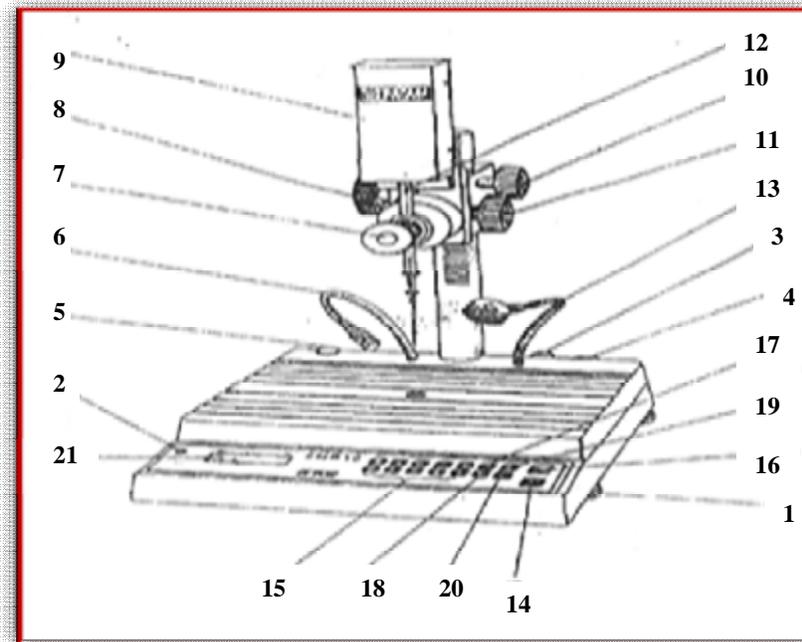
### **1.1.1. Matériel animal**

Cette expérimentation a porté sur un lot de 6 agneaux de race EL'TEL provenant d'une ferme de la région de FERDJIOUA et âgés de 6 à 18 mois. Le poids des carcasses variait entre 14 et 21 kg.

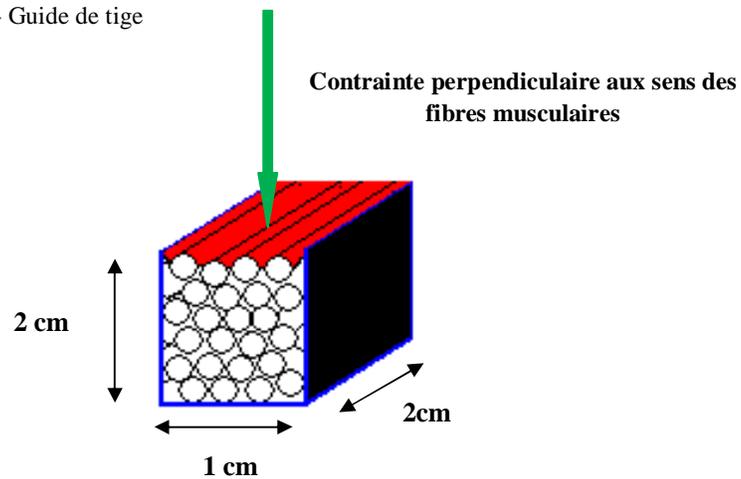
### **1.1.2. Estimation de la dureté par pénétrométrie**

Le pénétromètre est un instrument de mesure muni d'un corps pénétrant. En général une aiguille ou un cône, pénètre en chute libre dans une matière sous l'action de son propre poids, pendant un temps déterminé. Cette profondeur de pénétration mesurée en 1 / 10 mm ou unité de pénétration (1 UP = 0.1 mm) constitue alors une grandeur objective de la consistance de la substance analysée et permet donc une mesure de la tendreté (**Figure 30**)

Un échantillon de muscle frais rectangulaire (longueur = 2 cm, largeur = 1 cm, hauteur = 2 cm) est placé sur le support du pénétromètre. La direction des fibres musculaires de l'échantillon est parallèle à la surface du plan de la table et la contrainte est appliquée perpendiculairement aux fibres musculaires.



- |                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| 1- Pieds à vis            | 13- la loupe           |
| 2- Détecteur électrique   | 14- La touche RESET    |
| 3- Fusible                | 15- Bloc de mesure     |
| 4- Interrupteur principal | 16- La touche START    |
| 5- Bulle de niveau        | 17- La touche LIMIT    |
| 6- Dispositif d'éclairage | 18- La touche LIMIT    |
| 7- Bouton poussoir        | 19- La touche PEN(S)   |
| 8- Bouton de réglage      | 20- La touche PAUSE    |
| 9- Détecteur de course    | 21- Cadran d'affichage |
| 10- Bouton d'arrêt        |                        |
| 11- Molette micrométrique |                        |
| 12- Guide de tige         |                        |



**Figure 30.** Schéma du principe de la mesure de la dureté de la viande par pénétrométrie (pénétromètre PNR 10 PETROTEST)

La profondeur de pénétration maximale est affichée en millimètres après un temps de 5 secondes. Une valeur élevée de la profondeur de pénétration correspond à une viande très tendre. Une valeur faible indique que la viande est dure.

Comme nous l'avons déjà dit, la référence reste le jugement du consommateur. Pour valider cette méthode pénétrométrique, nous avons donc mis en place un jury de dégustation pour évaluer le tendreté de la viande provenant de ces mêmes animaux et se rapprocher ainsi du comportement du consommateur.

### 1.1.3. Appréciation de la tendreté par analyse sensorielle

Le test de notation avec échelle est choisi pour l'appréciation de la tendreté de la viande (Combes et al 2003). Ce test de notation permet de chiffrer l'amplitude des différences entre les échantillons de viande et ne demande pas un apprentissage important par le jury des dégustateurs.

Nous avons composé des jurys de 10 sujets (étudiants post gradués, fin de cycle de graduation et personnel du laboratoire) initiés à l'analyse sensorielle de par leur formation et donc considérés comme qualifiés à ce genre d'analyse. Les sujets malades ou étant sous le coup d'émotion sont exclus.

L'heure à laquelle se déroule les essais se situe entre 10 h et 11 h 30 minutes du matin.

Les morceaux de viande appariés à ceux ayant servi à la mesure instrumentale sont utilisés après cuisson à l'eau à 95°C. Ce mode de cuisson a été choisi afin d'assurer un régime thermique homogène à la surface et à l'intérieur de l'échantillon. Il permet également d'avoir une texture homogène en évitant la formation de croûte à la surface (Laroche 1983 ; Hernandez 1999). Nous avons gardé le même volume d'eau de 400 ml pour la cuisson pour tous les échantillons. Le temps de cuisson est de 30 minutes. La température atteinte au cœur du cube de viande est de 80°C. Les cubes de chaque muscle sont cuits séparément.

Quatre cubes de viande provenant des quatre muscles étudiés, sont présentés aux dégustateurs. Le jury attribue une note à l'échantillon selon une échelle de tendreté allant de 1 à 9. Chaque sujet dispose d'un formulaire de réponse (**Figure31**) comportant l'échelle établie suivante avec notes et qualificatifs.

Nom :

Date

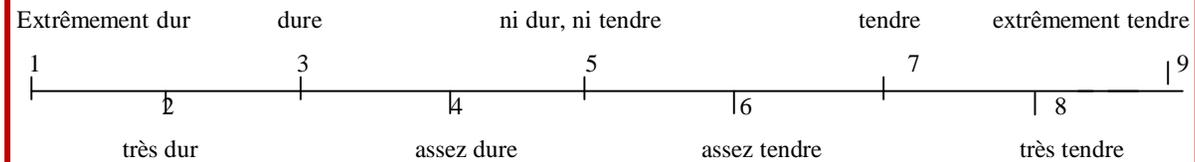
Prénom :

### Test de l'estimation du degré de tendreté de la viande

Vous avez devant vous quatre cubes de viande cuite à l'eau.

Mettez le code de chaque morceau (A, B, C et D), devant la réponse qui vous semble juste

Veillez rincer votre bouche entre chaque dégustation.



**Figure 31.** Spécimen de formulaire de réponse pour le test de notation

#### 1.1.4. Analyse des données

La corrélation entre la mesure instrumentale et l'appréciation sensorielle de la tendreté de la viande est calculée suivant le test de tendance générale utilisant le coefficient de corrélation des rangs de Spearman (ROUQUETTE et coll. 1985).

Pour l'application du test, nous avons transformé en notes toutes les mesures instrumentales selon une échelle de tendreté (**Tableau 6**)

Nous calculons ensuite le coefficient de corrélation des rangs de Spearman entre  $X_i$  (notes des mesures instrumentales transformées) et  $Y_i$  (notes de la mesure sensorielle) qui est donné par l'équation suivante :

$$r = 1 - 6 \sum d_i^2 / n (n^2 - 1)$$

$d_i$  : la différence des notes ( $Y_i - X_i$ )

$n$  : nombre de couple (mesure instrumentale – mesure sensorielle). Chaque mesure instrumentale ou sensorielle correspond à la moyenne obtenue à partir de 10 mesures différentes.

$r$  : coefficient de corrélation

La mise en évidence de corrélation entre variables expliquées et une ou plusieurs variables explicatives a été réalisée par le calcul des régressions linéaires simples et multiples (TOMMASSONE 1989).

Des analyses de variance ont été réalisées afin de déterminer l'influence du facteur « animal » et du facteur « type de muscle » ainsi que l'interaction entre ces deux facteurs.

### 1.2. Résultats et discussion

#### 1.2.1. Corrélation entre mesures instrumentales et mesures sensorielles

Le choix d'un lot de six animaux de race EL TEL d'âge et de poids différents a été délibérément recherché pour augmenter la diversité qualitative des viandes obtenues et plus particulièrement des niveaux de tendreté aussi larges que possible.

Le test de SPEARMAN, appliqué globalement à l'ensemble des mesures effectuées sans distinction entre les quatre muscles étudiés de la cuisse, a révélé une forte corrélation ( $r = 0.98$ ) entre les mesures instrumentales et les mesures sensorielles (**Tableau 7**). La mesure de la tendreté au pénétromètre peut donc être utilisée pour une première estimation

**Tableau 6.** Echelle de tendreté

Echelle	Profondeur de pénétration (mm)	Tendreté
1	[0 – 2.22]	Extrêmement dure
2	[2.23 – 4.45]	<b>Très dure</b>
3	[4.46 – 6.68]	<b>Dure</b>
4	[6.69 – 8.91]	<b>assez dure</b>
5	[8.92 – 11.14]	<b>ni dur, ni tendre</b>
6	[11.15 – 13.37]	<b>Assez tendre</b>
7	[13.38 – 15.6]	<b>Tendre</b>
8	[15.61 – 17.83]	<b>Très tendre</b>
9	[17.84 – 20.06]	<b>extrêmement tendre</b>

La limite de pénétration minimale est 0 mm, la limite de pénétration maximale est égale à 20 mm (mesure à partir de la chute libre du corps pénétrant d'une hauteur de 2 cm sans présence de contrainte).

**Tableau 7.** Résultats du test de SPEARMAN pour les différents muscles

Muscles	N	r	P
Globalement pour les quatre muscles	24	0.98	<0.01
SM	6	0.61	NS
ST	6	0.79	<0.01
BF	6	0.72	<0.05
RF	6	0.66	NS

N : nombre de couple (mesure instrumentale – mesure sensorielle). Chaque mesure instrumentale ou sensorielle correspond à la moyenne obtenue à partir de 10 mesures différentes.

r : coefficient de corrélation ; P : probabilité ; NS : non significative  $p < 0.05$

de la tendreté de la viande des divers muscles étudiés. Cependant, nous ne pouvons préjuger de la validité de la mesure instrumentale pour tous les muscles présents dans la cuisse. Afin de révéler l'existence de la relation entre ces deux mesures pour chaque muscle, nous avons appliqué le test de SPEARMAN sur chaque muscle à part.

L'analyse statistique à l'aide du test de Spearman montre que l'estimation de la tendreté par la mesure instrumentale est corrélée à la mesure sensorielle pour les muscles ST et BF. Mais, pour les muscles SM et RF, il n'y a pas de corrélation significative entre les deux méthodes de mesure (**Tableau 7**).

La faible corrélation entre mesure instrumentale et sensorielle pour les muscles SM et RF pourrait s'expliquer par le regroupement des données en moyenne dans l'analyse des données (N = 60). Le regroupement visant à minimiser les fluctuations a eu pour conséquence la réduction de la taille de l'échantillon à N = 6 et l'altération de la puissance du test de Spearman. D'autre part, le pénétromètre n'exerce qu'une seule force (la pénétration) intervenant dans la caractérisation de la tendreté. Or, les autres forces s'exerçant lors de la mastication (analyse sensorielle) ne sont pas mesurées par le pénétromètre. Ces forces comprennent la compression, le cisaillement, le tranchage et la torsion.

Une étude faite par Combes et *al.*, (2005) sur la viande de lapin a montré que la tendreté perçue par un jury lors de la dégustation de la cuisse, est corrélée avec les mesures de cisaillement effectuées sur le muscle Longissimus cru. Néanmoins il n'a pas été possible à l'issue de cette étude, de trouver des mesure physico-chimiques qui puissent prédire de manière fiable les caractéristiques sensorielles de la viande de lapin.

Voisey et Larmond (1977) ont noté qu'une personne moyenne mâche à la vitesse de 75 mastications par minute et ouvre ses mâchoires de 1cm, ce qui donne une vitesse de compression moyenne des aliments entre les dents de 150 cm / minute. On trouve environ 82 mastications par minute avec un coefficient de variation de 20 %. Les instruments de mesure de la texture ne peuvent en général déformer les aliments à cette vitesse.

Cette faible corrélation peut être aussi expliquée par le fait que le pénétromètre ne mesure pas uniquement les propriétés des fibres musculaires mais également du tissu conjonctif. Le collagène, qui est le principal constituant du tissu conjonctif, est un facteur important de la dureté de la viande (Young et Braggins 1993). La teneur de ce dernier est

variable d'un muscle à un autre et possède donc une dureté de base plus ou moins importante (Valin 1995).

Khan et al. (1973) pensent que l'hétérogénéité du muscle est responsable en majeure partie de la faible corrélation entre la mesure instrumentale et la mesure sensorielle. En effet, dans un même muscle, les forces de cisaillement varient d'une extrémité à une autre et d'un endroit à un autre. En conséquence, même avec des échantillons bien «carottés» et en prenant toutes les précautions d'usage, les échantillons soumis aux mesures instrumentales n'ont pas nécessairement la même tendreté que ceux soumis à la dégustation. De même les échantillons dégustés n'ont pas nécessairement une tendreté uniforme.

Joseph et Connolly (1979) ont étudié la corrélation existant entre mesure instrumentale utilisant un tendéromètre Volodkevith basé sur le test de cisaillement et compression et la mesure sensorielle réalisée sur six muscles LD, PM, BF, ST, SM et GM. Les corrélations sont significatives seulement pour les muscles LD et PM. Pour notre étude, ces résultats confirment la faible corrélation (non significative) pour les muscles SM et RF alors qu'elle est élevée et hautement significative pour les muscles ST et BF.

### **1.2.2. Relations entre mesure instrumentale et sensorielle**

En définitive, ces essais de recherche de relation entre les mesures instrumentales et sensorielles de la tendreté de la viande, mettent en évidence une forte corrélation globale ne tenant pas compte du type de muscle. Cela est intéressant dans l'estimation globale, rapide de la tendreté de la viande de la cuisse.

La relation globale reliant la mesure sensorielle, estimation réelle de la tendreté (Tendr), à la mesure instrumentale au pénétromètre (MI) est la suivante :

$$\text{Tendr} = (0.62 \pm 0.30) \text{MI} + 4.22$$

Pour les deux muscles présentant une corrélation significative, les relations sont les suivantes :

$$\text{Muscle Semi Tendinosus : Tendr} = (2.25 \pm 0.63) \text{MI} + 3.93$$

Muscle Bicipitis Femoris :  $Tendr = (2.10 \pm 1.09) MI + 2.10$

où Tend est la tendreté réelle, exprimée en échelle de tendreté (valeur arrondie au nombre entier) et MI, la mesure instrumentale exprimée en millimètre

Ces relations déterminées à partir de la mesure instrumentale et sensorielle peuvent être utilisées en pratique sur le terrain, au niveau de l'abattoir par exemple en utilisant le pénétromètre comme technique rapide et non destructive de la mesure de la tendreté de la cuisse ou des deux muscles ST et BF. La mesure au pénétromètre est aisément convertie en échelle de tendreté réelle suivant le **tableau 6**. Nous avons donc à notre disposition une méthode simple pour classer les parties de carcasse en fonction de niveau de tendreté.

### 1.2.3. Effet de l'âge et du type de muscle sur les mesures au pénétromètre

#### Ø Analyse de variance

Des analyses de variance ont été effectuées afin de déterminer si les mesures au pénétromètre sont significativement différentes en fonction de l'âge des animaux et du type de muscles étudiés (**Tableau 8**).

L'analyse de variance met en évidence un effet lié à l'âge de l'animal et au type de muscle hautement significatif ( $p < 0.01\%$ ). Cet instrument de mesure permet donc de détecter une différence de tendreté en fonction de ces deux facteurs. Donc, il est tout à fait possible de parfaitement distinguer les quatre muscles et les différences de dureté des animaux.

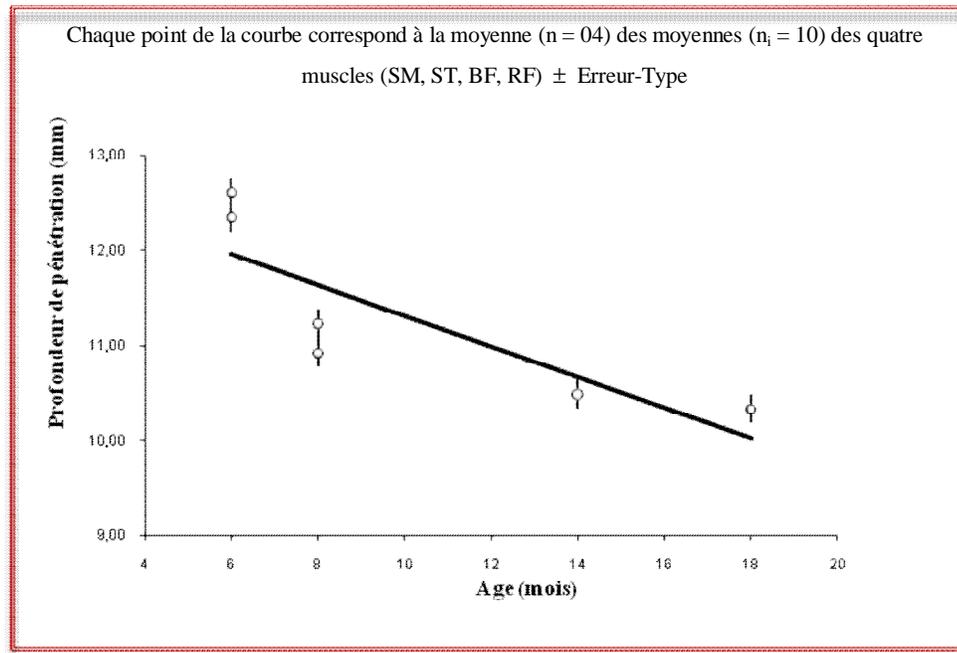
#### Ø Corrélation entre la mesure instrumentale et l'âge des animaux

Pour tous les muscles, la mesure instrumentale et l'âge des animaux sont fortement corrélés, mais de façon négative pour les quatre muscles ( $r = 0.91$  ;  $p < 0.05$ ). Plus l'âge des animaux augmente plus la profondeur de pénétration diminue (**Figure 32**). Donc les animaux jeunes présentent une meilleure tendreté que les animaux âgés. Ceci conforte les résultats rapportés chez le bovin et montrant une diminution de la vitesse d'attendrissage avec l'âge des animaux (Ouali, 1991).

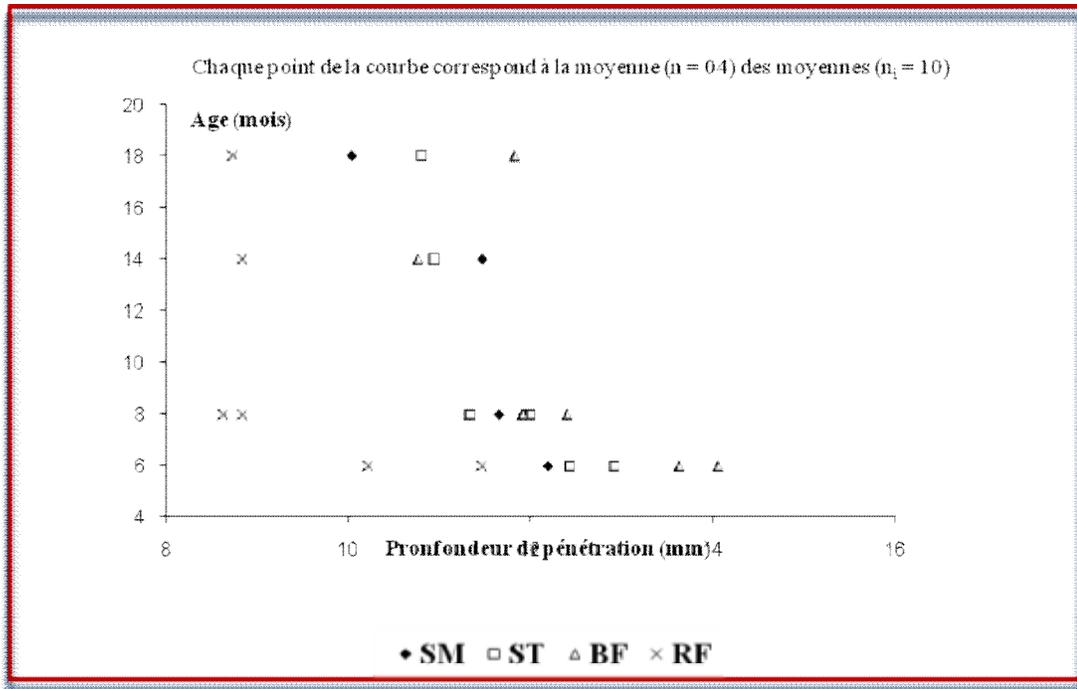
Le pénétromètre mesure la résistance du muscle à la pénétration, par l'outil, du tissu myofibrillaire et du tissu conjonctif, or le tissu conjonctif évolue très peu au cours du

**Tableau 8.** Evaluation, par analyse de la variance, de l'effet animal et de l'effet type de muscle sur les mesures obtenues par pénétrométrie

Facteurs étudiés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Test <i>F</i>	Probabilité
<b>Animal</b>	5	101.16	7.914	$6.58 \cdot 10^{-7}$ ( $p < 0.01\%$ )
<b>Muscle</b>	3	35.89	25.45	$2.58 \cdot 10^{-14}$ ( $p < 0.01\%$ )



**Figure 32.** Evolution de la profondeur de pénétration (mm) en fonction de l'âge des animaux



**Figure 33.** Evolution de la profondeur de pénétration (mm) des muscles : *Semi Membranosus* (SM), *Semi Tendinosus* (ST), *Bicipitis Femoris* (BF) et le *Rectus Femoris* (RF) en fonction de l'âge des animaux (mois)

stockage et donc constitue une dureté de base qui n'est pas résolue totalement lors du phénomène de maturation de la viande (Nishimura et al., 1996). Donc la résistance du tissu conjonctif est d'autant plus prise en compte que les animaux n'ont pas le même âge. Par conséquent, la teneur en collagène des muscles ne peut être considérée comme équivalente d'un animal à un autre et intervient donc dans la variabilité de la dureté de la viande (Lepetit et al., 1986). Mais en plus du collagène, d'autres paramètres biologiques joueraient un rôle dans la variabilité de la tendreté liée à l'âge, comme la structure contractile qui devient moins sensible à l'action des protéases endogènes et aux sels (Ouali 1990b). De plus chez le mouton (Ou et al., 1991) et le lapin (Ou et Forsberg 1990), les activités protéolytiques des muscles squelettiques, en particulier celles des calpaines diminuent avec l'âge.

### Ø Corrélation entre la mesure instrumentale et le typage musculaire

L'évolution de la tendreté, mesurée en profondeur de pénétration, des quatre muscles en fonction de l'âge des animaux est illustrée par la **figure 33**. Nous observons une augmentation de la dureté de la viande avec l'augmentation de l'âge pour tous les muscles. Les muscles SM, ST et BF présentent des valeurs de mesure relativement proches. Alors que pour le muscle RF, les profondeurs de pénétration mesurées sont faibles comparativement au trois autres muscles. On observe pour le même animal que les muscles SM, ST et BF sont plus tendres que le muscle RF. Ceci est probablement dû au type de muscle.

Le type de muscle est très important pour la tendreté de la viande. En effet, il est trois fois plus important que l'espèce, en ce qui concerne la vitesse et l'intensité de l'attendrissage (Dransfield et al., 1980-81). Ainsi, le *longissimus dorsi* et le *Semimembranosus* sont maturés en 12 jours alors que le *Gluteus medius* continue de maturer encore à 24 jours post mortem (Eillers et al., 1996). La vitesse de maturation est corrélée positivement à leur métabolisme glycolytique et à leur vitesse de contraction (Ouali 1990b).

Le RF, considéré comme muscle blanc de type IIB à métabolisme glycolytique et à vitesse de contraction rapide (Ashmore et et Doerr, 1971), présente le maximum de dureté par rapport aux autres muscles SM, ST BF, qui sont considérés comme muscles rouges à métabolisme oxydatif.

# Measuring texture of meat with the penetrometer

BECILA Samira\*, BOUDJELLAL Abdelghani\*, AGLI Abdel Nacer\*, OUALI Ahmed\*\*

\*Institut de Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires  
Université Mentouri de Constantine Algérie

\*\*Station de recherche sur la viande, INRA Theix, 63122 Saint Genès Champanelle. (France)

## Introduction

The objective of this work consists in calibrating the penetrometer with the sensory analysis so that, instrumental measurements can be converted into tenderness score. Two factors of variation of the tenderness were introduced : animal age and muscle type. However, we have to keep in mind that meat texture is under the dependence of a great number of other biological and technological factors.

## Material and Methods

### Animal and sampling:

The study was carried out on muscles *Semi Membranosus* (SM), *Semi Tendinosus* (ST), *Biceps Femoris* (BF) and *Rectus Femoris* (RF) of six ELTEL lambs. These lambs came from the same farm and were therefore zootechnically similar. Variability in meat tenderness was increased by selecting 6 to 18 months old animals with a carcass weight ranging from 14 to 21 Kg. Carcass weight was measured at the slaughtering time.

### Mechanical measurement of meat toughness

Mechanical measurements were carried out at ambient temperature using standard penetrometer PNR 10. This instrument is provided with a body, which penetrates in free fall in the tested product under the action of its own weight, during a given time. This penetration depth measured with a precision of 0.1 mm. The penetrating body used is a needle which weighs 2.5 g with a guide of 47.5 g, the total load being 50 g.

A high penetration depth value corresponds to tender meat while a low value indicates that the meat is tough.

### Sensory assessment of meat tenderness

Ten trained panellists were invited to taste the tenderness of meat cuts cooked in a water bath to a final inner temperature of 80°C. Meat tenderness was then estimated by chewing freely the sample and scored using a 1-9 score scale, 1 being very tough and 9 very tender.

## Results and discussion

### Age and muscle type effect on mechanical measurement of meat toughness

Variance analyses has been carried out in order to determine whether measurements with the penetrometer is significantly affected by the age of the animals and the type of the muscles studied (Table 1).

Variance analysis performed on the whole set of data clearly showed that both animal age and muscle type affect significantly the toughness of meat assessed by penetrometry (Table 1). For both factors the probability was lower than 0.01%.

Table 1 : Animal and muscle type effect on meat toughness assessed by variance analysis

Factors	Mean square	F-Test	Probability
Animal	101.16	7.914	6.58 10 <sup>-7</sup> (p<0.01%)
Muscle	35.89	25.45	2.58 10 <sup>-14</sup> (p<0.01%)

### Correlation between instrumental measurement and muscular typing, and the age of the animals

The effect of animal age on meat toughness assessed by penetrometry is illustrated by (fig.1) where animal age was plotted versus the mean toughness value for all muscles. We observed a quite linear increase in meat toughness with animal age. Considering now each individual muscles, SM, ST and BF muscles present relatively close toughness values whereas muscle RF exhibited lower penetration depths irrespective of the animal age (Fig.2). This suggested that, within a given animal, muscles SM, ST and BF are less tough than muscle RF. This is probably due to muscle type and composition .

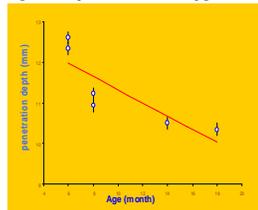


Fig.1: Changes in penetration depth (mm) according to animal age. Each point the mean penetration depth for four muscles of a given animal ± Standard Error.

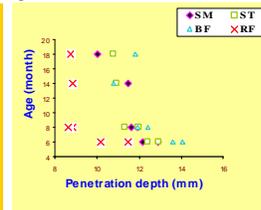


Fig.2: Individual muscle variability in penetration depth (mm) with animal age. Muscles were M. *Semi Membranosus* (SM), *Semi Tendinosus* (ST), *Biceps Femoris* (BF) and *Rectus Femoris* (RF)

### Relations between instrumental and sensory measurement

The correlation between instrumental measurement and the sensory analysis of meat tenderness was calculated according to the test of general tendency using the coefficient of correlation of the rank of Spearman.

For the application of the test, we transformed into notes all instrumental measurements according to the following scale of tenderness (Table 2).

Table 2: Scale of transformation of instrumental measurements into tenderness scores

Scale	Qualifiers	Depth penetration (mm)
1	Extremely hard	[0 - 2.22]
2	Very hard	[2.23 - 4.45]
3	Hard	[4.46 - 6.68]
4	Sufficiently lasts	[6.69 - 8.91]
5	Nor hard, nor to tough	[8.92 - 11.14]
6	Sufficiently tough	[11.15 - 13.37]
7	Tough	[13.38 - 15.6]
8	Very Tough	[15.61 - 17.83]
9	Extremely tough	[17.84 - 20.06]

The total relation connecting sensory measurement, real estimate of tenderness (Tendr) with instrumental measurement with the penetrometer (MI) is:

$$\text{Tendr} = (0.62 \pm 0.30) \text{MI} + 4.22$$

Tendr: real tenderness scores (value rounded to nearest whole number);  
MI: instrumental measurement expressed in mm

## Conclusion

This study demonstrate that the penetrometry method discriminates the samples according to the age of the animals and to the muscle considered. From an industrial point of view, that method will enable *post mortem* measurement of meat toughness at 24 H by using the penetrometry method which is fast, non destructive and inexpensive. Further investigation are necessary to evaluate the possibility to predict ultimate tenderness of meat with the present method.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We would thanks Mr. OUALI AHMED (director of Laboratory of research on the meat, INRA Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France) for the development of the experimental protocol.  
we thank also Mr. BOUSABOUA ATMAN for financial assist

### 1.3. Conclusions

D'après les résultats obtenus, le pénétromètre permet de discriminer les échantillons en fonction de l'âge des animaux mais aussi en fonction du type musculaire. Car il mesure à la fois la résistance du tissu conjonctif et des protéines myofibrillaires.

Le pénétromètre peut être utilisé pour une estimation globale de la tendreté de la viande d'agneau et peut donc se substituer à la mesure sensorielle de la tendreté. D'un point de vue industriel, cela est intéressant dans l'estimation de la dureté à 24 h *post mortem* de la viande en utilisant le pénétromètre comme technique rapide, non destructive et peu coûteuse pour prédire à partir de la viande fraîche la tendreté de la viande cuite. La pénétrométrie n'est utilisable que pour des muscles ayant des taux de collagène réduits comme c'est le cas chez l'agneau.

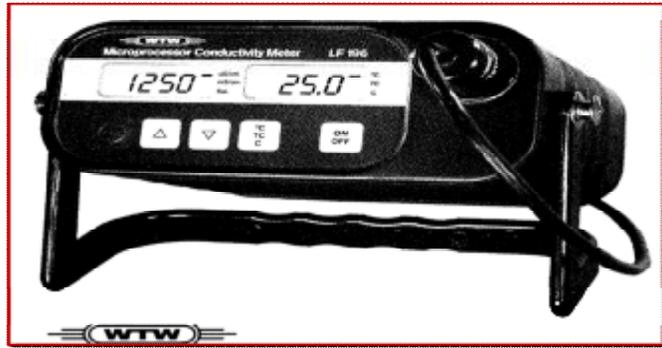
Cependant, nous ne pouvons préjuger de la validité de la mesure instrumentale de la tendreté par pénétrométrie pour tous les muscles de la carcasse. Les relations trouvées demandent à être confortée par des essais sur un nombre d'animaux plus important et sur divers muscles consommés préférentiellement pour leur tendreté. D'autres facteurs de variabilité de la tendreté doivent être testés comme l'espèce, la race, le sexe, etc...

L'étude proprement dite a fait l'objet d'une communication écrite au Congrès International sur la sécurité alimentaire qui s'est déroulé en 2006 à Tunis. (**Figure 34**).

## 2. Conductivité électrique et pression osmotique du muscle

De nombreuses études ont été menées depuis les années trente (Callow, 1936, 39) sur les propriétés électriques de la viande dans le but de mettre au point un capteur rapide et non destructif fournissant des indications sur différentes caractéristiques qualitatives du produit. Les tissus biologiques et la viande en particulier sont anisotropes vis-à-vis de l'impédance c'est-à-dire que l'impédance varie selon que le courant se propage parallèlement ou perpendiculairement aux fibres musculaires. Dans le domaine de la viande, l'impédance électrique a été utilisée à des fins très diverses (Damez et *al.*, 2006).

Notre intérêt pour cette mesure électrique a été consécutif à l'absence de moyens pour mesurer l'osmolarité du tissu musculaire. Ne disposant pas d'osmomètre au niveau du laboratoire de I.N.A.T.A.A. nous avons estimé l'osmolarité du muscle indirectement en



**Figure 35.** Conductimètre à microprocesseur type LF 196 (WTW, Germany)

mesurant la conductivité électrique du jus extrait de la viande. Car les changements de l'osmolarité dans le muscle post mortem semble être très importants pour l'attendrissage des viandes (Ouali, 1990). L'osmolarité du muscle est généralement déterminée à partir du jus extrait de la viande après centrifugation à l'aide d'un osmomètre (Zamora 1996) ou par Analyse Enthalpique Différentielle (AED) selon le protocole décrit par Bonnet et coll. (1992) qui utilise un calorimètre différentiel. L'avantage de cette dernière technique est que la mesure est réalisée directement sur un échantillon de muscle entier et fraîchement prélevé.

Afin de mettre au point la technique de mesure de conductivité électrique sur du jus de viande, et pouvoir transformer les valeurs de conductivité électrique en osmolarité, nous avons :

- Ø procédé à un étalonnage de la cellule du conductimètre par rapport à une cellule électrique récemment développée, au sein de l'unité par J. L. Damez.
- Ø estimé le seuil de détection de la technique ;
- Ø testé l'effet de la dilution sur les mesures de la conductivité ainsi que le l'effet du pH sur les deux mesures à savoir la conductivité électrique et l'osmolarité.

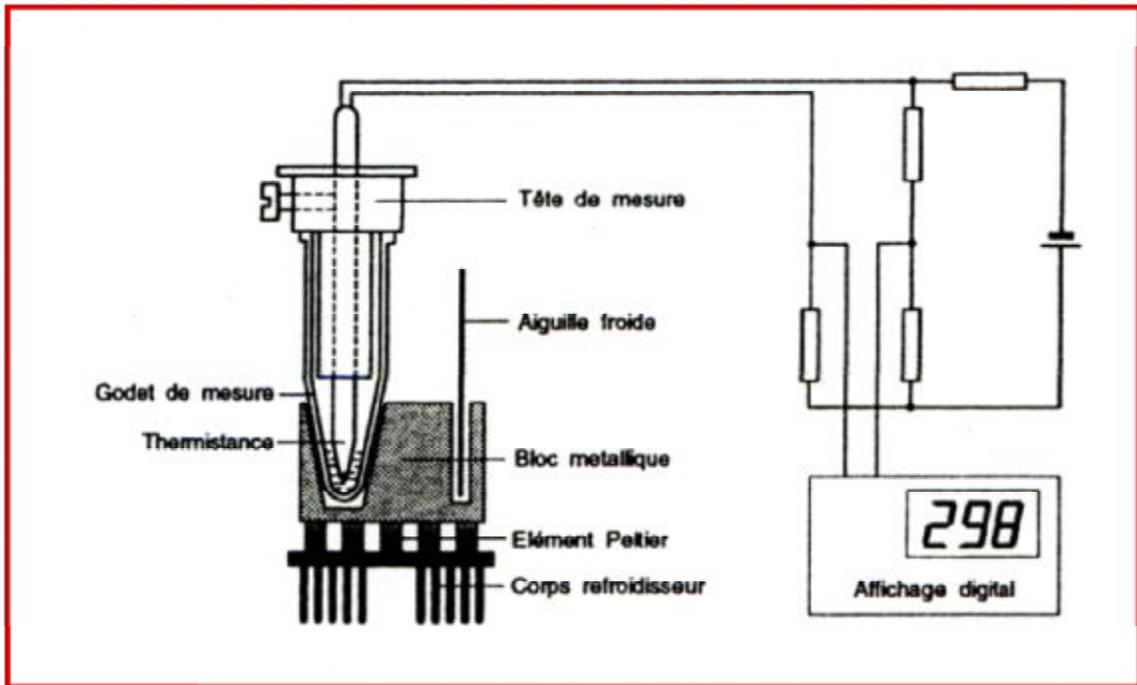
Pour une meilleure compréhension de l'organisation de cette partie, nous commencerons par la présentation des différentes techniques à savoir la mesure de la conductivité électrique et de l'osmolarité. Dans un second temps nous présenterons la méthodologie suivie pour la validation de la mesure de la conductivité électrique ainsi que les différents problèmes rencontrés.

## **2.1. Présentation des différentes techniques**

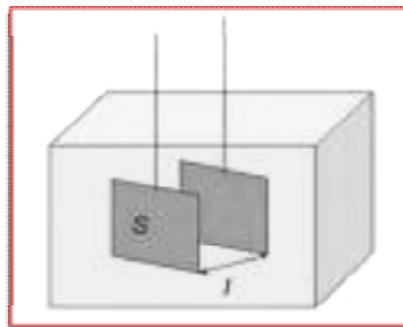
### **2.1.1. Mesure de la conductivité électrique**

Le conductimètre utilisé est à microprocesseur type LF 196 (WTW, Germany) muni d'une cellule de conductivité type TetraCon 96. L'appareil est étalonné avec une solution prête à l'emploi constituée de chlorure de potassium à 0.01 mol/l de conductivité électrique connue pour une température de référence de 25°C (**Figure 35**).

L'échantillon de muscle de masse d'environ 5g très grossièrement haché à la moulinette pendant 8 secondes est ensuite centrifugé à 18 000 × g pendant 30 minutes. Le



**Figure 36.** Schéma de principe du micro-osmomètre automatique (Roebing, Allemagne)



**Figure 37.** Schéma de la cellule conductimétrique

volume de jus récupéré est complété à 20 ml avec de l'eau pure afin d'avoir un volume suffisant pour plonger la cellule de conductivité.

Les valeurs de conductivité sont ajustées automatiquement par rapport à la température de l'échantillon. Des mesures ont également été faites sur l'eau pure utilisée pour diluer les jus de viande. Cette valeur a été déduite des valeurs de conductivité. La conductivité électrique est exprimée en  $\mu\text{S}/\text{cm}$

### 2.1.2. Mesure de l'osmolarité à l'aide d'un osmomètre

L'osmolarité a été mesurée sur du jus de viande extrait après centrifugation 30 minutes à 100 000 x g. La mesure est réalisée à l'aide d'un micro-osmomètre automatique (Roebbling, Allemagne) et l'osmolarité est exprimé en mOsmol/kg (**Figure 36**).

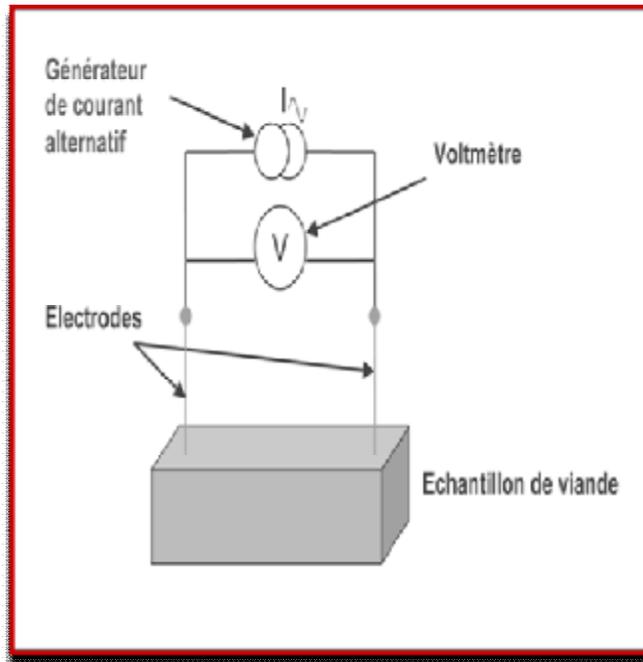
L'osmomètre détermine le point de congélation de solutions aqueuses. L'abaissement du point de congélation par rapport à l'eau pure est une mesure directe de la concentration osmolaire. L'eau pure se solidifie à 0°C, une solution à 1 mOsmol/kg se solidifie à -1,858°C. Pour chaque mesure, des blancs ont été réalisés avec de l'eau « pure » qui est généralement utilisée pour diluer les échantillons. La valeur de l'osmolarité de notre blanc a été déduite des valeurs obtenues sur le jus de viande.

## 2. 2. Validation de la méthode de mesure de la conductivité électrique

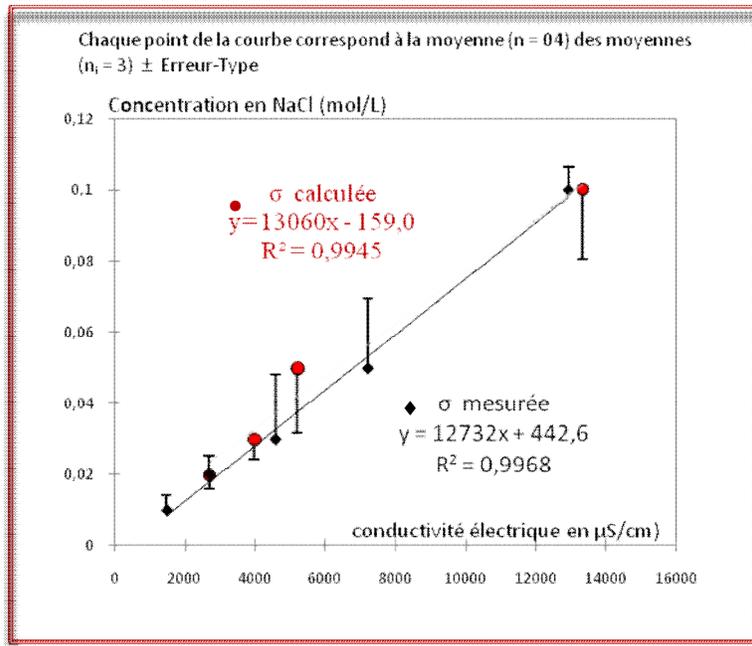
### 2. 2. 1. Etalonnage du conductimètre par la mesure de l'impédance électrique

Un conductimètre est constitué d'un ohmmètre et d'une cellule de mesure : la cellule conductimétrique.

La cellule conductimétrique est un assemblage de deux plaques de platine rectangulaire de surface  $S$ , maintenues parallèles à une distance  $l$  sur un support en verre (**Figure37**). L'appareil mesure la résistance  $R$  du volume de liquide  $S l$  délimité par les plaques et indique la conductance  $G$  avec  $G = 1/R$ . La conductance de ce volume de solution est reliée à sa conductivité  $\sigma$  par la relation  $G = \sigma / k$ , où  $k$  est la constante de cellule. C'est une grandeur homogène à l'inverse d'une distance qui est caractéristique de la géométrie de la cellule. Elle est précisée par le fabricant mais elle évolue avec l'état de surface de la cellule. Il faut donc la déterminer au préalable par une procédure d'étalonnage si on veut mesurer une conductivité.



**Figure 38** : mesure de l'impédance en méthode « 2 point »  
 Damez et *al.*, 2008



**Figure 39.** Relations entre la conductivité électrique ( $\blacklozenge$ ) mesurées et calculées ( $\bullet$ )

L'étalonnage est fait à l'aide d'une cellule élaborée récemment (Damez et al. : travaux non publiés) et permettant de mesurer avec précision l'impédance électrique.

L'impédance électrique est la propriété d'un matériau à s'opposer au passage du courant (Combes et al., 2005).

La méthode utilisée pour mesurer une impédance  $Z$  est d'utiliser deux électrodes, de faire circuler un courant  $I$  dans le circuit, de mesurer la tension  $V$  aux bornes de ces deux électrodes et d'en déduire l'impédance électrique en appliquant la loi d'Ohm  $V=ZI$ , l'impédance étant exprimée en Ohm (**Figure 38**)

Un courant alternatif est utilisé afin d'atténuer la perturbation due à la polarisation des électrodes résultant du passage d'un courant électrique. Les électrolytes peuvent être considérés comme des conducteurs métalliques, et ils obéissent à la loi d'Ohm. En appliquant une force électromotrice constante entre les électrodes, la variation de l'intensité de courant est inversement proportionnelle à la résistance de la solution. La conductivité d'une solution dépend de la concentration des ions présents et de leur vitesse de migration sous l'influence de la force électromotrice appliquée.

La mesure de l'impédance est faite sur des solutions standards de KCl à différentes concentrations (0,01, 0,02, 0,03, 0,05 0,1 M) en incubant la cellule dans un bain marie à une température de 25°C. Le maintien de la température à une valeur constante est indispensable car la température est un facteur très important de variation de ces mesures électriques. La mesure de la conductivité électrique a été faite sur les mêmes solutions. Les mesures sont ajustées automatiquement par rapport à une température de référence de 25 °C.

L'étalonnage consiste à déterminer la constante de cellule en mesurant l'impédance  $Z$  des solutions étalons d'électrolyte (KCl) dont la conductivité  $\sigma$  est connue. On en déduit

$$K = \sigma / Z$$

A partir des valeurs trouvées d'impédance, la conductivité électrique théorique est calculée par la formule  $\sigma = Z K$

Nos résultats montrent des pentes très peu différentes (**Figure 39**) entre les valeurs de conductivité mesurées avec le conductimètre ( $\sigma$  mesurée) et les valeurs calculées à partir de l'impédance mesurée par la cellule ( $\sigma$  calculée). En moyenne, la différence entre les deux

mesures ne dépasse pas 0,46  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Cette différence très faible peut être expliquée par la variation de température lors de la réalisation de la mesure d'impédance avec la cellule, bien que cette dernière soit plongée dans un bain marie pour assurer un régime thermique identique lors des mesures.

### 2. 2. 2. Détermination du seuil de détection

Nous avons jugé nécessaire de déterminer le seuil de détection ou limite de détection ou détectabilité. Cette dernière est définie comme étant le plus petit signal exprimé en conductivité ou osmolarité et qui est détecté avec une probabilité connue par rapport à un blanc réalisé dans les mêmes conditions (FERARD 1990).

Soixante dix mesures de conductivité de blanc (eau distillée) ont été réalisées pendant l'expérimentation (**Tableau 9**). La moyenne est de  $9,76 \pm 0,84$  ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

La limite de détection est exprimée en grandeur arbitraire ou mieux comme ici par une concentration osmolaire, pour une probabilité  $P < 0,05$  et un ddl 69, l'écart réduit ( $\mu$ ) est égal à 1,96.

$$X = [ \text{Moy}_{\text{blanc}} + \mu \times E. T_{\cdot\text{blanc}} \cdot \sqrt{N-1} ]$$

X : limite de détection

$\text{Moy}_{\text{blanc}}$  : moyenne des conductivités des blancs

$E. T_{\cdot\text{blanc}}$  : écart-type des conductivités des blancs

$\mu$  : l'écart réduit à 1,96 pour un ddl de 69 et seuil de signification  $P < 0,05$

Si  $\text{Moy}_{\text{blanc}}$  est nulle, par la soustraction de cette valeur de toutes les mesures de conductivité, on obtient :  $X = 1,96 \times E. T_{\cdot\text{blanc}} \cdot \sqrt{N-1}$  où X est la valeur du plus petit signal détectable. La limite de détection est alors de  $0,20\mu\text{S}/\text{cm}$ . La valeur X en conductivité peut être transformée en osmolarité en utilisant la fonction d'étalonnage moyenne déterminée précédemment. La limite de détection est alors égale à  $+0,007 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

### 2. 2. 3. Effet de dilution sur la mesure de la conductivité

La mesure de la conductivité électrique est faite sur du jus de viande plus ou moins dilué ou sur des dilutions d'une solution standard de NaCl.

**Tableau 9.** Conductivité des blancs (N =70)

11.44	8.85	8.85	10.32	10.83	8.88	9.30
11.40	8.89	9.58	10.10	9.99	8.68	9.33
11.32	8.88	9.53	10.23	10.10	8.87	9.35
11.44	8.85	8.58	10.10	9.84	8.84	9.32
11.41	8.98	9.58	10.20	9.81	8.85	10.31
11.40	8.98	9.56	10.22	9.85	8.86	10.30
11.31	8.88	9.58	10.80	9.85	8.87	10.32
8.54	8.85	9.61	10.81	9.84	9.30	10.31
8.52	8.88	9.62	10.82	9.82	9.29	10.29
8.35	8.85	10.10	10.82	9.85	9.32	10.30
<b>Moy ± ET : 9.76 ± 0.84µS/cm</b>						

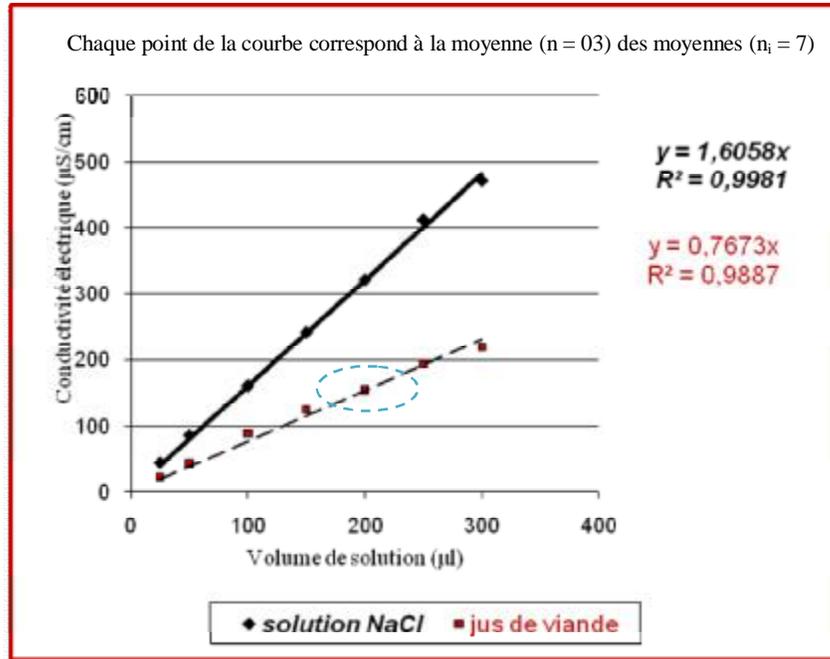
Pour vérifier l'effet de dilution sur la linéarité de la mesure de conductivité électrique nous avons répété la mesure sur des dilutions d'une solution standard de NaCl. Ces solutions standards de NaCl ont été préparées en prélevant des volumes différents (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu$ l) à partir d'une solution mère à 0.25 M dans un volume final de 20ml.

Des mesures de conductivité électrique ont été aussi faites sur du jus de viande. Le muscle Diaphragma de bovin a été utilisé pour le test sur les dilutions de jus de viande. Cinq grammes de muscle prélevés 24 *post mortem* sont hachés à la moulinette pendant 8 secondes puis centrifugés à  $100\,000 \times g$  pendant 30 minutes. Le volume de jus récupéré va servir à préparer les différentes dilutions en prélevant des volumes différents (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu$ l) dans un volume final de 20 ml.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à vérifier la linéarité de la conductivité en changeant la quantité d'ions apportée (**Figure 40**). On remarque que la conductivité électrique augmente en fonction du volume de jus de viande et du volume de la solution de NaCl avec des coefficients de déterminations très satisfaisants  $R = 0,9887$  et  $0,9981$  respectivement.

Néanmoins, une étude faite par Damez et al., (résultats non publiés) sur un milieu simple de gélatine contenant du NaCl 1mM, l'évolution constatée de la conductivité de ce mélange augmente en fonction du taux de la matière sèche pour atteindre un plateau à 20% de matière sèche. Ce résultat a déjà été établi par Marche et al., 1989 mais n'a pas été expliqué. Il n'y a pas d'explication simple à ce phénomène. Le collagène sec est isolant. Il est toutefois vraisemblable que les molécules de collagène dans la gélatine participent à la conduction. C'est le cas pour le jus de viande qui peut contenir des quantités très importantes de protéines surtout pendant la phase de maturation où la protéolyse est installée. Il est donc probable qu'il existe des interactions complexes entre les ions et les protéines. Le comportement électrique de l'exemple de gélatine chargée en ions montre l'interaction qui peut y avoir entre une structure protéique et un milieu ionique, mais ne nous permet pas actuellement de comprendre les variations des propriétés électriques induites par une structure protéique.

On constate que la conductivité est proportionnelle à la concentration, pour un volume maximum testé dans notre étude de 300 $\mu$ l, en raison de la forte influence de la concentration de protéine sur la conductivité électrique et de la complexité de la composition du jus de



**Figure 40.** Effet de la dilution sur la linéarité des mesures de conductivités électriques (Différents volumes de la solution NaCl et du jus de viande avec un volume constant du mélange)

viande. Cependant, il serait intéressant de vérifier la linéarité de la mesure pour des volumes plus importants de jus de viande.

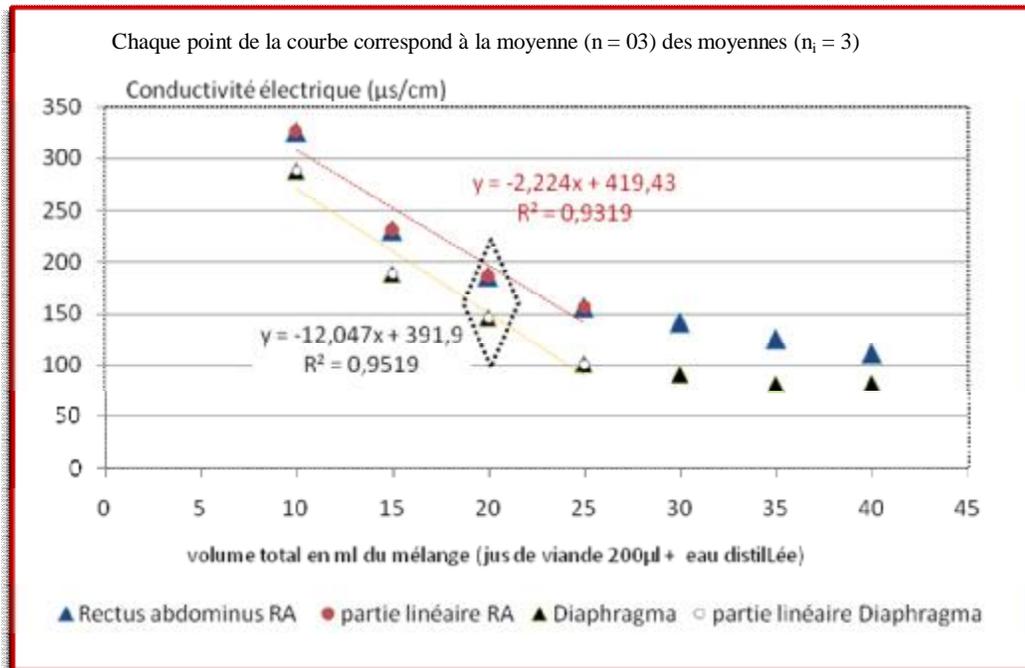
La vérification de l'effet dilution a été également faite en diluant un volume constant de jus de viande dans un volume variable d'eau distillée. Donc la quantité d'ions dans le mélange est constante. Les muscles *Rectus abdominus* (RA) et le *Diaphragma* (D) de bovin ont été utilisés. Prélevés à 24 h *post mortem*, l'échantillon de muscle de masse d'environ 5g est haché à la moulinette pendant 8 secondes et ensuite centrifugé à  $100\,000 \times g$  pendant 30 minutes. Un volume constant de jus de viande (200  $\mu$ l) va être plus ou moins dilué par ajout d'une quantité variable d'eau distillée pour atteindre un volume final de 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 ml.

L'évolution de la conductivité en fonction du degré de dilution de notre jus de viande a été testée sur deux muscles de bovin. Nos résultats montrent la même allure pour les deux muscles (**Figure 41**). On observe une partie linéaire qui s'étend jusqu'à une dilution du jus de viande de 120 fois. Cette partie linéaire présente un coefficient de détermination très satisfaisant de 0,931 pour le *Rectus abdominus* et de 0,951 pour le *Diaphragma*.

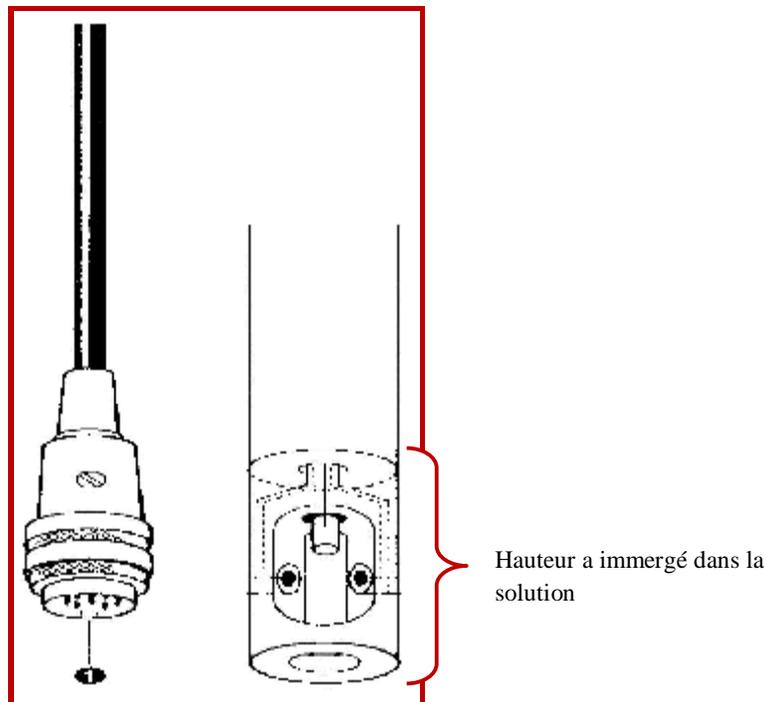
Compte tenu de la forte influence de la concentration ionique sur la conductivité d'une solution et au vue des variations des teneurs en ions et protéines observées au cours des différentes phases de maturation de la viande, nous avons opté d'utiliser un volume constant de jus de 200  $\mu$ L et de faire la mesure sur un volume total de 20 ml du mélange (jus de viande / eau distillée) donc en diluant le jus 100 fois. Ce choix a été fait sur la base des résultats qui permettent de vérifier que pour un tel volume la mesure est linéaire (**Figure 40 et 41**). Une telle dilution permet en outre de se positionner loin de la limite de détectabilité de la mesure et du point de saturation. Le volume total de 20 ml du mélange jus de viande / eau distillée nous permet de réaliser la mesure convenablement puisque la sonde du conductimètre est totalement immergée dans la solution. (**Figure 42**).

#### 2. 2. 4. Effet du pH sur la mesure de la conductivité électrique et l'osmolarité

Depuis les années 1970, la grande majorité des travaux sur les propriétés éclectiques de la viande a porté sur l'utilisation de cette mesure pour le contrôle de la chute du pH ou encore l'évaluation du pH ultime (Norman et *al.*, 2000). D'où notre intérêt de vérifier l'effet du pH sur la linéarité de la mesure de la conductivité ainsi que sur l'osmolarité. Quatre gammes de solution standard de NaCl ont été préparées. Chaque gamme comprend cinq



**Figure 41.** Effet de la dilution sur la linéarité des mesures de conductivités électriques (Volume constant de jus de viande le volume total du mélange et variable)



**Figure 42.** Sonde du conductimètre à microprocesseur type LF 196 (WTW, Germany)



solutions standard de NaCl à différentes concentrations (0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35 M). La mesure de la conductivité et de l'osmolarité a été faite sur les mêmes solutions après ajustement du pH des solutions à 6,5, 6,0, 5,5. Une dernière gamme (témoin) a été réalisée sans ajustement du pH.

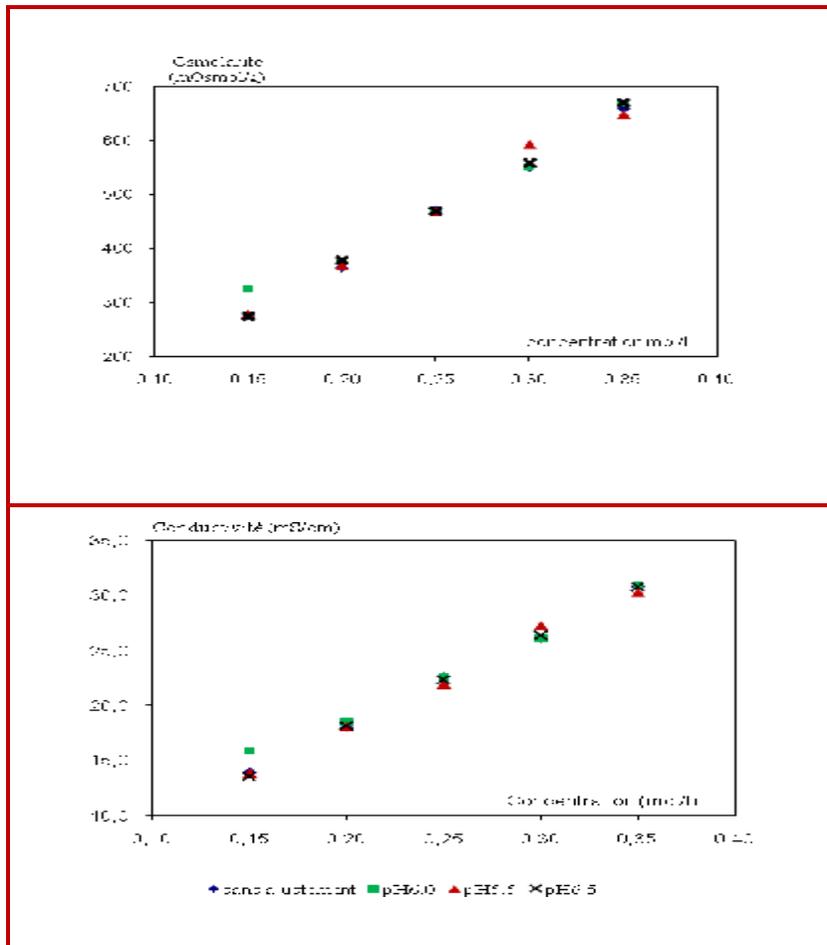
**La figure 43** montre que, quel que soit le pH de la solution, les valeurs d'osmolarité ou de conductivité mesurées sont identiques. Pour des concentrations les plus faibles en sels (0,15M), les valeurs obtenues pour les deux variables mesurées sont légèrement inférieures pour les solutions dont le pH n'a pas été ajusté mais la différence reste faible et non significative. Dans tous les cas, la conductivité augmente linéairement avec la concentration en sel en fonction du pH de la solution. Les coefficients de déterminations sont très satisfaisants quelque soit le pH de la solution ( $R^2=0.98-0.99$ ).

Une analyse de variance (**Tableau 10**) des valeurs de conductivité et d'osmolarité pour les quatre gammes à savoir la gamme à pH 6,5, 6,0, 5,5 et la dernière gamme témoin sans ajustement ne montre pas de différence significatives au seuil de signification de 5%.

### **2. 3. Détermination de la relation entre l'osmolarité et la conductivité électrique :**

A l'I.N.A.T.A.A., nous ne disposons pas d'osmomètre et pour combler cette lacune, nous avons cherché à établir la relation entre la conductivité électrique et l'osmolarité mesurées sur les mêmes extraits musculaires ou sur les mêmes solutions de NaCl afin de pouvoir transformer nos mesures électriques en osmolarité et pouvoir ainsi les comparer avec les autres travaux. De plus, des travaux antérieurs, réalisés à l'I.N.A.T.A.A., montraient clairement que les équations mathématiques décrivant la relation entre ces deux variables n'étaient pas satisfaisantes (Becila 2002). Pour nos expériences sur l'agneau, nous avons donc opté pour une mesure de conductivité, mesure transformée par la suite en valeur d'osmolarité à des fins de comparaison avec les autres travaux.

Dix courbes d'étalonnage ont été établies pour obtenir la fonction d'étalonnage moyenne entre la conductivité et l'osmolarité. Pour cela, nous avons utilisé des solutions de NaCl pures plus ou moins diluées sur lesquelles nous avons procédé à la mesure de la conductivité avec l'appareil que nous disposions à l'INATAA et un osmomètre qui était disponible à l'INRA.



**Figure 43.** Effet de la variation du pH sur la linéarité de la mesure de la conductivité électrique et de l'osmolarité

**Tableau 10.** Effet de variation du pH sur la linéarité de la mesure de l'osmolarité

Facteurs étudiés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Test <i>F</i>	Probabilité
Osmolarité	3	14567,813	0,744	0,577
Conductivité	3	27,914	0,735	0,582

Le meilleur ajustement de la droite d'étalonnage a été réalisé par la méthode des moindres carrées.

**Le tableau 11** regroupe les paramètres des 10 fonctions d'étalonnages : coefficient de corrélation (r), coefficient de régression (R) ou pente et son écart type (E.T.) ainsi que la probabilité (P). La droite passe par 0 ce qui indique une très bonne représentativité de l'osmolarité par la conductivité.

La fonction moyenne d'étalonnage (N = 10) est de la forme (**Figure 44**)

$$Y = (a \pm IC) X$$

Où a est la pente moyenne, IC est l'intervalle de confiance, Y l'osmolarité et X la conductivité électrique.

L'intervalle de confiance est calculé par la formule de SCHWARTZ (1969)

$$IC = t \times E.T. / \sqrt{N-1}$$

Avec :

t de student égal à 2.26 pour un ddl de 9 et une probabilité  $P < 0.05$  ;

E.T. est l'écart type égal à 0.0001 et N est le nombre total des courbes égal à 10.

La courbe d'étalonnage est alors de la forme

$$Os = (a \pm t \times E.T. / \sqrt{N-1}) \times \chi$$

Où l'osmolarité (Os) et la conductivité ( $\sigma$ ) sont exprimées respectivement en mOsmol/L et  $\mu S/cm$

$$Os = (0,021 \pm 0,0016) \times \sigma + 0,007$$

## 2.4. Conclusion

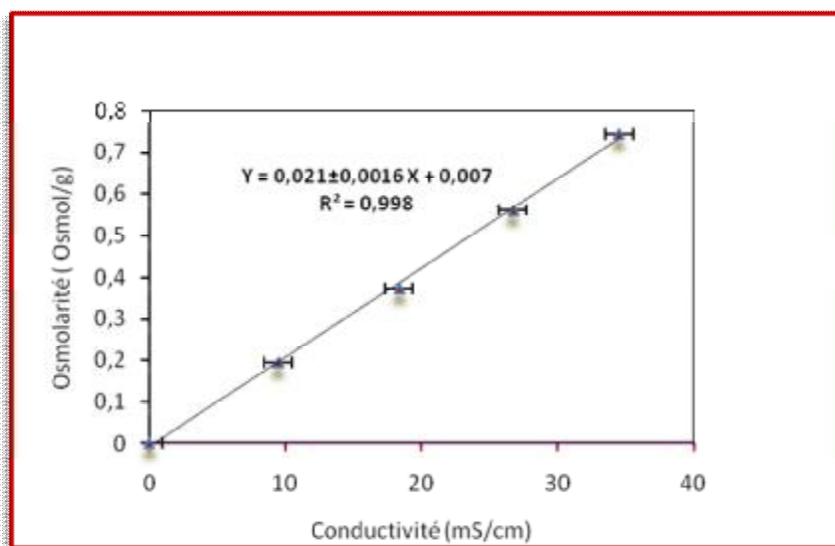
Cette étude préliminaire a permis de définir un certain nombre de points importants pour la mesure de la conductivité dans des extraits de muscle obtenus par centrifugation.

Suite aux résultats des différentes mises au point présentées, nous avons opté d'utiliser le volume total de jus de viande obtenu pour chaque temps de prélèvement et de faire la mesure sur un volume total de 20 ml après dilution du jus de viande avec de l'eau pure. Ce choix a été fait sur la base des résultats car si on travaille avec un volume constant du jus on

**Tableau 11.** Paramètres des différentes fonctions d'étalonnages, (N = 10)

<b>R ± E. T</b>	<b>r</b>	<b>P</b>
0.021± 0.001	<b>0.9995</b>	<b>0.001</b>
0.021±0.001	<b>0.9995</b>	0.001
0.021±0.001	<b>0.9998</b>	0.001
0.020±0.001	<b>0.9998</b>	0.001
0.021±0.001	<b>0.9994</b>	0.001
0.020±0.001	<b>0.9990</b>	0.001
0.021±0.001	<b>0.9996</b>	0.001
0.021±0.001	<b>0.9992</b>	0.001
0.021±0.001	<b>0.9960</b>	0.001
<b>0.021±0.0001</b>	<b>0.9999</b>	0.001

\*r et R : coefficients de corrélation et de régression ; E. T. écart- type.



**Figure 44.** La courbe moyenne d'étalonnage entre la conductivité électrique et osmolarité

---

n'observera pas d'évolution de cette mesure au cours du temps *post mortem*. Nous avons également constaté que le facteur dilution ainsi que la variation du pH n'ont pas d'effet significatif sur la linéarité de la mesure ( $P < 0,5$ ).

Nous avons montré l'influence de plusieurs autres facteurs sur cette mesure électrique et en particulier celle de la concentration en protéines, du volume de jus utilisé et également de la température.

La réalisation de cette étape de validation nous a permis de corriger cette mesure avant de l'appliquer à l'étude du phénomène de maturation de la viande d'agneau.

Nous pouvions également transformer, si nécessaire, les valeurs de conductivité électrique en osmolarité à l'aide de l'équation établie entre les deux paramètres afin de pouvoir les comparer avec les autres travaux qui utilisent principalement la mesure de l'osmolarité du muscle.

## II. CARACTERISATION PYHYSICO-CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUE DE LA VIANDE D'AGNEAU

Nous avons vu précédemment la mise au point des différentes techniques nécessaires pour pouvoir caractériser certains paramètres importants dans l'évolution post mortem de la viande d'agneau. Les animaux utilisés étaient de race Ouled Djellel, une race très connue en Algérie.

Afin de caractériser cette viande d'agneau locale, nous avons choisi quelques paramètres physicochimiques et biochimiques connus pour leur implication plus ou moins importante dans le processus d'attendrissage des viandes à savoir la température, le pH, la capacité de rétention d'eau, la conductivité électrique, l'osmolarité, la dureté de la viande mesurée par pénétration et l'estimation de la protéolyse des protéines contractiles au cours du temps post mortem. Le métabolisme énergétique des muscles a également été caractérisé au stade de l'abattage. Le métabolisme glycolytique des muscles a été estimé à partir de la mesure la teneur en isoforme M4 de la LDH qui est principalement présente dans les muscles blancs de type IIB (la lactate déshydrogénase, qui est l'enzyme responsable de la transformation du pyruvate en acide lactique lors de la glycolyse). Le métabolisme oxydatif des muscles a lui été évalué, par l'estimation de la teneur du muscle en myoglobine (chromoprotéine représentant les exigences en oxygène du muscle considéré). Plus le taux de myoglobine sera élevé, plus le métabolisme oxydatif du muscle sera prépondérant et plus sa couleur sera rouge (muscles de type I ou rouge à contraction lente et de type IIA ou rouge à contraction rapide).

La réalisation de cette partie a été faite au laboratoire de l'INATAA en ce qui concerne les paramètres physico-chimiques (pH, température, capacité de rétention d'eau des protéines myofibrillaires, mesure de la dureté de la viande) dans le cadre d'un travail de magister (2006) fait par HARKATI Amani et que j'ai co-encadré au laboratoire avec Mr ZIDOUNE. Pour la caractérisation physiologique des muscles et le comportement électrophorétique des protéines myofibrillaires au cours du temps post mortem, les expérimentations ont été réalisées pendant mon stage de courte durée au laboratoire d'immunologie et également au sein l'équipe biochimie à l'INRA de Theix.

Dans cette dernière partie du chapitre I, nous tâcherons de répondre à quatre questions : comment évoluent ces paramètres après l'abattage de l'animal ? Est-ce qu'il y a un effet

animal et un effet muscle sur l'évolution de ces paramètres ? Existe-t-il une bonne corrélation entre ces différents paramètres ? Et enfin, parmi les variables étudiées quelles sont les plus discriminantes pour la prédiction de la tendreté de la viande d'agneau.

## 1. CARACTERISTIQUES DES ANIMAUX

Les cinq animaux utilisés lors de l'expérience proviennent de la même ferme. Ces animaux de race Ouled Djellal ont été sélectionnés en fonction de leur âge pour constituer une population aussi homogène que possible. Malgré les précautions prises, il s'est avéré que 2 des animaux (A1 et A2) présentaient un poids de carcasses supérieur aux autres. (**Tableau12**)

Les quatre muscles qui ont servi de modèle d'étude sont les muscles *Semi Membranosus* (SM), *Semi Tendinosus* (ST), *Longissimus lumborum* (LB) et *Rectus Femoris* (RF).

Nous observons également une légère variation des poids des muscles. Le coefficient de variation des poids des muscles entre animaux varient entre 4,4% pour le muscle SM et 13,95% pour le muscle RF.

## 2. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUE DES MUSCLES

Au stade d'abattage, les muscles ont été caractérisés par leur métabolisme énergétique. Le métabolisme oxydatif des muscles a été évalué par immunodiffusion radiale (Macini et al., 1965), technique immunologique permettant de déterminer la concentration d'une protéine particulière dans des extraits de tissus.

### 2. 1. Principe de la méthode de Mancini

Les protéines à doser sont déposées dans les puits réalisés dans des plaques de gélose contenant l'antisérum spécifique de celles-ci. Les protéines diffusent dans la gélose jusqu'à l'équivalence entre l'anticorps et l'antigène, qui se traduit par un précipité. La surface du cercle de précipitation est proportionnelle à la concentration en protéines, déterminée à partir d'une droite de régression définie à partir d'une gamme de concentrations connues et déposée en même temps que les échantillons (**Figure 45**)



## 2. 2. Application à la caractérisation des muscles

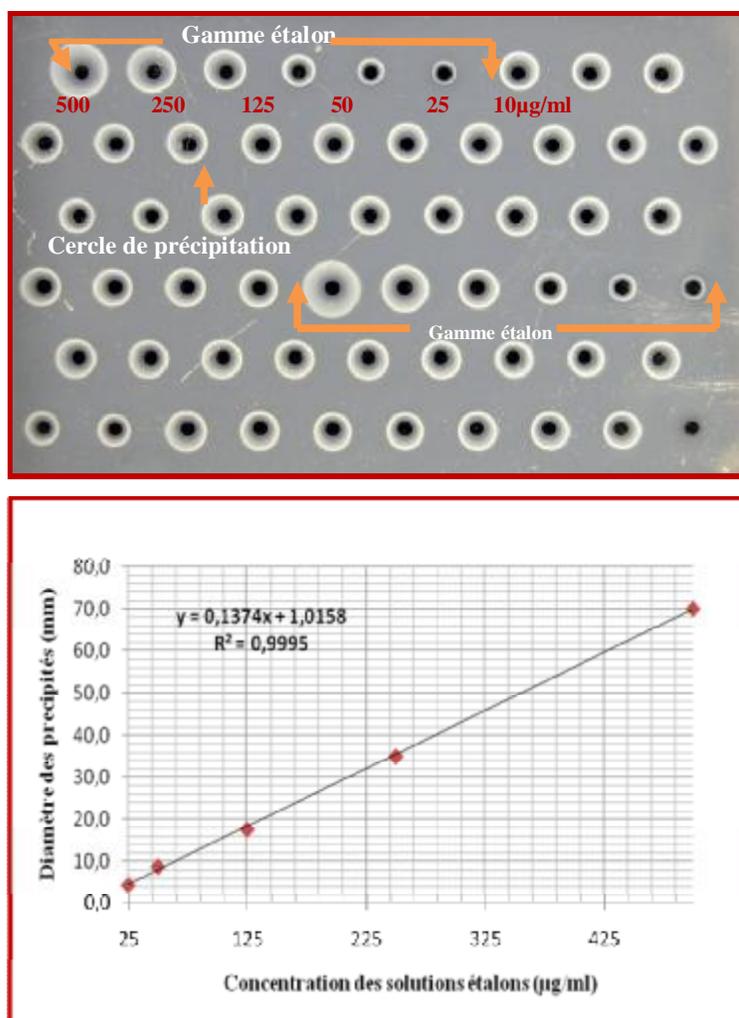
La teneur en myoglobine permet d'estimer le métabolisme oxydatif des muscles car elle représente le principal transporteur d'oxygène nécessaire au fonctionnement des voies métaboliques oxydatives (mitochondries), la teneur en ce pigment héminique étant l'isoforme principalement présent dans les muscles squelettiques à caractère peu oxydatif et représente le métabolisme glycolytique des muscles.

En ce qui concerne les mesures immunologiques, le muscle RF présente la teneur la plus importante en isoforme M4 de l'enzyme LDH suivi respectivement des muscles SM, LB et enfin ST (**Tableau13**). Pour la teneur en myoglobine, les résultats vont dans le même sens : le muscle RF possède la teneur la moins importante de l'ordre de 3,36 mg/g de muscle suivi des muscles LB, ST et SM. Il est important de noter que le coefficient de variation entre animaux est relativement plus élevé pour la teneur de la myoglobine que pour la teneur en isoforme M4. Ce coefficient de variation élevé peut avoir deux causes distinctes : une forte variation d'origine animale qui pourrait influencer alors très certainement sur la maturation et/ou la variabilité de la mesure.

L'étude du métabolisme glycolytique de ces quatre muscles, par la mesure de la teneur en isoforme M4 de l'enzyme LDH (**Figure45**) montre que le muscle RF est le muscle le plus glycolytique, puis les muscles SM et LB et enfin le muscle ST.

L'étude du métabolisme oxydatif de ces quatre muscles, par la mesure de la teneur en myoglobine (**Figure46**), met en évidence que les muscles RF et LB sont les muscles les moins oxydatifs tandis que les deux autres muscles ont un métabolisme oxydatif relativement proche 8,48 et 7,31 mg/g de muscle pour les muscles SM et ST, respectivement.

Compte tenu du taux relativement élevé de myoglobine et d'isoforme M4 de la LDH, le muscle SM peut être classé comme étant de type rouge rapide et donc à la fois glycolytique et oxydatif. A l'inverse, le muscle ST serait en majorité très oxydatif et beaucoup moins glycolytique que les autres pour lesquels le métabolisme oxydatif est très équivalent. Cela confirme les résultats antérieurs suggérant que, chez l'agneau, il est souvent admis que les muscles sont mixtes et possèdent beaucoup de fibre rouge rapide (type IIB).



**Figure 45 :** Exemple de quantification de l'isoforme M4 de l'enzyme LDH du muscle SM d'ovine par immunodiffusion radiale. La courbe étalon est obtenue en portant le diamètre des cercles de précipité en fonction des différentes concentrations en solutions étalons. A partir de cette courbe, on en déduit la concentration de chaque extrait de muscle en isoforme M4 de l'enzyme LDH

**Tableau 13.** Caractéristique physiologiques des muscles étudiés

	Métabolisme					
	Métabolisme glycolytique			Métabolisme oxydatif		
	Teneur en isoforme M4 de l'enzyme LDH (mg/g de muscle)			Teneur en myoglobine (mg/g de muscle)		
	Moyenne.	ET	CV(%)	Moyenne.	ET	CV(%)
SM	3,82	1,68	43,8	8,48	4,77	56,21
ST	2,05	0,95	46,6	7,31	4,80	65,68
RF	3,85	1,43	37,38	3,36	1,15	34,44
LB	3,73	1,01	27,17	5,44	1,73	31,81

Les moyennes, les écart-type et les coefficients de variation ont été calculés à partir des mesures des cinq animaux et le dosage à été répété quatre fois.

### **2. 3. Effet du facteur animal et/ou du facteur muscle sur les paramètres estimés au stade d'abattage**

L'analyse de variance (**Tableau 14**) réalisée dans le cadre de cette expérience a pour but d'identifier l'effet animal et l'effet type de muscle sur les variables mesurées au stade d'abattage. Pour la teneur en isoforme M4 de l'enzyme LDH et le teneur en myoglobine, l'analyse de variance a été réalisée à partir des 5 animaux, et des quatre muscles SM, ST, RF et LB et d'au moins quatre répétitions par muscle.

En ce qui concerne le métabolisme glycolytique, le facteur animal, ainsi que le facteur type de muscle, ont un effet hautement significatif sur la teneur en isoforme M4 de l'enzyme LDH ( $P < 0,0001$ ). L'interaction animal  $\times$  muscle est hautement significative, ce qui signifie que l'état glycolytique du muscle dépend étroitement de l'animal considéré.

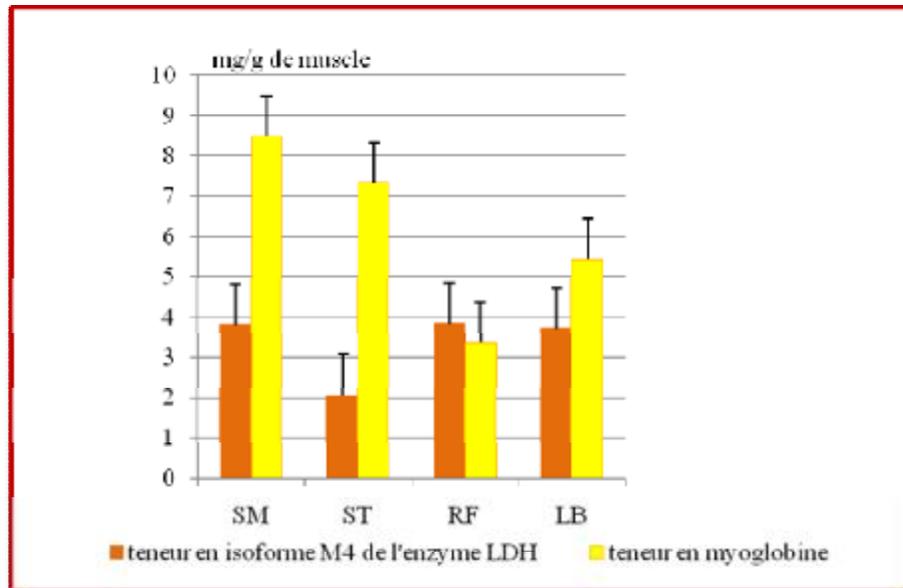
En ce qui concerne le métabolisme oxydatif, le facteur animal a un effet significatif sur la mesure de la teneur en myoglobine ( $P < 0,5$ ). Le facteur type de muscle, quand à lui, a un effet hautement significatif sur la teneur en myoglobine ( $P < 0,0001$ ). Comme pour le métabolisme glycolytique, l'interaction animal  $\times$  muscle est hautement significative.

### **2. 4. Discussion sur le métabolisme des muscles étudiés**

Les muscles squelettiques consistent en un ensemble de fibres qui peuvent être classées en trois groupes distincts : les fibres à vitesse de contraction lente et à métabolisme principalement oxydatif, ou fibre de type I ; les fibres à vitesse de contraction rapide et à métabolisme glycolytique et oxydative, ou fibre de type IIA, et les fibres à vitesse de contraction rapide et à métabolisme principalement glycolytique ou fibre de type IIB (Hunt et Hedricks, 1977 ; Klont, 1998).

De nombreuses études biochimiques concernant le métabolisme des muscles ont été réalisées sur le porc (Monin et al, 1987), le lapin (Peter et al. 1972), le mouton (Briand et al. 1981), le bovin (Lacourt 1973. Hunt et Hedricks 1977 ; Totland et al., 1988 et Zamora et al., 1997) et l'agneau (Ouali et al., 1988 ; Sayd et al., 1998).

Nos résultats corroborent ceux de Sayd et al. 1998, bien que ces auteurs trouvent des valeurs deux fois supérieures à celles de notre étude pour les dosages de la teneur en isoforme M4 de l'enzyme LDH (8,6 , 9,2 , 7,5 mg/g de muscle respectivement pour le muscle ST, SM



**Figure46.** Caractéristiques physiologiques des muscles à 1 *post mortem* des cinq animaux

**Tableau 14.** Analyse de variance des paramètres mesurés au stade d'abattage

Variables	Source de variation	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Test F	Probabilité
<b>Isoforme M4 LDH</b>	Animal	4	14,21	14,065	<0,0001
	Muscle	3	13,38	10,89	<0,0001
	Animal × Muscle	18	6,247	35,31	<0,0001
<b>Myoglobine</b>	Animal	4	13,871	0,916	<0,5
	Muscle	3	126,265	12,014	<0,0001
	Animal × Muscle	18	42,803	7,332	<0,0001

et RF). Cette contradiction entre les 2 études résulte probablement d'une différence dans les modes d'élevage et dans les races utilisées.

La plupart des études sur le métabolisme des muscles réalisées sur le bovin ont été effectuées à partir de méthodes histologiques ou histochimiques (Lacourt, 1973 ; Hunt et Hedricks, 1977 ; Totland et al., 1988). Par conséquent, les résultats mis en évidence dans cette étude ne sont comparables qu'à peu de résultats parus dans la littérature.

L'observation à l'œil nu des quatre muscles permet de voir les différences, en particulier couleur. Le muscle RF se distingue nettement des autres muscles (**figure 47**). Chez les ovins, les muscles rouges rapides pourraient être facilement distingués des muscles blancs rapides (Monin, 1981 ; Briand et al., 1981 a,b) sur la base du typage et de la vitesse de contraction.

Les résultats obtenus par la méthode d'immunodiffusion radiale permettent de séparer les quatre muscles étudiés en trois classes distinctes :

Le muscle RF possède un métabolisme glycolytique, et peut être considéré comme un muscle blanc rapide du type IIA selon la classification de Ashmore et Doerr 1971. Ce résultat est en accord avec l'étude de Geay et al., 2002.

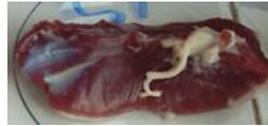
Les muscles SM et ST possèdent un métabolisme essentiellement oxydatif : ce sont des muscles rouges à contraction lente pour ST et rouge rapide pour SM. Nos résultats confirment plusieurs travaux réalisés chez différentes espèces sur le muscle SM, qui se compose principalement de fibres lentes oxydatives du type I (Jurie et al., 1995 ; Gondret et Bomneau, 1998 ; Hamelin et al., 2004). Une étude faite chez les bovins sur le muscle ST a démontré que ce muscle est mixte (Picard et al., 2003). Cette différence de résultats peut être expliquée par la variation entre espèces.

Le muscle LB possède un métabolisme intermédiaire entre le type I et IIA, et nous ne disposons que de peu de données sur ce type de muscle.

Cependant, il faut noter que pour la majorité des paramètres mesurés après abattage, les valeurs obtenues varient beaucoup en fonction des animaux. Pour compléter cette classification, il aurait fallu faire d'autres mesures et en particulier évaluer la vitesse de contraction par mesure de l'activité ATPasique myofibrillaire (Ouali, 1990).



*Le Semi Membranosus (SM)*



*Le Semi Tendinosus (ST)*



*Le Longissimus lumborum (LB)*



*Le Rectus Femoris (RF).*

**Figure 47.** Les Muscles SM, ST, LB, et RF différence de couleur et de vascularisation

### 3. EVOLUTION GENERALE DES PARAMETRES AVEC LE TEMPS POST MORTEM

L'attendrissage de la viande repose très largement sur les changements qui se produisent dans le muscle après la mort de l'animal, et de leur évolution au cours du temps post mortem (Valin, 1988).

#### 3. 1. Evolution de la température

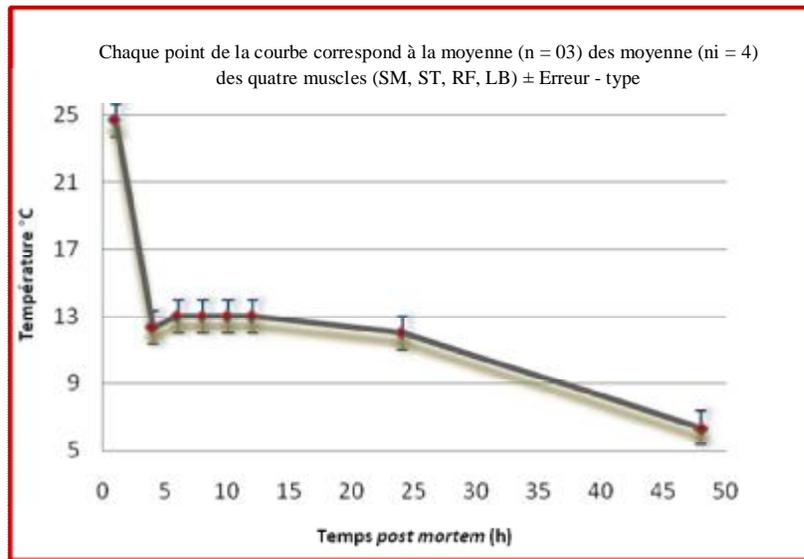
La température de stockage du muscle est un facteur très important, car elle intervient aussi bien sur les modifications physico-chimiques, que sur les modifications enzymatiques (Penny, 1985). En effet, la température a une très forte influence sur le pH, en agissant sur l'efficacité de la pompe à calcium du réticulum sarcoplasmique, mais également sur l'activité des enzymes musculaire endogène (Dransfield, 1992).

Dans notre travail, les muscles des cinq animaux ont subi le même régime thermique, afin que ce facteur ne soit pas à l'origine des différences d'attendrissage. Son évolution est illustrée par la **Figure48**. On observe une variabilité (coefficient de variation = 10) à 1h post mortem, juste après abattage, qui pourrait être la combinaison de 3 facteurs : la température de l'animal au moment de l'abattage qui ne peut expliquer qu'une partie de celle-ci, la température de l'environnement, et la résistance du muscle à la chute de la température par effet de masse.

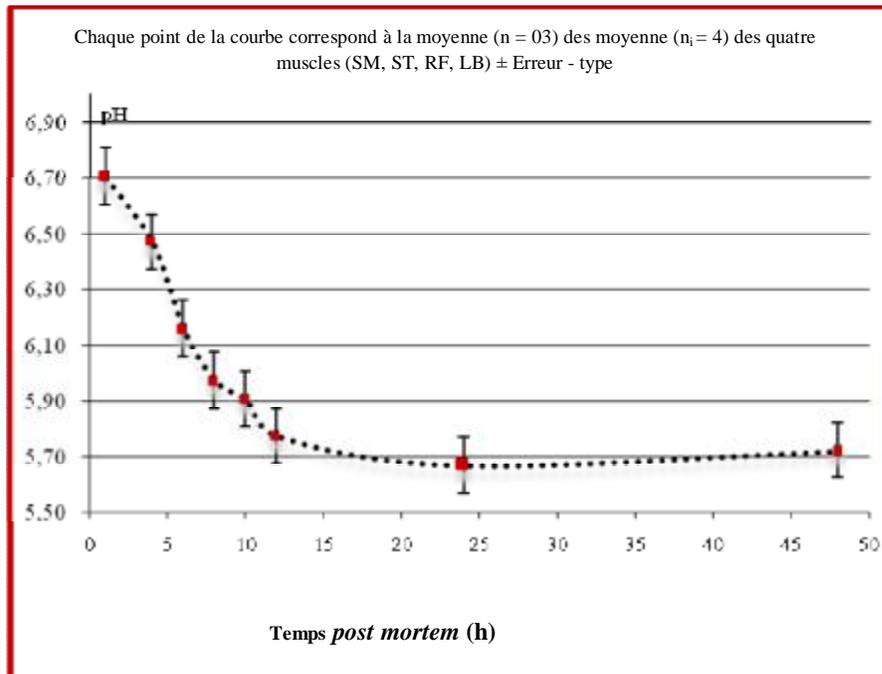
A 4h post mortem les quatre muscles atteignent des températures voisines à celle de leur conservation, qui est de 12°C. Après 24h les muscles sont incubés à 4°C pour atteindre des températures de  $6,2^{\circ}\text{C} \pm 1,2$  au cœur du muscle après 48h de conservation.

#### 3. 2. Evolution du pH

De par le rôle du pH dans la maturation de la viande, l'évolution de ce paramètre est importante. Les quatre muscles étudiés (SM, ST, LB et RF) ont le même profil d'évolution. Ce profil se caractérise par une chute exponentielle rapide jusqu'à une valeur dite ultime (pHu). Le pHu moyen pour les quatre muscles  $5.78 \pm 0.12$ , est atteint entre 12 et 24 h *post mortem* (**Figure49**). Les coefficients de variation calculés pour les différents muscles sont relativement faibles (inférieurs à 6,53 %). Aucun muscle ne présente dans notre étude une valeur du pH ultime supérieur à 6 et par conséquent, aucune viande de type DFD n'est à craindre.



**Figure 48.** Evolution de la température des quatre muscles au cours du temps *post mortem*



**Figure 49.** Profil d'évolution du pH *post mortem* en fonction du temps pour les quatre muscles

Le profil de la courbe d'évolution du pH en fonction du temps a longtemps été considéré comme étant monophasique comme le montre la **Figure 49**. En général, la courbe inclut en effet les points expérimentaux obtenus en ignorant la valeur au temps 0 qui correspond à la valeur physiologique initiale. Dans ce cas, on peut considérer la chute de pH comme une courbe monophasique. Si maintenant on ajoute à la série de point la valeur physiologique initiale, (**Figure 50**), on observe l'apparition d'au moins une discontinuité dans la courbe. Pour mieux illustrer cette polyphasie de la chute de pH, on rajoute le point correspondant au temps 0 à la courbe d'évolution du muscle SM et on observe alors un plateau détectable entre les temps 2 et 4 h post mortem. Les différents cas de figure rencontrés pour les autres muscles sont illustrés dans la **figure 51**. La vitesse globale de chute du pH varie entre 0,21 Unité pH par heure. Un seul palier est observé entre 1 et 6 h et la vitesse de chute estimée dans cette plage est de 0,18 unité pH/heure. Pour le reste de la courbe (de 6 à 48 h), la vitesse de chute du pH est de 0,32 unité pH/heure. On observe donc, pendant les premières heures une relative stabilité du pH.

Quelles conséquences cette polyphasie du pH va avoir post mortem ? Au sein des cellules, des constituants à caractère acide sont remplacés par d'autres constituants à caractère plutôt basique. On peut donc s'attendre à une neutralisation partielle des protons générés par la glycolyse et par voie de conséquence, à un ralentissement du processus d'acidification. C'est ce que nous avons observé dans notre étude pour les cinq agneaux et les quatre muscles étudiés. Selon ces derniers, on peut avoir un plateau ou deux plateaux. Les **figures 50 et 51** illustrent le cas des muscles à un seul plateau et à deux plateaux respectivement. Le **tableau 15** reflète les différents cas de figure rencontrés pour les 5 agneaux étudiés.

Après l'abattage des animaux, le muscle va utiliser ses réserves énergétiques pour subvenir à ses besoins et, après épuisement de la phosphocréatine, la principale source sera le glycogène dont la dégradation est assurée par la glycolyse. Ce processus se déroule à une vitesse variable selon le type de muscle considéré mais demeure continu tant que les enzymes impliquées ne sont pas inhibées par le pH. La discontinuité dans la chute de pH observée ici ne peut donc pas s'expliquer par une diminution transitoire de la vitesse d'action de la phosphocréatine kinase ou des enzymes de la glycolyse sur leurs substrats mais par une modification transitoire du pouvoir tampon et/ou de la répartition des charges dans la cellule musculaire. Le remplacement de constituants à caractère acide (phosphatidylserine) par des constituants à caractère basique (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine) dans le

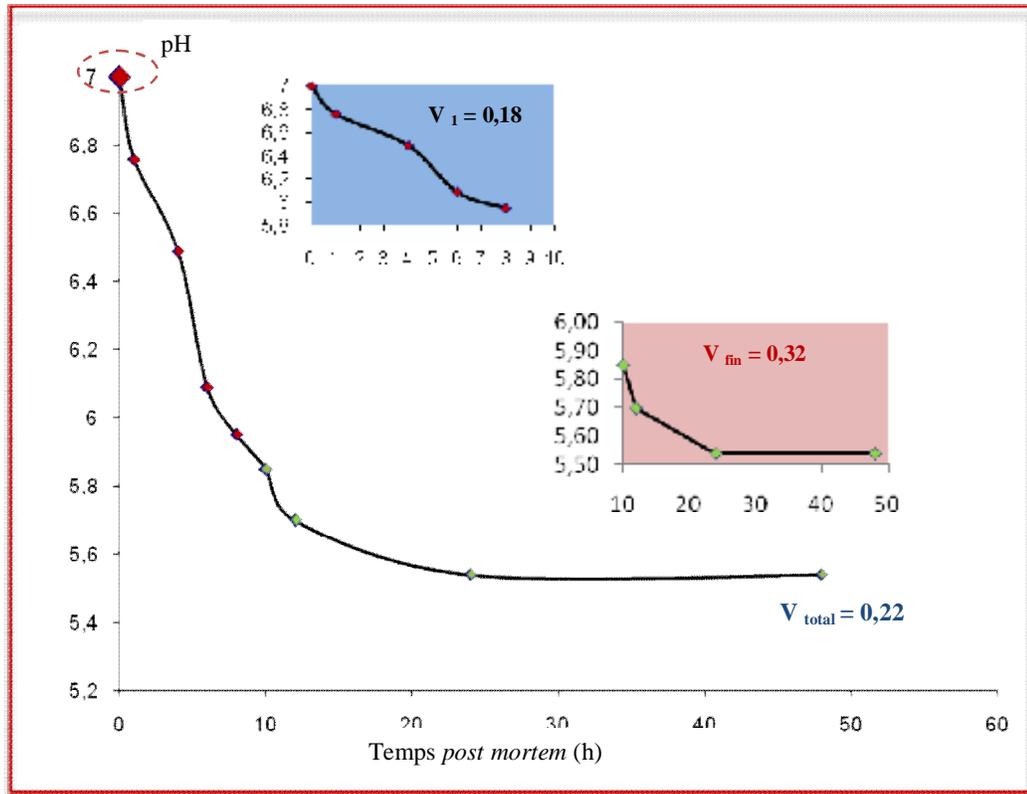


Figure 50 : Profil d'évolution du pH dans le muscle SM

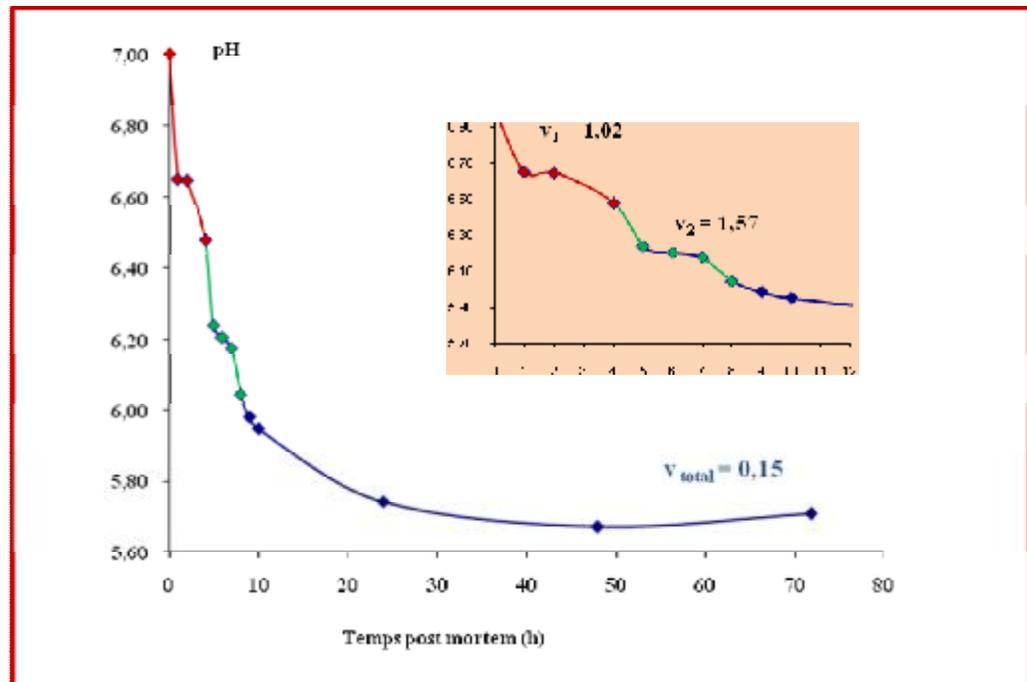


Figure 51 : Profil d'évolution du pH dans le muscle LB

compartiment intracellulaire accompagné d'une redistribution des ions pourrait expliquer ces paliers transitoires de la courbe de chute du pH. Chez le bovin, au moins, la présence de ces paliers dans une plage comprise entre 1 h et 8 h post mortem laisse penser que l'inversion de polarité de la membrane plasmique se produit durant les 8 premières heures post mortem alors que le pH est compris entre 6,4 et 6,8 environ.

A noter que le nombre de plateau semble être le déterminant le plus important pour la définition de la tendreté ultime. Ces constatations sur la polyphasie du pH et son influence sur la tendreté de la viande ont fait l'objet d'une publication dans African Journal of Agricultural Research (voir liste des publications)

*Abdelghani Boudjellal, Samira Becila, Gerald Coulis, Carlos Hernan Herrera-Mendez, Laurent Aubry, Jacques Lepetit, Khaled Harhoura, Miguel Angel Sentandreu, Hamid Aït-Amar and Ahmed Ouali (2008). Is the pH drop profile curvilinear and either monophasic or polyphasic? Consequences on the ultimate bovine meat texture. African Journal of Agricultural Research Vol. 3 (3), pp. 195-204.*

### 3. 3. Evolution de la capacité de rétention d'eau du muscle

La quantité de jus extractible, qui reflète la capacité du muscle à conserver son eau, augmente exponentiellement avec le temps post mortem quelque soit le muscle (**Figure 52**). Une valeur ultime étant atteinte environ à 24 h *post mortem*.

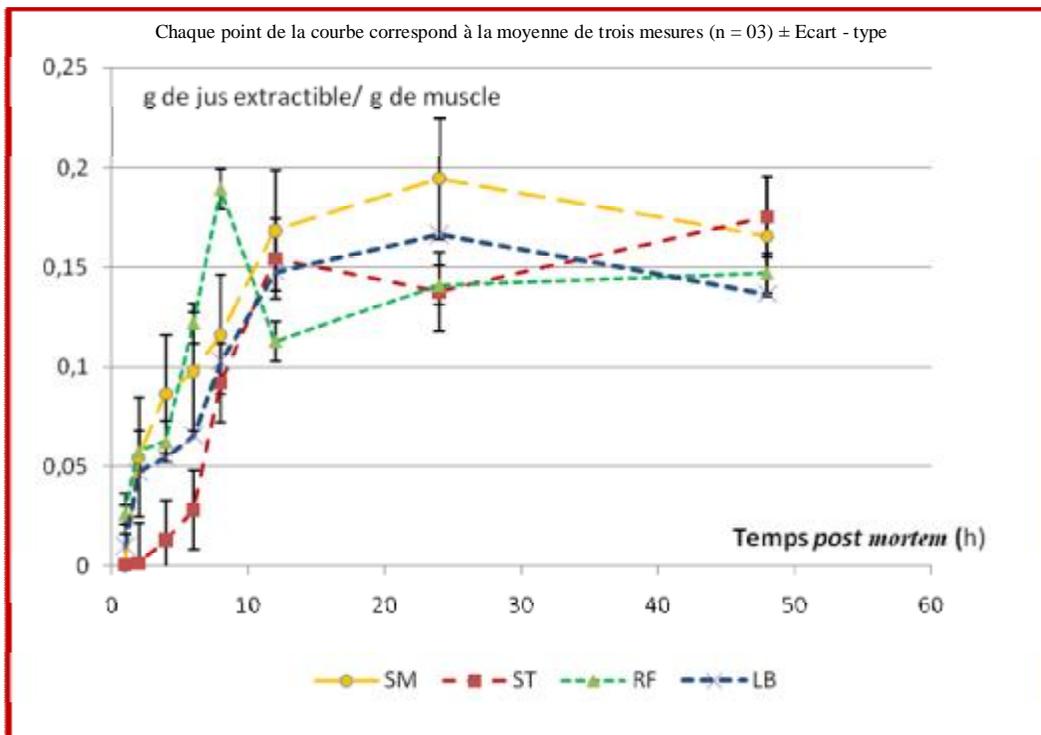
La quantité de jus extractible est à peu près identique à 1 h post mortem pour les muscles SM et ST  $0,0061 \pm 0,0114$  g/g de muscle. Cependant, cette quantité de jus est plus importante pour le muscle RF et LB (**Figure 52**). En 1975, Lawrie a rapporté que les protéines des muscles blancs sont dénaturées plus tôt que celles des muscles rouges.

D'une manière générale, l'allure d'évolution de ce paramètre corrobore avec les résultats de plusieurs travaux faits sur différentes espèces (Lee et al., 2000). Les valeurs trouvées dans notre étude sont inférieures, cela peut être expliqué par la force de centrifugation qui est plus faible pour notre étude (30 000xg au lieu de 100 000xg).

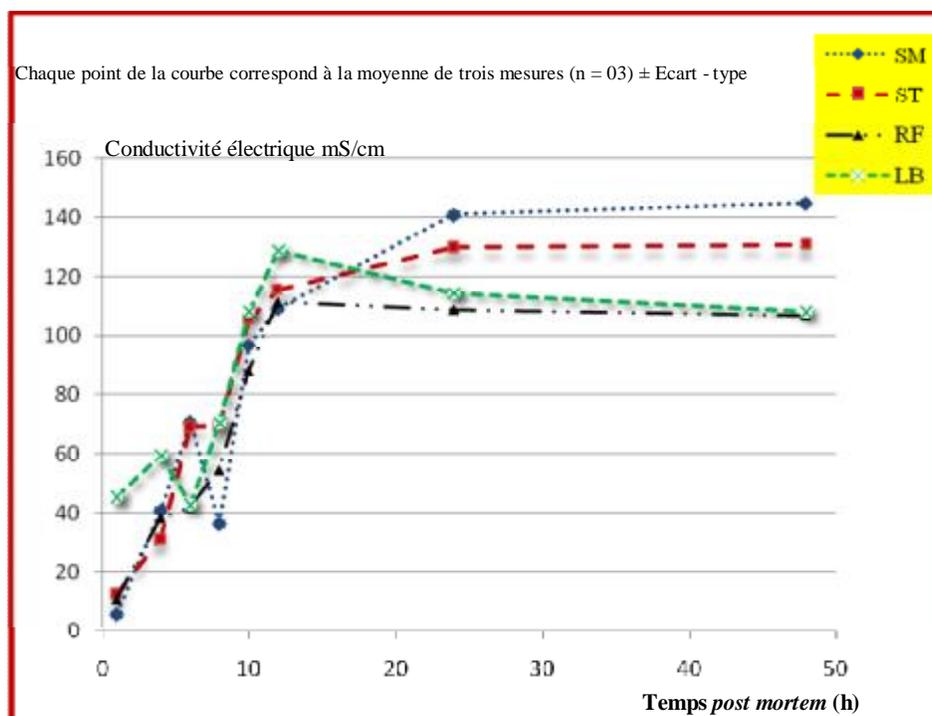
Dans cette étude, la quantité de jus extractible augmente pendant la phase rigor mortis pour atteindre, comme le pH, une valeur ultime environ à 24h post mortem, confirmant l'étroite relation existant entre ces deux paramètres (Dushyanthan et al., 1994). En 1983, Offer et Trinick ont montré que les myofibrilles étaient largement responsables de la capacité de rétention d'eau de la viande. Le pouvoir des myofibrilles à retenir l'eau est très influencé

**Tableau 15.** Nombre de plateaux observés par muscle et animal étudiés

animal muscle	A1	A2	A3	A4	A5
SM	1	1	2	1	1
ST	1	1	1	2	1
RF	1	1	1	1	1
LB	1	1	1	2	2



**Figure 52.** Profile d'évolution de la quantité de jus extractible des muscles SM, ST, RF et LB au cours du temps post mortem



**Figure 53.** Profile d'évolution de conductivité électrique des muscles SM, ST, RF et LB au cours du temps *post mortem*

**Tableau 16.** Valeurs moyenne de conductivité ( $\mu\text{S} / \text{cm}$ ) des quatre muscles

Muscle	Temps post mortem	Moyenne	Ecart type	CV %
SM	1 h	12,57	8,84	70,32
	24 h	129,66	24,56	18,94
ST	1 h	10,64	8,18	76,88
	24 h	108,93	25,25	23,18
RF	1 h	66,01	41,93	63,52
	24 h	92,91	37,43	40,29
LB	1 h	45,33	33,54	73,99
	24 h	114,37	41,35	36,16

par la chute du pH post mortem : en s'approchant de leur point isoélectrique, le pH agit sur les liaisons eau/protéines, qui conduit à une diminution de la quantité d'eau immobilisée dans le réseau protéique (Hamm, 1982).

### 3. 4. Evolution de la conductivité électrique

De nombreuses études ont été menées depuis les années 1970 sur les propriétés électriques de la viande dans le but de mettre au point un capteur rapide et non destructif fournissant des indications sur différentes caractéristiques qualitatives de la viande.

L'évolution de ce paramètre montre une allure globalement croissante au cours du temps *post mortem* pour les quatre muscles jusqu'à 12 h. Au-delà, on atteint un plateau qui persiste jusqu'à la fin du stockage (**Figure 53**). La valeur moyenne de conductivité électrique à 1 h post mortem est de  $33,63 \pm 15,16$  mS/cm pour les quatre muscles. La conductivité électrique va augmenter au cours du temps post mortem pour atteindre une valeur moyenne de  $116,16 \pm 18,06$  mS/cm à 10h post mortem pour les quatre muscles. A partir de 24h *post mortem*, on observe très peu de variation de la conductivité électrique pour les quatre muscles jusqu'à la fin du stockage.

Dans l'étude faite par Veiseth 2004 sur le muscle LM d'ovins, les résultats sont beaucoup plus faibles que les nôtres, leurs valeurs variant entre 8,13mS/cm à 0h *post mortem* et 9,70 mS/cm à 72h *post mortem*. La différence peut être expliquée par la différence des méthodologies utilisées pour les deux études. Bien que dans leur expérience la mesure soit faite sur du jus de viande et pas sur le muscle entier, les valeurs de conductivité trouvées ont été corrigées par rapport à la température du muscle. De plus, ils prennent un volume constant de jus pour faire la mesure ce qui explique la très faible variation au cours du temps, résultat observé lors de la mise au point de la technique. Pour nos résultats, ils n'ont pas été corrigés par rapport à la température du muscle, mais la mesure est faite à la même température de 25°C. Notre mesure est également faite sur le jus entier, d'où l'évolution observée au cours du temps post mortem.

Il ressort de notre étude une grande variation des mesures pendant les premières heures, avec des coefficients de variation très important (**tableau 16**). Cette variation peut s'expliquer par le fait, qu'à 1 h *post mortem*, le jus extractible est très faible et donc la mesure de la conductivité électrique est très délicate. Aux autres temps *post mortem* et jusqu'à 48 h, la variation serait due à la variabilité entre animaux et à la précision de la technique. Au bout

de 48 h de conservation à 4°C, la viande exsude et il y a perte d'eau de la masse. La conductivité électrique en diminuant montre une plus grande variabilité, ceci est à rapporter probablement à des différences de perte d'eau de la viande au cours de la conservation

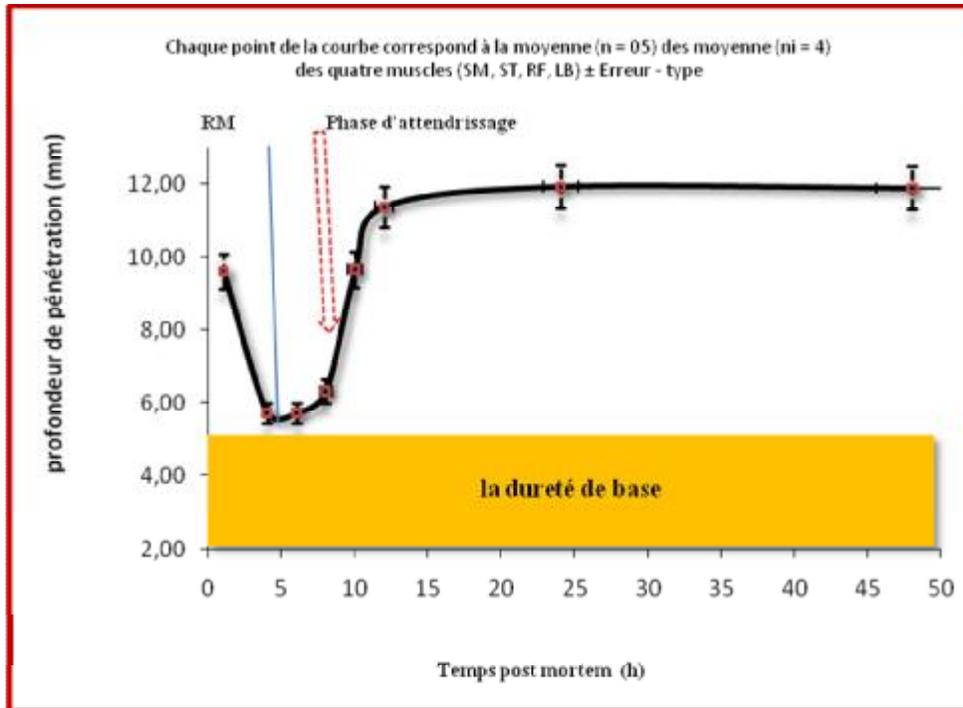
Plusieurs travaux sur la mesure de l'impédance sur le muscle entier montrent un abaissement de ce paramètre au cours du temps. Les tissus biologiques et la viande en particulier sont anisotropes vis-à-vis de l'impédance, c'est-à-dire que l'impédance varie selon que le courant se propage parallèlement ou perpendiculairement aux fibres musculaires. L'impédance de la viande diminue rapidement à la *rigor* puis continue à diminuer, mais beaucoup plus lentement au cours du stockage (Damez et al., 2008 ; Lepetit et al., 2002 ; Byrne et al. 2000 ; Jaud et al., 1999). Ces résultats vont dans le même sens que les nôtres puisque la conductivité électrique est inversement proportionnelle à l'impédance.

En outre les travaux de plusieurs autres groupes (Swatland 1997 ; Chizzilini et al., 1993 ; Witman et al., 1996) ont montré que l'impédance est fortement modifiée dans les viandes présentant un caractère PSE (Pale Soft Exudative). Ce défaut apparaît essentiellement dans les viandes de porc et s'accompagne d'une modification profonde de la structure des fibres musculaires. De la même façon, Salé (1974) ainsi que Charpentier et al., (1972) ont montré que la congélation conduit à une diminution importante de l'impédance. Ces études concernant les viandes PSE et les viandes congelées montrent bien le lien qui existe entre l'impédance électrique et l'état de la structure des fibres musculaires mais ces résultats, réalisées sur des matières premières très particulières, ne peuvent pas être comparés aux mesures faites dans le cadre de ce travail, mesures réalisées sur la viande ovine non congelée et sur le jus de viande et non sur le muscle entier.

### 3. 5. Evolution de la dureté de la viande

L'étude de la texture, composante importante de la qualité et de l'acceptabilité des aliments, fait intervenir des connaissances pluridisciplinaires : dans le domaine de la rhéologie et dans le domaine de l'analyse sensorielle. Les techniques rhéologiques cherchent à prédire les jugements émis par les dégustateurs. Cependant la valeur explicative des résultats de l'analyse sensorielle par la rhéologie n'est pas totalement satisfaisante.

De nombreux outils et méthodes d'évaluation de l'état de maturation de la viande ont été décrits : certaines méthodes sont basées sur les mesures biochimiques (Ouali 1984 ; Yano et al., 1995) ; d'autres, étroitement reliées aux événements biochimique de la maturation, sur



**Figure 54.** Profil d'évolution post mortem, de la dureté moyenne des quatre muscles SM, ST RF et LB estimée par pénétrométrie.

**Tableau 17.** Valeurs moyenne des profondeurs de pénétration en millimètres des quatre muscles étudiés

Temps post mortem (h)	Moyenne	Ecart type	CV %
<b>RF</b>			
1	10,48	1,30	12,40
6	8,15	1,87	22,90
48	12,18	1,32	10,84
<b>LB</b>			
1	12,44	4,01	32,24
6	9,64	1,63	16,91
48	12,18	1,32	10,84
<b>ST</b>			
1	12,61	1,10	8,69
6	9,80	3,03	30,88
48	13,31	1,33	10,00
<b>SM</b>			
1	12,82	1,47	11,48
6	10,73	1,63	15,19
48	12,89	0,52	4,02



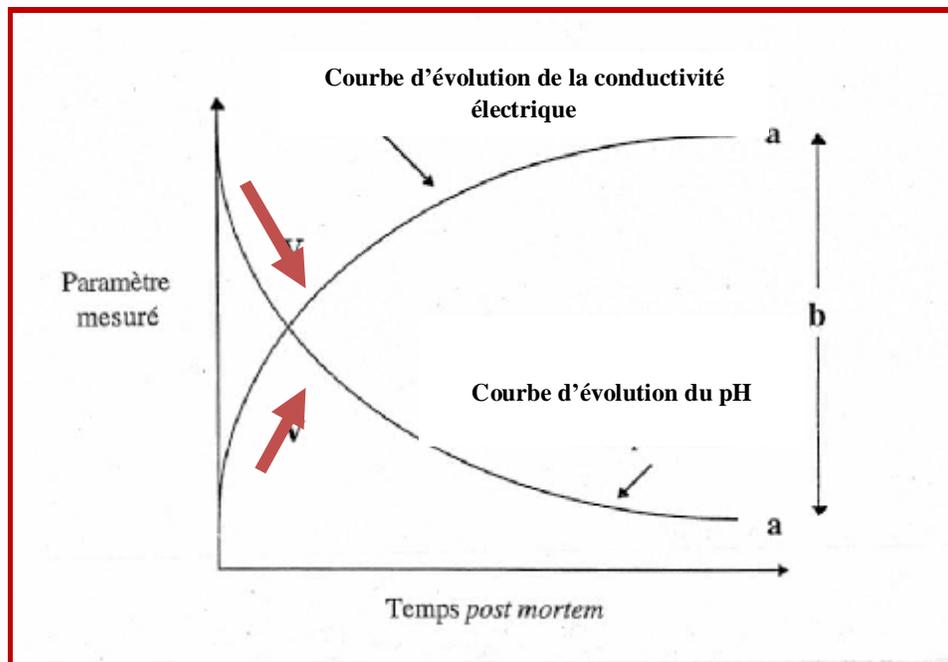
des mesures mécaniques de la résistance de la structure myofibrillaire (Lepetit et al., 1986). La résistance myofibrillaire a été mesurée dans notre étude sur la viande crue par pénétrométrie.

Plusieurs mises au point d'étalonnage de cet appareil par rapport à l'analyse sensorielle ont été réalisées dans ma thèse de magister sur un lot de 10 agneaux. Nous avons développé une méthode instrumentale basée sur la pénétrométrie que nous avons calibré par la mise en place d'un jury de dégustation, la dégustation étant la méthode de référence d'appréciation de cette qualité.

Concernant le profil d'évolution de ce paramètre, cette étude confirme les résultats antérieurs (Becila 2002 ; Boujellal 2008). Pour illustrer ce propos, nous présentons le profil d'évolution, au cours de la conservation, de la dureté moyenne des quatre muscles SM, ST RF et LB (**Figure 54**). La dureté a été estimée par pénétromètre et se trouve donc exprimée en mm de pénétration.

D'après la cinétique des quatre muscles, nous avons trois phases distinctes. La première correspond à une diminution de la tendreté au cours des 6 premières heures post mortem. Cela correspond probablement au temps nécessaire pour l'installation de la rigor mortis (RM). La deuxième phase comprise entre 8 h et 12h post mortem correspond à une résolution de la rigidité cadavérique, le muscle devenant plus tendre, et correspond vraisemblablement à la phase maturation. Au delà de 24 h post mortem, la troisième phase où la valeur finale de tendreté est atteinte. C'est une phase stable au cours du temps de conservation à 4°C. Comme nous pouvons le constater, le profil est identique à ceux rapportés pour le bovin, espèce pour laquelle la dureté est estimée soit par des tests de cisaillement soit par des tests de compression à 20% de déformation (Ouali, 1984).

A 1h post mortem le muscle le plus dure est RF, les trois autres muscles ayant des valeurs similaires (**Tableau 17**) suivi des muscles LB et ST, le SM étant le plus tendre (RF : 10,48, LB : 12,44 ; ST : 12,61 ; SM : 12,82). La tendreté diminue au cours du temps post mortem pour les quatre muscles mais la vitesse d'évolution est différente entre les muscles. Entre 6h et 48h post mortem, la tendreté diminue de 83,27 % pour SM, 73,63% pour ST, 79,16% pour LB et seulement de 66,93% pour le muscle RF. A 4h le muscle le plus tendre est le muscle ST, puis SM et enfin LB et RF. Cependant pour le même muscle, la cinétique de



**Figure 55.** Détermination de la valeur finale, la vitesse et l'amplitude d'évolution des paramètres suivis en cinétique

l'attendrissage de la viande varie beaucoup en fonction des animaux. Ainsi, le coefficient de variation de la dureté à 1h post mortem est égal à 32,24 pour le muscle ST.

#### 2. 4. CARACTERISATION DES CINÉTIQUES DES PARAMÈTRES ETUDIÉS

Les variables suivies en cinétique (pH, conductivité électrique, osmolarité, rétention d'eau des protéines myofibrillaires) à été caractérisée à partir de la courbe obtenue en fonction du temps post mortem (**Figure 55**). Un ajustement, à l'aide d'une équation monomoléculaire. Cet ajustement nous permet de déterminer l'amplitude d'évolution et la vitesse d'évolution des différents paramètres mesurés (Zamora et al., 1996).

$$Y = a - b \exp^{-K \times X}$$

Où

Y : représente le paramètre étudié,

a : représente la valeur de la variable mesurée à 1 h *post mortem*,

b : la valeur de la variable mesurée à 48 h *post mortem*

a-b : représente l'amplitude entre la valeur initiale à 1h *post mortem* et la valeur ultime à 48 h *post mortem*,

K : la constante de vitesse d'évolution des paramètres mesurés,

X : représente le temps *post mortem*.

La cinétique d'évolution de la dureté de la viande mesurée par pénétrométrie a été caractérisée en deux étapes :

- Ø La première étape de *rigor mortis* de 1h à 6h post mortem a été caractérisée par une équation de régression linéaire du type  $Y = a X + B$

Où Y représente la tendreté, a, la vitesse de la cinétique d'évolution, b, le régresseur et X le temps.

L'amplitude de cette étape a été calculée à partir de la différence entre la valeur initiale à 1h *post mortem* et la valeur à 6 h *post mortem*

- Ø La deuxième phase d'attendrissage qui commence en fin de *rigor mortis* (8h *post mortem*) jusqu'à 48h *post mortem* a été ajustée avec le modèle monomoléculaire (**Figure 55**)

Les quatre muscles étudiés ont subi un régime thermique identique pour éviter les différences d'attendrissage pouvant survenir. La température n'est donc pas prise en compte dans le modèle.

Les variables déterminées pour chaque cinétique et paramètres mesurés vont servir à étudier la variabilité liée à l'animal et au type de muscle, ainsi qu'à la recherche de corrélation entre la dureté et les différents paramètres physicochimiques mesurés

## **2. 5. EFFET DU FACTEUR ANIMAL ET /OU FACTEUR MUSCLE SUR LES PARAMETRES MESURES EN CINETIQUE**

La diminution du pH, l'augmentation de l'osmolarité et l'augmentation de la quantité de jus extractible sont des phénomènes physicochimiques connus, se produisant dans le muscle post mortem (Ouali, 1990). Cependant, si en fonction des conditions technologiques utilisées post mortem (stimulation électrique, désossage à chaud, condition de réfrigération), ces processus s'effectuent plus ou moins rapidement, cette étude montre que leur vitesse et leur amplitude d'évolution sont également très variables d'un animal à un autre et également d'un muscle à un autre.

Des analyses de variance ont été effectuées afin de déterminer si l'effet du facteur animal et du facteur type de muscle est significatifs ou non sur les valeurs des paramètres physicochimiques suivis au cours du temps post mortem (**tableau 18**).

En ce qui concerne le pH, l'analyse de variance met en évidence un effet lié à l'animal hautement significatif dans le cas du pH initial, ultime, de la vitesse et de l'amplitude du profil. L'effet type de muscle est non significatif dans le cas du pH. On note aucun effet significatif du facteur muscle et de l'interaction Muscle x Animal sur ces paramètres. L'acidification du muscle est principalement la conséquence de l'accumulation des protons provenant de l'hydrolyse de l'ATP pendant la phase de rigor mortis (Valin, 1988). Par conséquent, la vitesse d'hydrolyse de l'ATP définit la vitesse de chute du pH post mortem (Bendall, 1978). Bien que le muscle étudié soit le même, le pourcentage de myosine de type rapide (type IIA et IIB) n'est pas identique pour tous les animaux. Ces différences, bien que légères, existent entre les animaux et peuvent être à l'origine des différences de vitesse d'hydrolyse de l'ATP et donc de la vitesse de chute de pH observée. De même des différences de pouvoir tampon des muscles existant entre les animaux pourraient être responsable de la variabilité observée. L'amplitude de chute de pH dépend, quant à elle, plus de la quantité de réserves énergétiques (glycogène, phosphocréatine) du muscle qui sont susceptibles d'entretenir la dégradation de l'ATP (Bendall, 1979). De même, il existe certainement entre

**Tableau 18.** Evaluation, par analyse de variance, de l'effet animal et/ou effet muscle sur le pH, le jus extractible, la conductivité électrique et la dureté de la viande mesurée par pénétrométrie

Paramètres mesurés		Source de variation	Degrés de liberté	Test F	Probabilité
pH	Initial	Muscle	3	0,566	0,645 <sup>NS</sup>
		Animal	4	9,075	0,0001**
		Muscle x Animal	18	125,533	0,070 <sup>NS</sup>
	Ultime	Muscle	3	0,685	0,574 <sup>NS</sup>
		Animal	4	9,481	0,0001**
		Muscle x Animal	18	11,041	0,233 <sup>NS</sup>
	Amplitude	Muscle	3	0,711	0,559 <sup>NS</sup>
		Animal	4	12,322	0,0001**
		Muscle x Animal	18	15,835	0,196 <sup>NS</sup>
	vitesse	Muscle	3	0,852	0,743 <sup>NS</sup>
		Animal	4	10,481	0,0001**
		Muscle x Animal	18	11,941	0,337 <sup>NS</sup>
Jus extractible	Initial	Muscle	3	1,301	0,347 <sup>NS</sup>
		Animal	4	0,694	0,585 <sup>NS</sup>
		Muscle x Animal	18	151170,327	0,002*
	Ultime	Muscle	3	0,722	0,570 <sup>NS</sup>
		Animal	4	14,726	0,002*
		Muscle x Animal	18	329496,129	0,001*
	Amplitude	Muscle	3	1,321	0,342 <sup>NS</sup>
		Animal	4	1,409	0,318 <sup>NS</sup>
		Muscle x Animal	18	53,068	0,106 <sup>NS</sup>
	vitesse	Muscle	3	0,321	0,743 <sup>NS</sup>
		Animal	4	379496,129	0,0001**
		Muscle x Animal	18	7,068	0,337 <sup>NS</sup>
Conductivité électrique	Initial	Muscle	3	2,131	0,185 <sup>NS</sup>
		Animal	4	1,502	0,295 <sup>NS</sup>
		Muscle x Animal	18	118,013	0,071 <sup>NS</sup>
	Ultime	Muscle	3	2,173	0,179 <sup>NS</sup>
		Animal	4	7,655	0,013*
		Muscle x Animal	18	1,484	0,567 <sup>NS</sup>
	Amplitude	Muscle	3	3,626	0,073 <sup>NS</sup>
		Animal	4	1,622	0,269 <sup>NS</sup>
		Muscle x Animal	18	4,255	0,361 <sup>NS</sup>
	vitesse	Muscle	3	2,173	0,179 <sup>NS</sup>
		Animal	4	14,655	0,0001**
		Muscle x Animal	18	1,484	0,567 <sup>NS</sup>
Dureté	Initial	Muscle	3	1,067	0,400 <sup>NS</sup>
		Animal	4	2,934	0,077 <sup>NS</sup>
		Muscle x Animal	18	629,463	0,031*
	Ultime	Muscle	3	1,367	0,300 <sup>NS</sup>
		Animal	4	22,739	0,0001**
		Muscle x Animal	18	35258,294	0,004*
	Amplitude	Muscle	3	0,819	0,508 <sup>NS</sup>
		Animal	4	5,049	0,017*
		Muscle x Animal	18	642,083	0,031*
	Valeur 6h post mortem	Muscle	3	0,677	0,583 <sup>NS</sup>
		Animal	4	6,751	0,006*
		Muscle x Animal	18	3,737	0,387 <sup>NS</sup>

p>5%<sup>NS</sup>, p<5% \* p<0,1%\*\*.

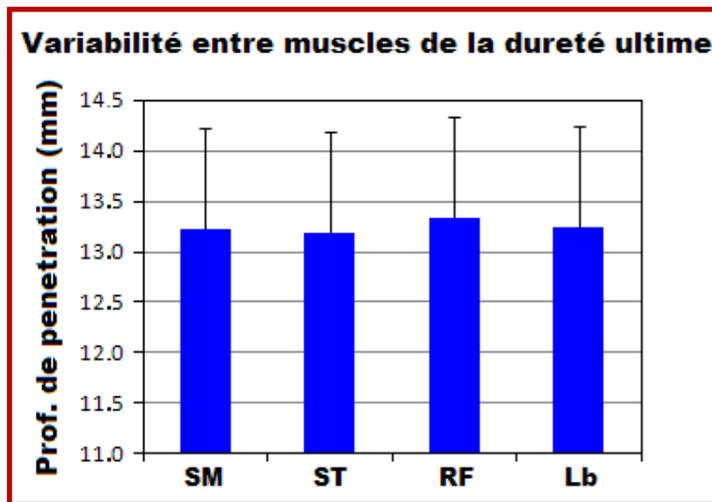
les animaux, des différences concernant la quantité de réserves énergétiques, pour un même muscle, entraînant des amplitudes de chute de pH différentes

L'analyse de variance met en évidence un effet du couple animal x muscle hautement significatif ( $P < 0,5$ ) sur la quantité de jus extractible à 1h *post mortem*, résultat tout à fait attendu du fait de la grande variabilité de cette mesure à 1h *post mortem*. L'effet lié au facteur animal et à l'interaction animal x muscle est hautement significatif pour la valeur ultime à 48h *post mortem* et la vitesse d'augmentation de la quantité de jus extractible post mortem (**tableau 18**). Cependant nous n'avons pas observé d'effet du facteur muscle sur toutes les variables bien que, en 1981, Lawrie a rapporté que les protéines des muscles blancs sont dénaturées plus tôt que celles des muscles rouges. En effet, la quantité de jus extractible est plus importante dans les muscles de type II que dans les muscles de type I. Ceci peut être expliqué par le fait que la vitesse de centrifugation est faible pour détecter une différence entre les muscles étudiés.

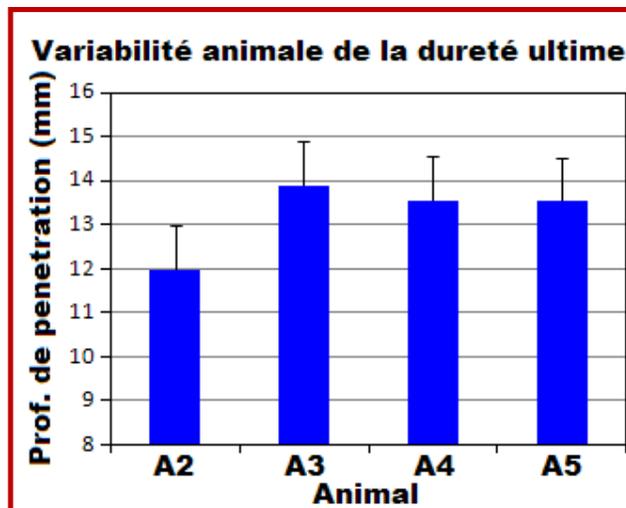
Concernant la conductivité électrique, l'analyse de variance met en évidence un effet lié à animal dans le cas de la valeur mesurée à 1h post mortem et de la vitesse. Par contre, le facteur muscle ne présente pas d'effet sur les différentes variables (**tableau 18**). Il est probable que la quantité de jus sur laquelle la mesure est faite joue un rôle primordial dans l'explication de ce résultat.

Dans cette étude, la dureté mesurée par le pénétromètre présente une grande variabilité entre animaux concernant la valeur initiale et finale ainsi que la vitesse et l'amplitude d'attendrissage (**Tableau 18**). Plusieurs travaux ont rapporté que la dureté varie de manière très importante en fonction des animaux (Paterson et Parrish 1986 ; Christtensen et al 1991 ; Shakelford et al., 1995 ; Boujellal 2008). L'interaction Animal x Muscle présente également un effet hautement significatif sur la dureté ultime et l'amplitude d'attendrissage. Par contre on n'observe pas d'effet type de muscle sur la mesure de la dureté finale par le pénétromètre. Zamora (1997) rapporte un effet lié au type de muscle très significatif ( $p < 0,1$ ).

Suite à cette analyse nous avons pu constater un effet animal hautement significatif pour la majorité des paramètres mesurés. Par contre, le facteur muscle a peu ou pas d'effet sur une majorité des paramètres mesurés



**Figure 56.** Comparaison de la dureté ultime des muscles étudiés estimée par pénétrométrie. Chaque histogramme correspond à la moyenne  $\pm$  écartype de la dureté à 48h postmortem



**Figure 57.** Dureté ultime des muscles étudiés estimée par pénétrométrie pour chacun des animaux. Chaque histogramme correspond à la moyenne  $\pm$  écartype de la dureté des 4 muscles à 48h *post mortem*

La méthodologie employée, la population étudiée, ainsi que le type de muscle sur lequel le travail a porté, ont probablement un rôle important dans les divergences observées par rapport à la littérature.

## 2.6. ANALYSE GLOBALE DES DONNEES ACQUISES

Rappelons que notre objectif était d'identifier des facteurs biologiques ou physicochimiques capables de prédire la tendreté ultime des muscles. Compte-tenu du faible nombre d'animaux, il fut impossible d'envisager la création d'un modèle de prédiction de cette qualité.

L'objectif initial a donc été réorienté vers une analyse globale des données visant à identifier des paramètres capables de discriminer les animaux ou les muscles sur la base de leur dureté ultime.

L'analyse de variance faite sur ces données a montré que l'effet animal sur les caractéristiques quantitatives considérées était généralement plus important que l'effet muscle.

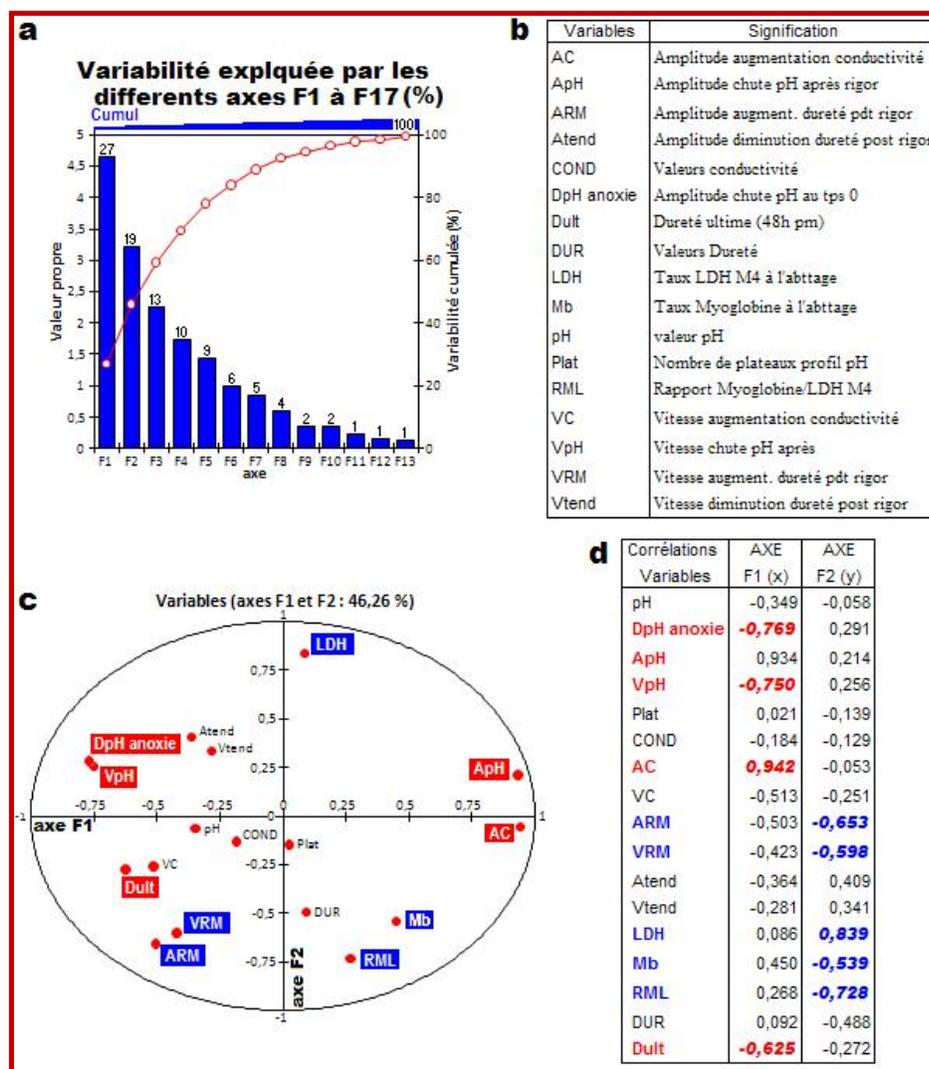
### 2.6.1. Variabilité muscles et animal de la dureté ultime

C'est le cas tout particulièrement de la dureté ultime des muscles provenant des différentes carcasses. En effet comme le montre la **Figure 56, 57**, la moyenne de la dureté des muscles Semimembranosus (SM), Semitendinosus (ST), Rectus fémoris (RF) et Longissimus lombarum (Lb) est très similaire et se situe entre 13 et 13.5 mm. De plus, les écart types très importants observés témoignent d'une grande variabilité entre animaux. On comprend pourquoi l'analyse de variance indiquait un effet muscle non significatif sur cette variable ou sur l'ensemble des autres variables caractérisant la dureté.

### 2.6.2. Analyse en composantes principales des données et cercle de corrélation

L'ACP est une méthode très efficace pour l'analyse de données quantitatives se présentant sous la forme de tableaux à M observations / N variables. Elle permet de :

- visualiser et analyser rapidement les corrélations entre les N variables,
- visualiser et analyser les M observations initialement décrites par N variables sur un



**Figure 58.** (a) Cercle de corrélation représentant la projection des variables sur le plan défini par les 2 premiers axes expliquant au moins 46% de la variabilité observée : Axe 1 = axe horizontal (représente 27% de l'information initiale) ; Axe 2 = axe vertical (représente 19% de l'information initiale). (b) Corrélations des variables avec les axes F1 et F2 et identification, par des couleurs, des variables qui se projettent le mieux sur chacun de ces axes. (c) Variabilité expliquée par les différents axes F1 à F13 exprimée en %.

graphique à X dimensions (axes), construit de manière à ce que la dispersion entre les données soit aussi bien préservée que possible,

- construire un ensemble de P facteurs non corrélés ( $P \leq N$ ) qui peuvent ensuite être réutilisés par d'autres méthodes (la régression par exemple).

Projection des variables sur les axes :

Si nous considérons les deux premiers axes qui expliquent guère plus de 46% de la variabilité des observations réalisées sur les muscles et les animaux, on observe une projection sur le plan défini par ces axes des variables avec une corrélation variables (**Figure 58, b et c**). Pour expliquer la variabilité observée il faut considérer 13 axes (**Figure 58, a**).

Sur le cercle de corrélation, les variables situées près du cercle sont bien dans le plan défini par ces deux axes alors que celles situées au centre ne le sont probablement pas. Sur cette base, on peut statuer que l'axe F1 est surtout représenté par les variables (fond rouge) relatives au pH (ApH, VpH, DpH anoxie) et par l'amplitude d'évolution de la conductivité (AC). L'axe F2 est lui représenté principalement par les propriétés métaboliques des muscles puisque les variables (fond bleu) qui se projettent le mieux sur cet axe sont le taux de LDH M4 et le rapport Myoglobine/LDH (RML). Sur chacun de ces axes on note la projection avec une corrélation relativement importante ( $r > 0.5-0.6$ ) d'autres variables représentées en couleur dans la **Figure 58,c**.

Les variables qui se projettent sur un même axe sont corrélées entre elles positivement (ApH et AC par exemple) ou négativement (VpH et AC par exemple) alors que les variables se projetant sur deux axes différents ne sont pas corrélées entre elles (**Tableau 19**).

### 6.3. Recherche de corrélation entre les les différents paramètres mesurés

L'observation de variations concomitantes des paramètres étudiés nous suggèrent la recherche d'éventuelles relations entre les différentes variables physico-chimiques au cours de l'attendrissage de la viande. A cette fin nous avons testé de corrélation. Il est donc important de déterminer quelles variables biologiques sont susceptibles d'expliquer cette variabilité.

Les variables choisies pour mieux représenter les cinétiques des paramètres mesurées sont :

- le facteur temps post mortem
- Les variables mesurées au stade d'abattage, c'est-à-dire la teneur en myoglobine du muscle ainsi que la teneur en isoforme M4 de l'enzyme LDH.
- La valeur du pH à 1h *post mortem* qui représente le point d'anoxie du muscle
- Les vitesses et les amplitudes d'évolution des variables suivies en cinétique à savoir le pH, la conductivité, et la dureté au stade de *rigor mortis* et au stade ultime de maturation.

Vu que la mesure de la conductivité électrique, l'osmolarité et la capacité de rétention d'eau sont très liées. Pour la recherche de corrélation nous avons choisi la conductivité électrique qui sera représentative des deux autres paramètres.

La température n'est pas intégrée dans le modèle car les quatre muscles ont subi un même régime thermique. Cela évite que ce facteur température ne soit pas à l'origine de différence d'attendrissage entre les muscles.

L'observation des coefficients de corrélations (**tableau 19**) montre, le pH à 1h post mortem ( $D_{pH \text{ anoxie}}$ ) est significativement ( $P < 0.0001$ ) corrélé négativement à l'amplitude d'augmentation de la conductivité électrique ( $r = -0,82$ ) au temps post mortem. Byrne et al., 2000 ont observé une forte corrélation entre la conductivité électrique mesurée sur le muscle et le pH à 7h post mortem

Dès 1936, il a été prouvé par Callow que la conductivité électrique est très liée au pH. Cette relation a été utilisée depuis les années 1970 pour le contrôle de la chute de pH ou encore l'évaluation du pH ultime, ceci principalement dans la viande de porc mais également sur la viande bovine. Dans le cas du porc, un des problèmes majeurs est la détection des viandes PSE, qui présentent un bas pH et sont fortement exsudatives, et donc impropres à la transformation (Oliver 1991 ; Garrido et al., 1995 ; Reichert 1996). Dans le cas du bovin le problème est l'apparition de viandes DFD à pH élevé et qui se conservent mal (Lepetit 2001).

Ces deux défauts sont associés à des modifications membranaires et à des modifications du milieu extracellulaire et donc sont susceptibles d'affecter les propriétés électriques. Les mesures électriques ont été utilisées pour pallier à l'imprécision des mesures de pH. La majorité des études dans ce domaine a été focalisée sur la détection précoce des défauts, c. a. d. à 45 min ou 1h après l'abattage.

**Tableau 19.** Matrice de corrélation entre les différents paramètres mesurés

Variables	Tps	pH	DpH anoxie	ApH	VpH	Plat	COND	AC	VC	DUR	ARM	VRM	Atend	Vtend	LDH	Mb
<b>Tps</b>	<b>1</b>	<b>-0,516</b>	0,007	-0,004	-0,001	-0,002	<b>0,418</b>	-0,002	0,004	<b>0,388</b>	-0,003	-0,003	-0,004	-0,002	-0,003	-0,002
<b>pH</b>	<b>-0,516</b>	<b>1</b>	<b>0,207</b>	<b>-0,301</b>	<b>0,214</b>	-0,068	<b>-0,632</b>	<b>-0,300</b>	<b>0,171</b>	-0,100	<b>0,196</b>	<b>0,159</b>	0,050	0,033	<b>-0,117</b>	-0,080
<b>DpH anoxie</b>	0,007	<b>0,207</b>	<b>1</b>	<b>-0,692</b>	<b>0,606</b>	<b>-0,145</b>	<b>0,114</b>	<b>-0,820</b>	<b>0,224</b>	<b>-0,217</b>	<b>0,127</b>	0,069	<b>0,424</b>	<b>0,192</b>	<b>0,224</b>	<b>-0,311</b>
<b>ApH</b>	-0,004	<b>-0,301</b>	<b>-0,692</b>	<b>1</b>	<b>-0,618</b>	0,019	<b>-0,210</b>	<b>0,875</b>	<b>-0,607</b>	0,003	<b>-0,581</b>	<b>-0,480</b>	<b>-0,122</b>	-0,093	<b>0,286</b>	<b>0,353</b>
<b>VpH</b>	-0,001	<b>0,214</b>	<b>0,606</b>	<b>-0,618</b>	<b>1</b>	-0,074	<b>0,143</b>	<b>-0,741</b>	0,057	<b>-0,172</b>	<b>0,259</b>	<b>0,222</b>	<b>0,596</b>	<b>0,344</b>	<b>0,227</b>	<b>-0,245</b>
<b>Plat</b>	-0,002	-0,068	<b>-0,145</b>	0,019	-0,074	<b>1</b>	<b>0,122</b>	<b>0,216</b>	0,087	<b>0,217</b>	0,020	<b>-0,105</b>	<b>-0,105</b>	<b>0,166</b>	<b>-0,158</b>	-0,063
<b>COND</b>	<b>0,418</b>	<b>-0,632</b>	<b>0,114</b>	<b>-0,210</b>	<b>0,143</b>	<b>0,122</b>	<b>1</b>	<b>-0,151</b>	<b>0,153</b>	<b>0,184</b>	<b>0,164</b>	0,090	-0,018	0,030	-0,059	-0,061
<b>AC</b>	-0,002	<b>-0,300</b>	<b>-0,820</b>	<b>0,875</b>	<b>-0,741</b>	<b>0,216</b>	<b>-0,151</b>	<b>1</b>	<b>-0,380</b>	<b>0,164</b>	<b>-0,451</b>	<b>-0,415</b>	<b>-0,442</b>	<b>-0,188</b>	0,018	<b>0,350</b>
<b>VC</b>	0,004	<b>0,171</b>	<b>0,224</b>	<b>-0,607</b>	0,057	0,087	<b>0,153</b>	<b>-0,380</b>	<b>1</b>	<b>0,223</b>	<b>0,206</b>	0,033	<b>-0,245</b>	<b>0,185</b>	<b>-0,472</b>	<b>-0,421</b>
<b>DUR</b>	<b>0,388</b>	-0,100	<b>-0,217</b>	0,003	<b>-0,172</b>	<b>0,217</b>	<b>0,184</b>	<b>0,164</b>	<b>0,223</b>	<b>1</b>	<b>0,145</b>	0,087	<b>-0,176</b>	0,054	<b>-0,360</b>	<b>0,190</b>
<b>ARM</b>	-0,003	<b>0,196</b>	<b>0,127</b>	<b>-0,581</b>	<b>0,259</b>	0,020	<b>0,164</b>	<b>-0,451</b>	<b>0,206</b>	<b>0,145</b>	<b>1</b>	<b>0,925</b>	-0,073	<b>-0,143</b>	<b>-0,365</b>	<b>0,103</b>
<b>VRM</b>	-0,003	<b>0,159</b>	0,069	<b>-0,480</b>	<b>0,222</b>	<b>-0,105</b>	0,090	<b>-0,415</b>	0,033	0,087	<b>0,925</b>	<b>1</b>	<b>0,126</b>	-0,083	<b>-0,335</b>	<b>0,198</b>
<b>Atend</b>	-0,004	0,050	<b>0,424</b>	<b>-0,122</b>	<b>0,596</b>	<b>-0,105</b>	-0,018	<b>-0,442</b>	<b>-0,245</b>	<b>-0,176</b>	-0,073	<b>0,126</b>	<b>1</b>	<b>0,591</b>	<b>0,356</b>	0,034
<b>Vtend</b>	-0,002	0,033	<b>0,192</b>	-0,093	<b>0,344</b>	<b>0,166</b>	0,030	<b>-0,188</b>	<b>0,185</b>	0,054	<b>-0,143</b>	-0,083	<b>0,591</b>	<b>1</b>	<b>0,166</b>	<b>-0,177</b>
<b>LDH</b>	-0,003	<b>-0,117</b>	<b>0,224</b>	<b>0,286</b>	<b>0,227</b>	<b>-0,158</b>	-0,059	0,018	<b>-0,472</b>	<b>-0,360</b>	<b>-0,365</b>	<b>-0,335</b>	<b>0,356</b>	<b>0,166</b>	<b>1</b>	<b>-0,341</b>
<b>Mb</b>	-0,002	-0,080	<b>-0,311</b>	<b>0,353</b>	<b>-0,245</b>	-0,063	-0,061	<b>0,350</b>	<b>-0,421</b>	<b>0,190</b>	<b>0,103</b>	<b>0,198</b>	0,034	<b>-0,177</b>	<b>-0,341</b>	<b>1</b>

*Les valeurs en gras sont significativement différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0,05$*

**Tps** Temps post mortem ; **DpH anoxie** : pH à 0h post mortem ; **ApH** : amplitude de chute de pH (entre 0h-24h) ; **VpH** : vitesse de chute de pH ; **Plat** : nombre de plateau pour le pH ; **COND** : conductivité électrique ; **AC** : amplitude d'augmentation de la conductivité électrique (entre 1h-24h) ; **VC** : vitesse d'augmentation de la conductivité électrique ; **DUR** : valeurs de la dureté mesurées par pénétrométrie ; **ARM** : amplitude de chute de la profondeur de pénétration pour la phase de la rigor mortis (entre 1h-6h) ; **VRM** : vitesse de chute de la profondeur de pénétration pour la phase de rigor mortis (entre 1h-6h) ; **ATend** : amplitude de la phase d'attendrissage (entre 8h- 48h) ; **VTend** : vitesse de la phase d'attendrissage (entre 8h- 48h) ; **LDH** : teneur en isoforme M4 de l'enzyme LDH ; **Mb** : teneur en myoglobine dans le muscle.

Les résultats des travaux de Jaud 1992 montrent que cette détection précoce n'est pas fiable. Par contre, l'impédance (conductivité) est plus à même de permettre une détection des viandes PSE lorsque le pH ultime est atteint. Toutefois les mesures électriques ne permettent pas la détection des viandes DFD. La difficulté à détecter les viandes PSE pendant l'installation de la rigor tient au fait que pendant cette période le produit est en rapide évolution (pH, température) et que les modifications métaboliques qui se déroulent n'auront d'effet sur la structure et donc sur les propriétés électriques qu'ultérieurement.

Les variables les plus corrélées à la dureté de la viande le pH à 1h post mortem qui représente l'état d'anoxie du muscle est corrélé positivement à l'amplitude d'attendrissage de la viande ( $r = 0,42$  ;  $p < 0,0001$ ) : plus le pH à 1h est bas, plus le muscle est dur (**tableau19**). L'amplitude d'attendrissage (Atend) est aussi corrélée positivement à la vitesse de chute de pH ( $r = 0,59$  ;  $p < 0,0001$ ). Le pH influence la dureté de la viande en agissant sur la structure myofibrillaire (Bouton et al., 1982) la dureté du muscle est également corrélée négativement au nombre de plateaux observés dans l'évolution du pH au cours du temps ( $r = -0,22$  ;  $p < 0,0001$ ) : donc plus le nombre de plateaux augmente plus la viande est dure ce qui corrobore avec les résultats obtenus par Boujellal et al., 2008 sur de la viande bovine. Cependant, le rôle du pH dans l'attendrissage de la viande est généralement sujet à controverse dans la littérature. Le pH du muscle à 3h post mortem est un bon prédicteur de la dureté de la viande pour Marsh et al., '1988° et Marshall et Tatum (1991), mais pas pour Shakelford et al., 1994. en 1988, Valin a rapporté que plus la vitesse de chute de pH est élevée, plus la vitesse de maturation des muscles est élevée, ce qui confirme les résultats de notre étude.

La dureté est négativement corrélée à l'amplitude d'augmentation de la conductivité électrique ( $r = -0,44$  ;  $p < 0,0001$ ) : plus l'amplitude de l'augmentation de la conductivité électrique est lente au cours du stockage, plus le muscle est dur.

Dans une étude récente faite par damez et al.2008 qui vise à élaborer un système de mesure autonome pour la détermination de l'état de maturation des carcasses. Afin de permettre la commercialiser rapide de la viande. La technique repose sur la mesure d'impédance électrique sur le muscle par la méthode de mesure de l'impédance à 4 points (appelé aussi méthode à 2 électrodes). Cette technique permet de corrigé les erreurs systématiques aux bornes des deux électrodes utilisant la méthode de mesure de l'impédance

à 2 point. Les capteurs utilisant cette sonde permettent la mesure de l'impédance par la méthode 2 électrodes. Cette sonde permet d'éliminer cette chute de tension et de ne faire circuler aucun courant dans le circuit de mesure, ce qui est obtenu grâce à l'application d'un courant électrique par deux électrodes d'injection et on mesure la tension par l'intermédiaire de deux autres électrodes de mesure.

L'impédance mesurée à l'aide de cette technique a permis d'évaluer l'état de maturation avec une bonne corrélation ( $R^2 = 0,80$ ) avec la méthode de référence de la contrainte mécanique à 20 % de déformation. Cette sonde permet d'effectuer un tri sur l'état de maturation des muscles avec des résultats de bon classement proches de 90 %. La sonde circulaire couronne permet une moins bonne appréciation de l'état de maturation ( $R^2 = 0,55$ ) et permet des tris en trois classes de maturation avec des performances de bon classement de l'ordre de 80 %. Puisque la conductivité est inversement proportionnelle à l'impédance donc les résultats trouvés par Damez *et al.*, 2008 corroborent avec les notres.

#### 6.4. Analyse Factorielle Discriminante

Cette analyse va permettre de vérifier si les variables descriptives (quantitatives) mesurées permettent de distinguer différentes observations relatives aux animaux, aux muscles ou à des caractéristiques de qualité comme la dureté ultime ou la dureté aux différents temps postmortem sélectionnés.

Rappel des variables quantitatives mesurées et de la signification des sigles utilisés.

##### 6.4.1. Discrimination des animaux sur la base de l'ensemble des variables mesurées.

L'analyse factorielle discriminante réalisée prenait en compte les variables suivantes : pH, DpH, anoxie, ApH, VpH, Plat, COND, AC, VC, ARM, VRM, Atend, Vtend, LDH, Mb, RML, DUR, Dult. Les résultats sont rapportés sur les **figures 59 Aa et Ba**. Le cercle des corrélations indique que l'axe F1 est principalement défini par les variables LDH, négativement corrélée aux variables VC, ARM, VRM et Dult). L'axe F2 est défini par des variables toute relatives à la cinétique de chute du pH (ApH, VpH, DpH anoxie) ou à des paramètres corrélés au pH (AC). Sur ce plan, les animaux identifiés A2, A3, A4 et A5 sont très bien individualisés sur le plan et on peut constater que si l'axe F1 discrimine très bien les animaux A2 et A5, l'axe F2 contribue principalement à la discrimination des animaux A3 et A4.

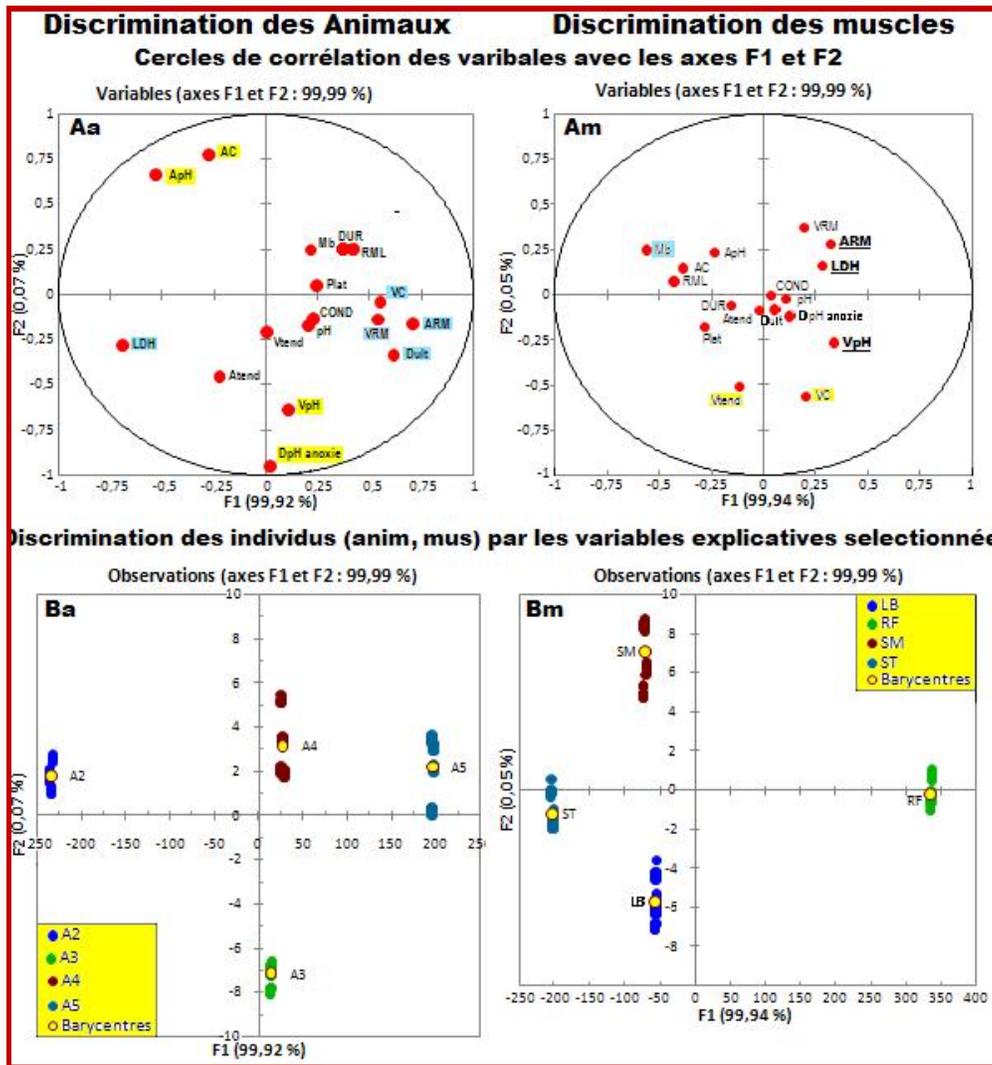
#### 6.4.2. Discrimination des muscles sur la base de l'ensemble des variables mesurées.

L'analyse factorielle discriminante réalisée prenait en compte les mêmes variables que celles utilisées pour la discrimination des animaux. Les résultats sont rapportés sur les **figures 59 Am et Bm**. Le cercle des corrélations indique que l'axe F1 est principalement défini par les variables Mb, négativement corrélée aux variables ARM, LDH et VpH qui présentent toutefois une corrélation avec cet axe inférieur à 0.5. L'axe F2 est essentiellement défini par les variables Vtend et VC qui sont fortement corrélées entre elles. Les autres variables présentent des corrélations avec cet axe inférieur à 0,25 pour la plupart d'entre elles. Sur ce plan, les muscles SM, ST, LB et RF sont très bien individualisés sur le plan et on peut constater que si l'axe F1 discrimine très bien les Muscles ST et RF, l'axe F2 contribue principalement à la discrimination des muscles SM et LB.

#### 6.4.3. Discrimination des individus (muscles et animaux) sur la base de leur dureté ultime

Pour cette analyse réalisée avec les mêmes variables que précédemment, nous avons groupés les individus sur la base de leur dureté ultime ce qui nous conduit à distinguer 15 groupes répertoriés par des lettres : A, B, C, D, E, F, G, H, K, M, N, P, R, S, T. La correspondance avec les muscles des différents animaux est indiquée sur la **Figure 60 Bdult** (une lettre pour le muscle suivie d'un chiffre pour l'animal).

Le cercle des corrélations indique que l'axe F1 est principalement défini par les variables Mb, négativement corrélée aux variables ARM et VRM caractérisant la cinétique de chute du pH avec des corrélations avec cet axe voisine de 1. L'axe F2 est principalement représenté par la variable Dult qui est la seule à présenter une corrélation avec cet axe supérieure à 0.5. Sur ce plan, la discrimination des groupes implique une contribution similaire des deux axes. Ceci apparaît clairement si on se base sur les barycentres dont la répartition est définie par les 2 axes. L'application prévoit plus de 99% d'identification des individus dans leur groupe d'origine mais ceci ne transparaît pas nettement dans la projection de ces derniers sur le plan défini par les axes F1 et F2.



**Figure 59.** Discrimination des animaux et des muscles

#### 6.4.4. Discrimination des individus sur la base de la dureté mesurée au cours du temps

Pour cette analyse réalisée avec les mêmes variables que précédemment, nous avons classé les individus dans 4 groupes correspondant à des duretés variables ((très dure, dure, tendre et très tendre), chacun de ces groupes étant identifié par une lettre (**Figure 60 B1-48**).

Le cercle des corrélations indique que l'axe F1 est essentiellement défini par la variable DUR (corrélation avec l'axe voisine de 1), ce qui n'est pas surprenant. L'axe F2 est principalement représenté par les variables VpH et ApH qui sont les seules à présenter une corrélation avec cet axe supérieure à 0.5. Sur ce plan, la discrimination des groupes se fait principalement sur l'axe 1 où les groupes se classent de la gauche vers la droite sur la base de leur dureté décroissante, A étant le groupe le plus dure et D le groupe le plus tendre. Notons que le recouvrement entre les individus des différents groupes est relativement limité.

### 7. ESTIMATION DE LA PROTEOLYSE DES PROTEINES MYOFIBRILLAIRES

Pendant la transformation du muscle en viande, les protéases endogènes du muscle dégradent les protéines structurales. Cette protéolyse post mortem, qui entraîne l'attendrissage de la viande, libère de nombreux fragments protéiques et peptidiques.

La dégradation des protéines myofibrillaires avec le temps post mortem est connue depuis longtemps (Hoagland et al., 1917) et a été longuement étudiée afin de rechercher des indicateurs ou marqueurs de la protéolyse au cours de la transformation du muscle en viande. Cependant les résultats des différents travaux ne vont pas dans le même sens.

Le suivi du profil électrophorétique dans notre étude pour les quatre muscles, a révélé une analogie dans le comportement des principales bandes (**Figure 61**). Pour les bandes à poids moléculaire supérieur à 97 kDa qui représentent en général les chaînes lourdes de myosine, la nébeline et la titine ne sont pas séparées à cause de leur poids moléculaire élevé, en outre le degré de réticulation du gel qui ne permet pas leur séparation. Ce pendant une étude faite en 1989 par Hwan et Bandman montre une dégradation de la myosine en fin de stockage à 4°C. En 1995 une étude faite par Greaser et Fritz à démontrer le contraire.

our ∞ actinine elle est présente dès les premières heures post mortem et elle n'évolue pas au cours du temps. Ce résultat concorde avec celui de Penny 1985 et Goll et al., 1991.

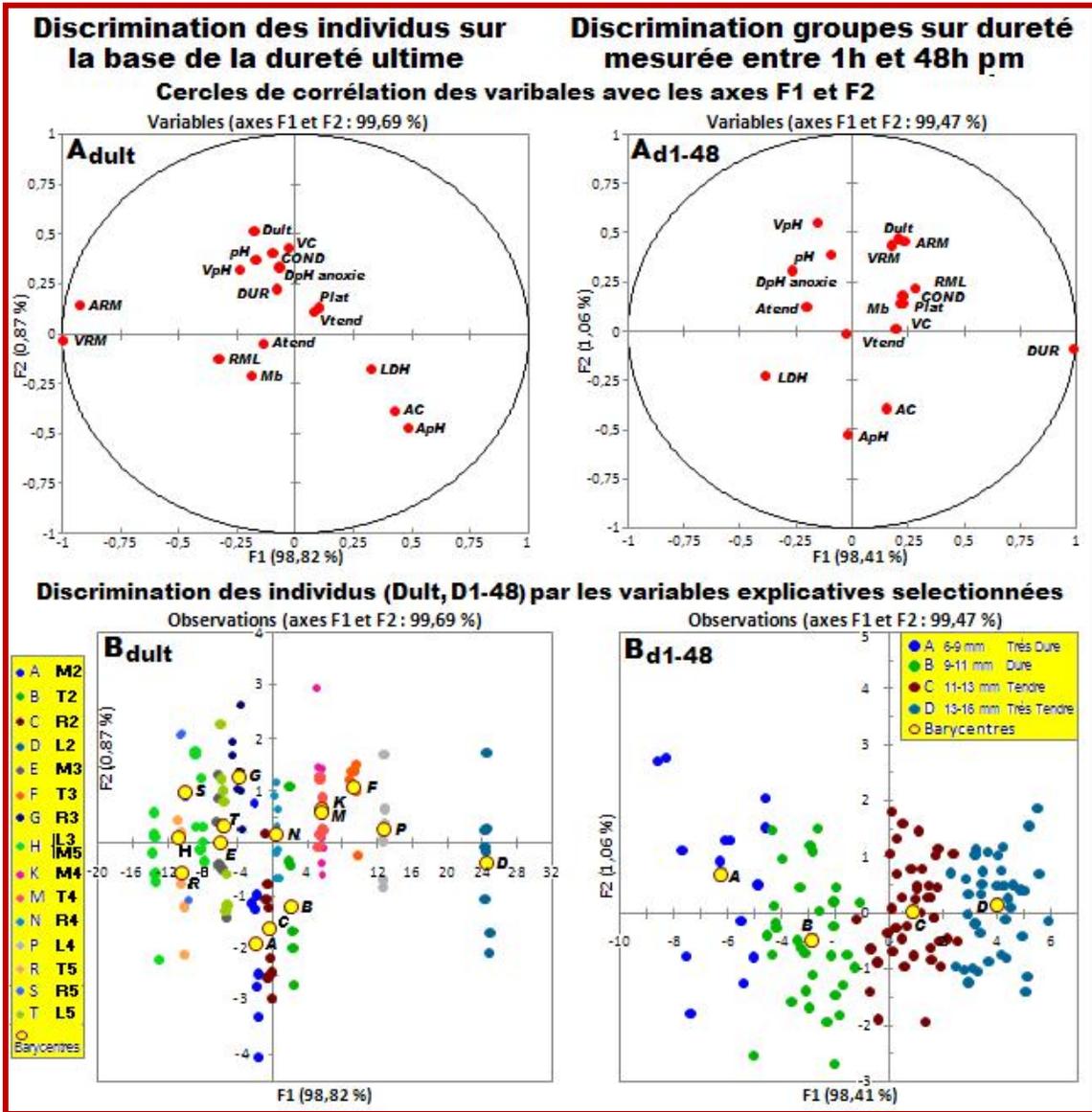


Figure 60. Discrimination des animaux et des muscles sur la base de la dureté ultime

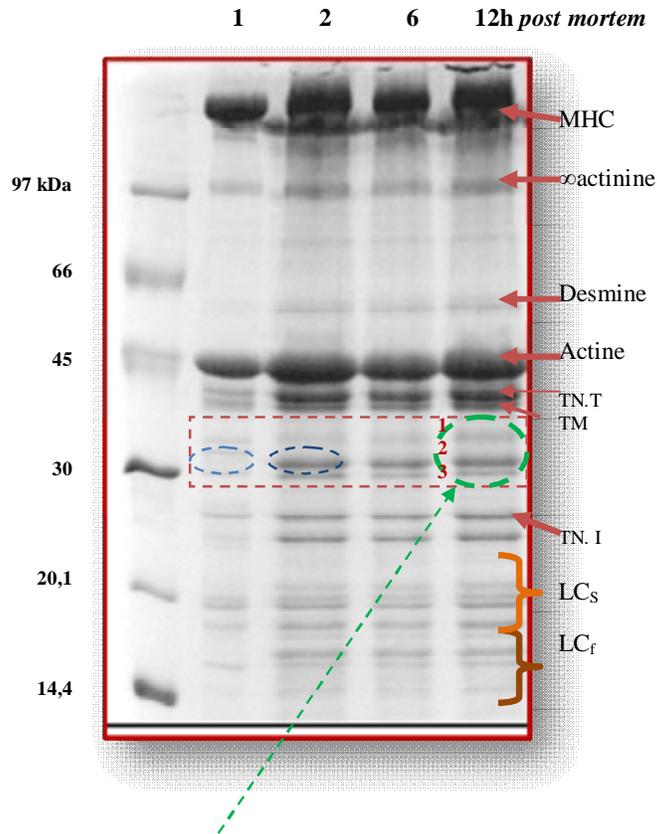
Concernant la desmine elle n'évolue pas au cours du stockage cependant, Young et al. 1980-81 ont rapporté une dégradation au cours du stockage chez les bovins.

Greaser et Fritz 1995 ; Taylor et al., 1995b ont démontré que l'actine ne subit pas de protéolyse au cours de la maturation des viandes.. Dans une synthèse bibliographique plus récente de Taylor et al., 2008 démontrent que l'actine est la première protéine cible dans le processus d'apoptose dans la cellule musculaire.

La troponine T est présente aux premières heures post mortem pour les quatre muscles. La dégradation de la troponine T post mortem (Hay et al., 1974), avec l'apparition du fragment de 30 kDa, a été décrite par Mac Bride et Parrish, en 1977. Pour certains auteurs, la disparition de la troponine T intervient dans l'attendrissage car elle fait partie intégrante du filament fin et sa dégradation post mortem peut entraîner une diminution des interactions actine/myosine et donc avoir véritablement un rôle dans l'attendrissage (Buts et al., 1986 ; Uytterheagen et al., 1992 ; Hoet al., 1994 ; Huff-Lonergan et al., 1996 et 1996a). Pour d'autres, elle est l'indice de la protéolyse mais elle n'est pas responsable de l'attendrissage car elle n'apparaît pas dans tous les muscles (Penny et Dransfield, 1979 ; Farouk et al., 1992 ; Greaser et Fritz, 1995) chez le bœuf. Pour l'espèce bovine l'apparition du fragment de 30 kDa est concomitante avec la disparition de la troponine T mais pour notre profil on remarque que la bande de 30 kDa est présente dès les premières heures cependant, la bande de la troponine T ne disparaît pas au cours du temps. Notre résultat confirme les résultats de Ouali et al., chez le lapin.

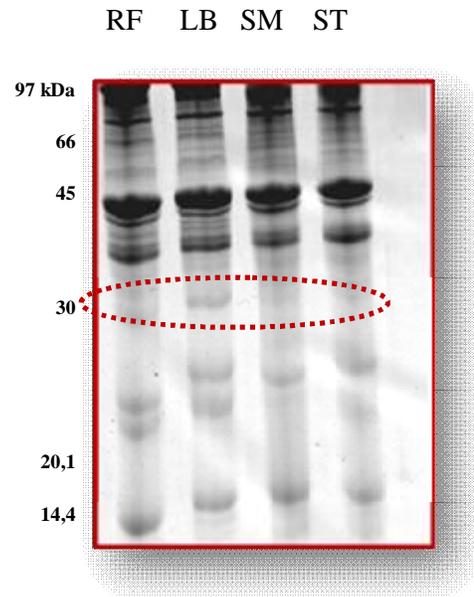
L'évolution de la protéolyse des protéines myofibrillaires en fonction du type de muscle à 1h post mortem est illustrée par l'électrophorèse représentée en **figure 62**. Le fragment à 32 kDa, marqueur de la protéolyse, apparaît à 1h post mortem dans les muscles RF et LB de tous les animaux. En ce qui concerne le muscle SM et ST la bande correspondant au fragment de 30-32 kDa apparaît seulement à 8h post mortem. Il est par ailleurs connu que les muscles rouges subissent moins de protéolyse post mortem que les muscles blancs (Olson et al., 1976 ; Ouali et al., 1983 ; Koohmaraie et al., 1988).

Ce résultat confirme que la vitesse de maturation des muscles est corrélée positivement à leur métabolisme glycolytique et à leur vitesse de contraction (Ouali, 1990b). En effet, beaucoup d'auteurs ont montré que les modifications biochimiques et



Les 3 bandes de 35 (bande 1) 32 (bande 2) et 30 kDa (bande 3) analysées en spectrométrie de masse

**Figure 61.** Illustration du profil électrophorétique, de la protéolyse des protéines myofibrillaires du muscle RF au cours du temps post mortem. Electrophorèse en conditions dénaturantes sur gel à 12%. MHC chaîne lourde de myosine, TN.T la troponine T, TN. Tropomyosine, TN. I troponine I, LC<sub>s</sub> chaînes légères longues de myosine, LC<sub>f</sub> chaînes légères courtes de myosine.



**Figure 62.** Profil électrophorétique des quatres muscle SM,ST,RF et LB à 1 h post mortemu

ultrastructurales de la structure myofibrillaire sont plus rapides dans les muscles de type II que dans les muscles du type I (Gann et Merkel 1978 ; Monin et Ouali, 1991).

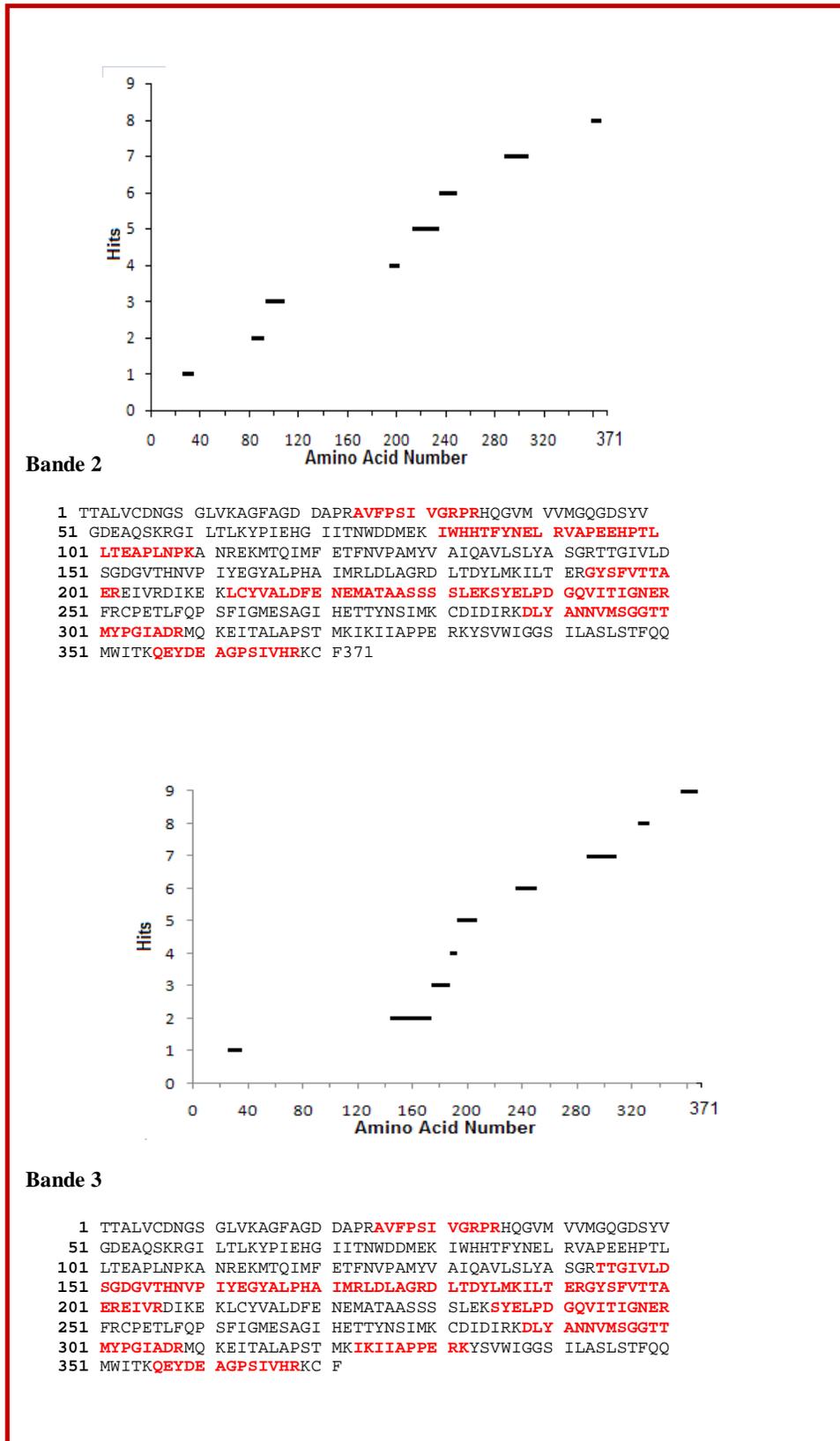
L'apparition de cette bande de 30 à 32 kDa a attiré notre attention et nous avons tenté de l'identifier par l'analyse en spectrométrie de masse. Nous avons déterminé l'identité exacte des trois bandes (**Figure 61**). une empreinte peptidique massive de la protéine a été faite. Les résultats ont montré que la séquence du peptide isolé par la digestion avec la trypsine de la bande 2 et 3 est en fait un mélange de peptides de l'actine (**Figure 63**). (Donc l'actine protéine du cytosquelette semblerait être dégradé dès les premières heures post mortem, plusieurs auteurs ont observé la dégradation de l'actine dans le muscle post mortem (Sanchoet al., 1997 ; Morzel 2004 ; Kong et Rabkin 2005). Parmi les changements biochimiques se produisant très tôt dans les cellules subissant la mort cellulaire programmée. Généralement la dégradation de l'actine se fait par les caspases enzyme responsable de l'apoptose (Mashima 1995 ; Kayalar 1996). Il serait même un bon indicateur du degré d'évolution de l'apoptose au sein de la cellule (youg 1998).

Pour la bande 1 à 35 kDa l'analyse de la bande a révélé une protéine LIM domaine protéine. Cette protéine est présente dans les différentes cellules dont la fonction n'est pas encore comprise (Enders Kai et al 2001)

## 8. Conclusion

Les caractéristiques du muscle, suivies au cours du stockage, évoluent de la même manière quelque soit l'animal et quelque soit le muscle. Ainsi le pH chute, à l'inverse de la quantité du jus extractible, de la conductivité électrique et de l'osmolarité. Tandis que la profondeur de pénétration chute les six premières heures phase de rigor mortis, pour augmenter après 8h jusqu'à 24h post mortem, phase d'attendrissage de la viande. Tous les paramètres restent stables après 24 post mortem.

L'étude du métabolisme oxydatif de ces quatre muscles, par la mesure de la teneur en myoglobine et dosage de la teneur de l'isoforme M4 de l'enzyme LDH met en évidence que les muscles RF et LB représentent les muscles les moins oxydatifs tandis que les deux autres muscles ont un métabolisme oxydatif relativement proche 8,48 et 7,31 mg/g de muscle respectivement pour les muscles SM et ST.



**Figure 63. Carte peptidiques des deux bandes réalisées par MALDI-TOF**

Comparaison des séquences protéiques des deux bandes à 30 et 32 kDa avec la séquence d'actine. Les acides aminés identiques dans les séquences sont indiqués dans la séquence en rouge

Les résultats obtenus mettent en évidence que la cinétique d'évolution des différentes caractéristiques est très variable en fonction de l'animal, bien que les animaux aient été choisis les plus similaires possible. Si l'effet animal est hautement significatif, l'effet lié au type de muscle est très faible sur les différentes caractéristiques.

Nous nous garderons bien de tirer des conclusions trop hâtives sur les analyses discriminantes réalisées dans le cadre de ce travail. La principale raison est le nombre trop restreint des animaux utilisés dans cette expérience. La seconde est que la variabilité est certainement très restreinte et pas représentative de la variabilité réelle que l'on peut observer dans un grand troupeau. Néanmoins, il est clair que l'approche statistique utilisée permettrait une bonne sélection des meilleures variables à analyser et une bonne analyse de la variabilité du caractère qui nous intéresse en l'occurrence la dureté ultime des viandes. Il faudrait mettre en place une nouvelle expérimentation avec un lot d'animaux plus grand et une présélection des variables à mesurer plus effective. Cette présélection des variables peut prendre en compte les résultats de cette expérience que l'on qualifiera de préliminaire.

Les observations décrites précédemment pour l'explication de la polyphasie de l'évolution du pH, ainsi que l'observation de la dégradation de l'actine les premières heures après abattage des animaux nous ont conduits à reconsidérer le concept actuel de la transformation du muscle en viande. Nous sommes donc en présence de nouvelles données qui nous permettent d'admettre une nouvelle hypothèse. Et si dès la mort de l'animal, les cellules musculaires vont s'engager sur la voie de la mort cellulaire par apoptose ?

---

## Chapitre II : LE PROCESSUS DE MATURATION : RECONSIDERATION DU CONCEPT ACTUEL

### 1. Origine du nouveau concept :

En 1996, Zamora et al publiaient un travail qui montrait que parmi un nombre de paramètres important susceptible d'être des prédicteurs de la tendreté ultime de la viande bovine, le plus efficace s'est avéré être la concentration d'inhibiteurs de serine protéases au stade de l'abattage. Ce résultat fut confirmé par la suite dans une expérience similaire portant sur un nombre d'animaux plus élevé (Zamora et *al.*, 2005).

Ce résultat était d'autant plus surprenant que, dans les années 1980, tout le monde s'accordait à dire que les serine protéases n'avaient aucun rôle dans le processus de maturation et que cette famille de protéases était très peu représentée dans la cellule musculaire (Sentandreu et *al.*, 2002).

Un autre élément essentiel, dans cette réflexion sur ce nouveau concept, fut la démonstration, vers les années 90, que les inhibiteurs de protéases constituaient de meilleurs marqueurs de l'intensité de la protéolyse dans le muscle et, par voie de conséquence, de la tendreté ultime de la viande, que le taux d'enzyme lui-même (ouali et talmant 1990).

Ces observations ont conduit à une étude plus systématiques des inhibiteurs de serine protéases dans le tissu musculaire pour essayer d'identifier ces derniers et de préciser la nature de leurs protéases cibles *in vivo*, protéases susceptibles de jouer un rôle primordial dans le processus d'attendrissage des viandes.

### 2. Les inhibiteurs de serine protéases dans le muscle :

#### 2.1. Purification et caractérisation de 3 inhibiteurs de serine proteases

Trois inhibiteurs de serine proteases, faisant partie de la famille des serpins (acronyme de : Serine Protease Inhibitor) ont été purifiés à partir de muscle de bovin, identifiés sur la base de leurs séquences N-terminales et caractérisés. Il s'agit :

- de l'antithrombine III (Herrera-Mendez et al., 2006),
- de 2 inhibiteurs apparentés à l'endopine 1 et dénommés endopines 1A et 1B (acronyme de : **Endo**crine **Pro**tease **In**hibitor) (Tassy, 1998 ; Tassy et al., 2005; Herrera-Mendez et al., 2006).

## 2.2. Sequence des gènes codant pour les endopine-like et complexité de la famille

Ce travail de séquençage génomique, réalisé par nos collègues de l'Université de Limoges, a permis d'obtenir les séquences complètes des protéines que nous avons purifiées, et de montrer que ces 2 inhibiteurs font partie d'une famille complexe comprenant au moins 8 isoformes différentes. Cette complexité a été confirmée au niveau protéique par western blot de fractions partiellement purifiées en électrophorèse 2D.

## 2.3. Complexité de la famille des endopines et nouvelle dénomination

Comme nous l'avons précédemment indiqué, 8 gènes codant pour des protéines très homologues aux endopines 1A et 1B purifiées à partir de muscle de bovin ont été identifiés au niveau du génome bovin. Tous ces gènes sont colocalisés au niveau d'un même cluster dans le chromosome 21 (Pelissier et al., 2008).

### • *Dénomination des 8 gènes identifiés*

L'ensemble des gènes identifiés et séquencés, codent pour des protéines très homologues et classées, sur la base de leurs homologies de séquence et de structures, dans la famille des serpins, inhibiteurs de serine protéase agissant selon un mécanisme de type substrat suicide et capable d'inhiber des protéases de familles différentes et en particulier des cystéines protéases. Nous reviendrons sur le mécanisme d'action un peu plus loin.

La comparaison de leurs séquences par rapport à celles disponibles dans les bases de données, a permis de les classer dans la famille A3 dont la référence est l'alpha-1-Antichymotrypsin. En accord avec la nomenclature proposée par Silverman et al. (2001), le nom de bovSERPINA3-1 à A3-8 leur a donc été assigné. Dans ce nom, le préfixe « bov » indique l'espèce animale d'appartenance des protéines concernées et le suffixe A3 indique la famille d'appartenance au sein du clade A. Sur ces bases, la désignation des serpins identifiées au niveau génomique et, son évolution depuis 1999, sont précisées dans le **Tableau 20**.

**Tableau 20.** Nomenclature des serpinines identifiées au niveau du génome bovin

<b>A*</b>	<b>B*</b>	<b>C*</b>
Endopine 1	Endopine 1A	bovSerpina3-1
		bovSerpina3-2
	Endopine 1B	bovSerpina3-3
		bovSerpina3-4
		bovSerpina3-5
		bovSerpina3-6
Endopine 2		bovSerpina3-7
Endopine 2		bovSerpina3-8

\* A: nomenclature initiale mise en place par Hook et collaborateurs (hwang et al., 1999)

\*B: nomenclature initialement utilisée par notre groupe

\*C: nomenclature proposée après séquençage de 8 gènes codant pour 8 serpinines de cette famille

- *Très forte homologie de structure des protéines codées par les 8 gènes*

La **figure 64** illustre cette grande homologie de structure entre les différentes serpins bovines. Les régions qui divergent le plus correspondent aux régions C-terminales de ces protéines (amino-acides en bleu ou noir) qui portent le site de reconnaissance par les protéases cibles. Les homologies de séquence sont de l'ordre de 95% pour les bovSERPINA3-1 à A3-6 et ces dernières ont une homologie de séquence de l'ordre de 74% avec les deux dernières à savoir bovSERPINA3-7 et A3-8. Ce résultat indique que cette famille comprend 2 sous groupes, les bovSERPINA3-1 à A3-6 appartenant au premier sous groupe et les deux dernières, bovSERPINA3-7 et A3-8, au second.

- *Complexité de cette famille au niveau protéines*

Cette complexité et leurs fortes homologies expliquent pourquoi seulement deux ont pu être purifiées à partir d'un extrait brut de muscle. Elles présentent en effet des propriétés physico-chimiques (charge, pI, masse moléculaire à l'état natif, ...) très proches les unes des autres, rendant ainsi leur séparation difficile, voire impossible pour certaines isoformes.

La première étape du protocole de purification des bovSERPINA3-1 (endopin 1A) et A3-3 (endopin 1B) est une gel filtration d'un extrait brut de muscle sur une colonne de Sephadex G100 superfine (5 x 100 cm) qui permet de fractionner trois pics présentant une activité anti-trypsin, enzyme prise comme modèle pour identifier la présence d'inhibiteurs de serine proteases dans les fractions éluées de la colonne (**Figure 65a**). La fraction F1 contient principalement des membres de la famille des bovSERPINA3s et de l'antithrombine III (AT-III). La fraction FII contient aussi des membres de la famille de bovSERPINA3s dont les deux dernières de masse moléculaire plus faible selon Hook et al. (2002) et qui correspondraient aux bovSERPINA3-7 et A3-8. Ces dernières présentent en effet une forte homologie avec les endopines 2 dont la masse moléculaire est voisine de 50 kDa.

L'analyse en électrophorèse 2D de la fraction F1 d'une part et d'un mélange des fractions FI et FII confirme la complexité de cette famille au niveau des protéines exprimées dans le muscle. Comme le montre la **Figure 65 b1**, la révélation des protéines de la fraction F1 à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre l'endopin 1A (bovSERPINA3-1) identifie un nombre de spots important et probablement supérieur au nombre de 8 qui était attendu. Tous ces spots présentent des masses moléculaires de l'ordre de 70 kDa ou plus. L'analyse du

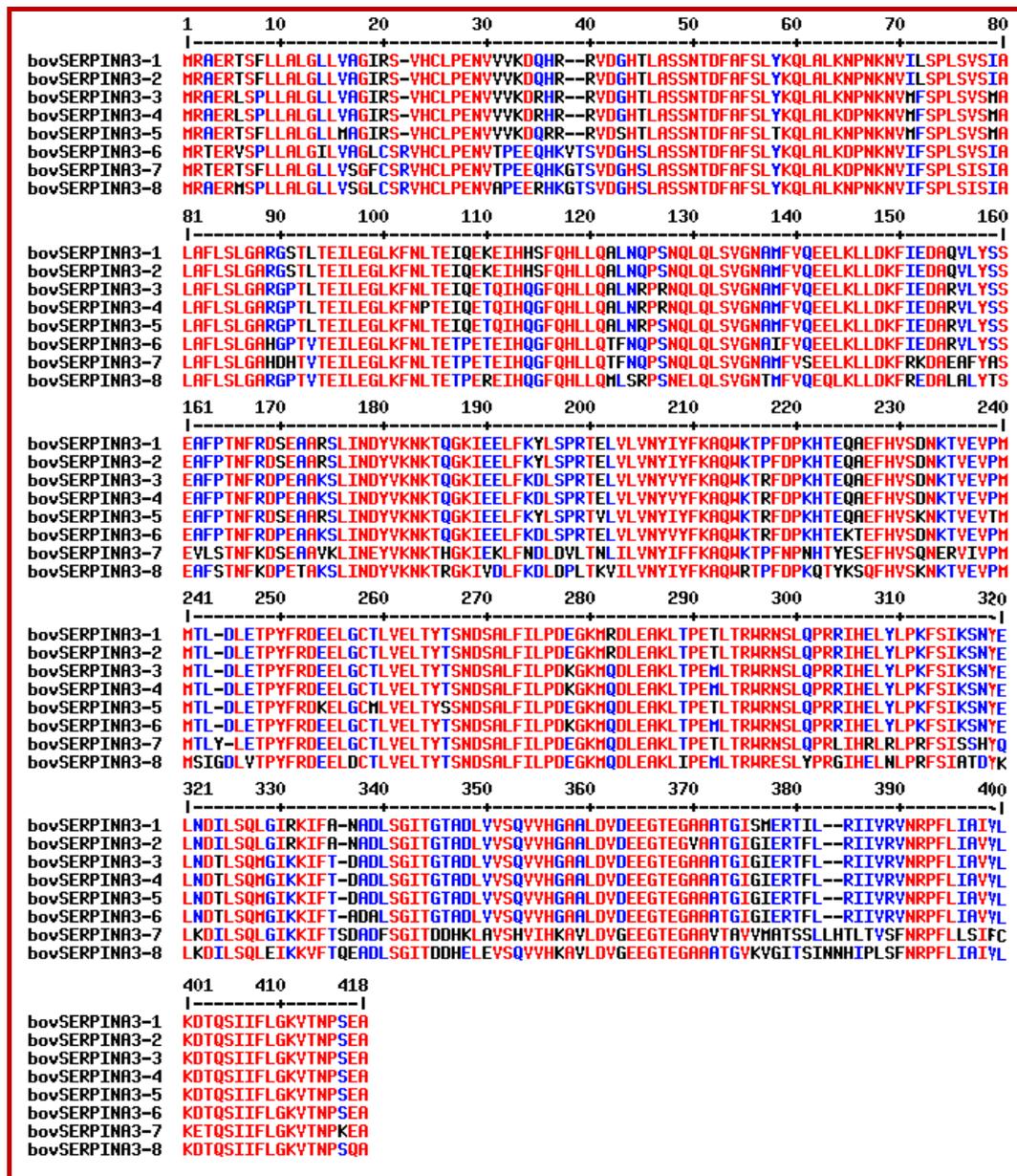


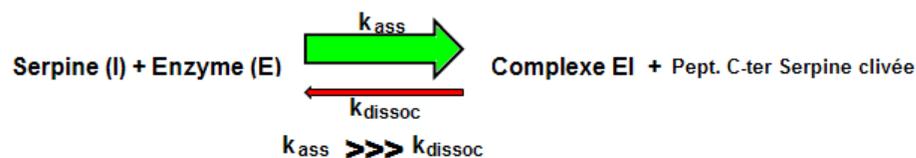
Figure 64 : Homologie de séquence des protéines codées par les 8 gènes : les amino-acides en rouge sont les mêmes pour toutes les bovSERPINA3s.

mélange FI et FII (**Figure 65b2**) montre un profil similaire avec en plus des spots de plus faibles masses moléculaires qui pourraient correspondre aux bovSERPINA3-7 et A3-8 dont la masse moléculaire est plus faible et serait voisine de 50 kDa.

- **Enzymes cibles potentielles des serpines A3-1 et A3-3**

Des études *in vitro* de leurs propriétés inhibitrices ont conduit à tester une série de protéases appartenant aux familles des serine et cystéine protéases. Leur ability à inhiber efficacement une protéase est estimée par détermination de la constante de vitesse d'association ( $k_{\text{ass}}$ ) de l'inhibiteur à l'enzyme.

Comme le montre le **tableau 21**, les 2 serpines inhibent fortement l'élastase et la trypsine ( $k_{\text{ass}} > 10^5$ ) et à un degré moindre la plasmine et la chymotrypsine. L'inhibition de ces dernières enzymes n'est passuffisamment forte pour pouvoir avoir une signification physiologique ( $k_{\text{ass}} \leq 10^3$ ).

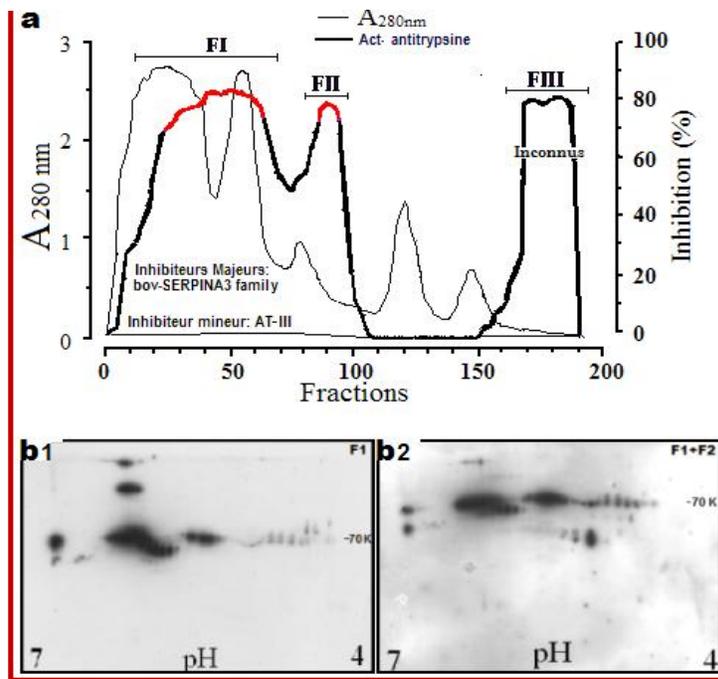


Selon le schéma ci-dessus, la vitesse de dissociation du complexe ( $k_{\text{dissoc}}$ ) étant négligeable par rapport à la vitesse d'association, l'équilibre de la réaction est très fortement orienté vers la formation du complexe. Ceci traduit une grande stabilité du complexe avec aucune dissociation indétectable pendant une période variant de quelques minutes à plusieurs semaines. Rappelons que le complexe formé est consécutif à la stabilisation de ce dernier par une liaison covalente entre les deux entités (voir ci-après).

Parmi les protéases cibles identifiées dans ce travail, aucune n'est exprimée dans la cellule musculaire. Nous avons donc entrepris de rechercher d'autres enzymes cibles qui, comme les serpines que nous avons étudiées, présentent une localisation intracellulaire et une distribution tissulaire très large (Tassy *et al.*, 2005).

### 3. Les serpines : caractéristiques générales et mode d'inhibition

Les serpines sont des protéines globulaires riches en feuilletts Beta et porteuses d'une boucle en C-terminale qui est extérieure à la protéine responsable de la grande instabilité de



**Figure65.** Fractionnement, par gel filtration sur Sephadex G100 superfine (5 x 100 cm), d'un extrait brut de muscle et profil en électrophorèse 2D des 2 principales fractions FI et FII.

**Tableau 21 : protéases inhibées par les serpins bovines A3-1 et A 3-3**

Proteinase	enzyme class	bovSERPINA3	bovSERPINA3
		-1 $k_{ass}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	-3 $k_{ass}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
Elastase	Serine	$2.4 \times 10^7$	$1.3 \times 10^6$
Trypsin	Serine	$3.9 \times 10^6$	$6.7 \times 10^5$
Plasmin	Serine	$1.8 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$
Chymotrypsin	Serine	$1.0 \times 10^2$	$9.0 \times 10^2$
Cathepsin G	Serine	N.I.	N.I.
Thrombin	Serine	N.I.	N.I.
Kallikrein	Serine	N.I.	N.I.
Urokinase	Serine	N.I.	N.I.
Plasminogen activator	Serine	N.I.	N.I.
Papain	Cysteine	N.I.	N.I.
Cathepsin B	Cysteine	N.I.	N.I.
Cathepsin L	Cysteine	N.I.	N.I.
N.I., no inhibition detected.			

cette famille de protéines (**Figure 66a**). Cette boucle contient le site actif responsable de l'activité inhibitrice et va avoir tendance à s'insérer dans la partie globulaire de la protéine porteuse de cette boucle ou d'une seconde serpine (cause de phénomènes de polymérisation). Après clivage par l'enzyme, cette boucle s'insère comme montré dans la **Figure 66b**. Si on considère le couple enzyme-inhibiteur (**Figure 66c**), dès que la liaison est coupée, la boucle va s'insérer entre les feuillets beta, entraînant avec elle l'enzyme qui va subir une déformation importante et devenir incapable de poursuivre le processus d'hydrolyse (**Figure 66d**). Ce processus catalytique restera donc bloqué au stade appelé acyl-enzyme qui correspond à une association covalente des deux protéines. Le caractère covalent de la liaison entre l'inhibiteur et l'enzyme conduit à un complexe irréversible dont la durée de vie varie entre quelques minutes à plusieurs semaines.

Ce processus est identique pour toutes les serpines connues à ce jour et semble également être le processus utilisé pour inactiver les cysteines proteases (Swanson et al., 2007). Pour de plus amples informations sur les mécanismes d'inhibition des sérine protéases par les serpines, les lecteurs sont invités à se reporter à la synthèse très complète publiée en 2002 par Gettins.

#### **4. Enzymes cibles potentielles identifiées au niveau cellulaire**

Parmi les nombreuses protéases testées et connues pour être largement distribuées dans les organismes vivants et pour être intracellulaires, le seul groupe de peptidase fortement inhibés par ces serpines se sont avérées être les caspases, familles très particulières de cystéine protease qui sont multimériques et qui jouent un rôle prépondérant dans le processus de mort cellulaire ou apoptose. Ces inhibiteurs forment avec les caspases des complexes stables après préparation des échantillons pour analyse en électrophorèse en conditions dénaturantes, préparation qui nécessite la dénaturation des protéines en présence de SDS par chauffage à 90-100°C pendant 5 minutes.

Nous reviendrons ultérieurement sur la capacité de ces serpines à inhiber les caspases initiatrices et exécutrices et sur la caractérisation cinétique de leur interaction.

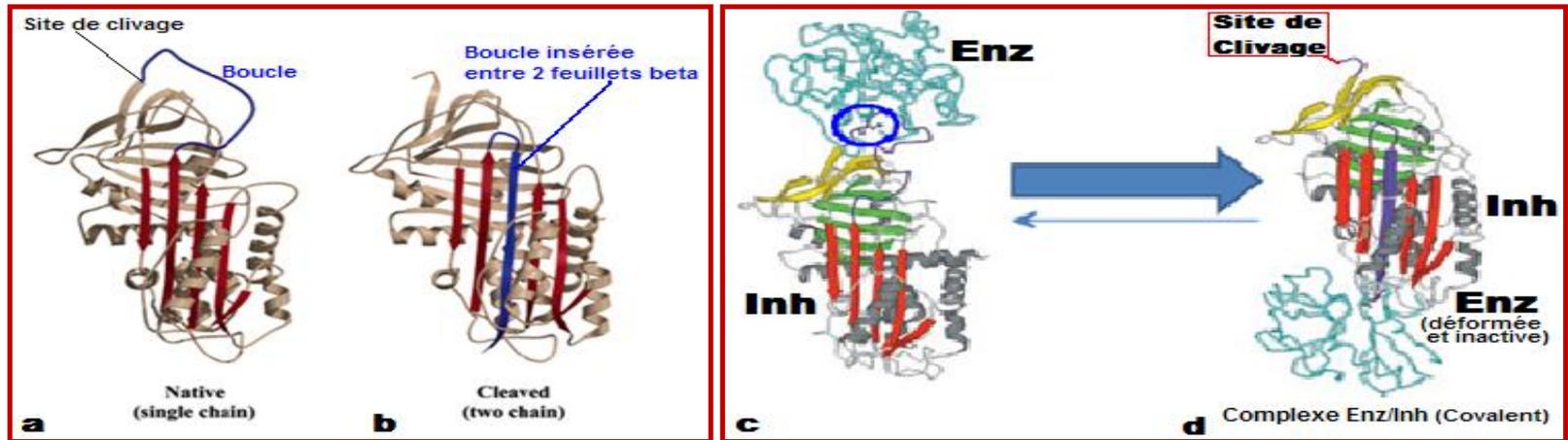


Figure 66. Schéma de principe d'action des Serpines

### 2.3 Conclusion

Les observations décrites précédemment nous ont conduits à reconsidérer le concept actuel de la transformation du muscle en viande. Si on admet :

1. que les inhibiteurs de serine protéases qui ont été identifiés comme les meilleurs marqueurs de la tendreté ultime de la viande bovine dans le cas présent,
2. que ces inhibiteurs sont des inhibiteurs de caspases,
3. que les caspases sont les moteurs de l'apoptose et donc de la mort cellulaire, ce qui est aujourd'hui démontré (Taylor et al., 2008),

La seule conclusion qui s'impose est d'admettre que dès la mort de l'animal, les cellules musculaires vont s'engager sur la voie de la mort cellulaire par apoptose. C'est ce que nous avons voulu montrer dans la publication N°1 qui insiste sur le fait que cette nouvelle conception de la transformation du muscle en viande apportent des réponses à de nombreuses questions en suspens depuis des décennies et pour lesquelles des explications scientifiques cohérentes n'ont jamais été proposées.

*Publication numéro 1*

**Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms**

Ahmed Ouali, Carlos H.Herrera-Mendez, Gerald Coulis, Samira Becila, Abdelghani Boudjellal, Laurent Aubry, Miguel Angel Sentandreu

**Meat Science 74, 44–58 (2006)**

# Chapitre III : MISE EN PLACE DU PROCESSUS D'APOPTOSE JUSTE APRES LA MORT DE L'ANIMAL

## 1. Préambule

La mort cellulaire programmée, processus mis en évidence dans les années 1970 par Kerr et al. (1972) et dont les protéases responsables ont été identifiées dans les années 1990-95 (Alnemri et al., 1996), est maintenant relativement bien connue. Si tous les intervenants ne sont pas encore identifiés, la connaissance des mécanismes impliqués dans l'apoptose est aujourd'hui suffisante pour que nous puissions intégrer cette information dans l'étude du processus de maturation des viandes.

Il est en effet clair que l'entrée des cellules musculaires en apoptose est un fait qu'il est difficile de contester compte tenu des conditions environnementales qui existent après la saignée de l'animal. C'est un passage obligé pour l'ensemble des cellules et des tissus de l'animal qui vient d'être abattu et, cela, quelle que soit l'espèce considérée.

L'analyse des conséquences du processus apoptotique par rapport aux connaissances que nous en avons *in vivo*, apporte des réponses à de nombreuses questions posées, depuis longue date, par tous les scientifiques impliqués dans l'étude du processus de transformation du muscle en viande. Même si la participation de ces peptidases n'explique pas tout, il est probable que son intervention très précoce est un élément essentiel facilitant l'action des autres systèmes protéolytiques. Il est donc temps aujourd'hui de se remettre en question et d'intégrer toutes les connaissances disponibles dans notre réflexion sur l'attendrissage des viandes et sur les marqueurs prédictifs potentiels de cette qualité essentielle pour les consommateurs que nous sommes tous.

La recherche de prédicteurs biologiques de la tendreté et des autres qualités de la viande est une nécessité absolue pour valoriser au mieux les carcasses en les orientant, rapidement après l'abattage, vers une utilisation optimale sur la base de leurs qualités potentielles. C'est aussi une nécessité absolue pour pouvoir incorporer les qualités de la viande dans les programmes de sélection génétique. Comme nous l'avons vu, dans le schéma

traditionnel de transformation du muscle en viande, il serait donc nécessaire de rajouter une étape avant la phase de *rigor mortis* qui correspondrait à la phase de mise en place de la mort cellulaire et de l'apoptose avec toutes les conséquences qui lui sont associées et ses effets sur les phases de *rigor* et de maturation, qui sont aujourd'hui totalement inconnues.

Comme aucune preuve de la mise en place de l'apoptose dans le muscle postmortem n'existait, il nous fallait donc trouver des arguments solides pour prouver notre hypothèse. Ce travail fut réalisé lors de mon séjour pendant 18 mois à l'INRA de Clermont Ferrand et a conduit à la rédaction d'une seconde publication que nous avons soumise (résultats en attente).

## **2. Le choix des paramètres pour atteindre notre objectif**

Dans le chapitre précédent nous avons fait le tour des modifications qui caractérisent le processus d'apoptose. Parmi ces modifications nous avons choisi de suivre l'évolution des marqueurs suivants :

- La rétraction cellulaire
- L'externalisation des groupements phosphatidylserine
- L'hydrolyse de l'actine, première protéine cible des caspases
- La dégradation de l'ADN

Avant de discuter et de conclure sur ce thème, nous consacrerons la dernière partie du chapitre III pour présenter quelques résultats complémentaires sur ce sujet, résultats obtenus par Delphine MEILHAC dans le cadre de son Master 1<sup>ère</sup> année que j'ai co-encadré, pendant mon séjour à Clermont Ferrand, avec Mr Ouali.

*Publication numéro 2*

# ***POSTMORTEM ONSET OF APOPTOSIS IN RAT MUSCLES***

**Samira Becila**, Carlos H. Herrera-Mendez, Gerald Coulis, Roland Labas, Thierry Astruc, Miguel Angel Sentandreu, Brigitte Picard, Abdelghani Boudjellal, Patrick Pelissier, Laure Bremaud, Ahmed Ouali

Article soumis pour publication

Title: Postmortem onset of apoptosis in rat muscles

**Samira Becila**<sup>1</sup>, Carlos Hernan Herrera-Mendez<sup>2</sup>, Gerald Coulis<sup>3</sup>, Roland Labas<sup>3</sup>, Thierry Astruc<sup>3</sup>, Miguel Angel Sentandreu<sup>4</sup>, Brigitte Picard<sup>5</sup>, Abdelghani Boudjellal<sup>1</sup>, Patrick Pelissier<sup>6</sup>, Laure Bremaud<sup>6</sup>, Ahmed Ouali<sup>3,a</sup>

<sup>(1)</sup> INATAA, Université de Constantine, Route de Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie

<sup>(2)</sup> UNESS, Universidad de Guanajuato. Privada de Arteaga S/N, 38900 Salvatierra, Guanajuato, Mexico

<sup>(3)</sup> INRA, UR370 QuaPA, 63122 Saint Genes Champanelle, France

<sup>(4)</sup> Department of Food Science, C.S.I.C., Apt. 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>(5)</sup> INRA, UR1213 C2M, F-63122 St Genes Champanelle, France

<sup>(6)</sup> UGMA, UMR 1061, INRA-Université Limoges, 123, Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France

Running title: Apoptosis occurrence in *postmortem* muscle

<sup>a</sup>Address correspondence to:  
Ahmed Ouali,  
INRA, UR370 QuaPA,  
F-63122 SAINT GENES CHAMPANELLE, France  
Tel : (33) 4 73 62 41 63,  
Fax : (33) 4 73 62 42 68,  
E-Mail : [ouali@clermont.inra.fr](mailto:ouali@clermont.inra.fr)

**ABSTRACT:**

Several reports previously suggested a contribution of caspases, a protease family considered as the driving motor of apoptosis, to postmortem proteolysis. The significance of the caspases implication in muscle proteins degradation is that the cells are dying through apoptosis, a major cell death programme. Our purpose was therefore to verify this statement using different well known hallmarks of the apoptotic process including cell shrinkage, phosphatidylserine (PS) externalization, DNA fragmentation and actin degradation. Cells start to shrink few minutes after animal death and reach a maximum shrinkage about 24h postmortem while they showed the typical rounding appearance of apoptotic cells. Externalization of PS is detectable within 1h postmortem and increased gradually with time. As expected, DNA fragmentation was not observed in muscle fibres nuclei but only in mononucleated cells. Finally, we report a degradation of actin leading to the time course rise of a 32 kDa actin-fragment characteristic of the action of caspases. The present work is therefore the first to provide direct evidence supporting the onset of apoptosis in post-mortem muscle. The present findings should lead us to reconsider as a whole, the mechanisms contributing of the development of meat qualities (tenderness, flavor, juiciness ...) by a detailed analysis of the apoptosis associated biochemical and physiological modifications taking place within the cells.

**Keywords:** apoptose, phosphatidylserine, cell shrinkage, rat muscle

## INTRODUCTION

Over the last years, several reports suggested a contribution of caspases, especially caspase 3, to the overall proteolysis taking place in *postmortem* muscle. After perfusion with the caspase inhibitor Z-VAD-fmk, a reduction in tilapia muscle toughness was thus reported by Ishida et al. (1). Similarly, a significant reduction of proteolysis in chicken skeletal muscle was observed upon treatment with a specific caspase 3 inhibitor whereas calpain activity was unchanged over the whole treatment length (2). On the other hand, Kemp and Parr (3) demonstrated the high sensitivity of myofibrils to the action of caspase 3. These findings are in good agreement with the conclusion of Camou et al. (4) who reconsidered the role of calpains in *postmortem* muscle and concluded their investigations by stressing that other proteolytic systems than calpains are involved in *postmortem* proteolysis and pore specially caspases. Hence, caspases contribute very likely to *postmortem* proteolysis.

Caspases are a family of cysteine proteases comprising a dozen of different closely related proteins encoded by different genes. Members of the caspase family are mainly involved in inflammation (caspases 1, 4, 5 and 11) and apoptosis. Regarding apoptosis, two subgroups of caspases are distinguished according to their function in this process: (a) initiator caspases which initiate the process (caspases 2, 8, 9, 10 and 12) and (b) effector caspases which are implicated protein degradation and cell dismantling (caspases 3, 6 and 7) (reviewed in 5-7).

The activation of effector caspases requires the preliminary initiation apoptotic process by specific stimulus. Upon initiation of the apoptotic process, one or several initiator caspases are activated and these will in turn activate, through limited proteolysis, the effector caspases. The effector caspases will then degrade cellular proteins up to total cell dismantling.

After animal bleeding, the dynamic regulation of the biological processes existing in the living cells will not be efficient anymore and if the apoptotic process is set up *postmortem*, it will be very probably never fully completed. There is two major reasons supporting this assumption: (a) the physicochemical conditions (pH, osmotic pressure,...) which will change unfavorably and (b) because of the lower efficiency of the supplying energy pathways, the energy needs for a full completion of the process will probably not be fully covered.

Although several sets of evidence suggested the contribution of capases to *postmortem* proteolysis, especially of caspase 3, the onset of the apoptotic process in *postmortem* muscle

has never been clearly established. The purpose of the present work is to fill in this gap and provide experimental data demonstrating that apoptosis is set up in *postmortem* muscle. To achieve this goal three major changes characterizing the apoptotic process (reviewed in 8) have been selected and tested in *postmortem* rat muscles: (a) cell shrinkage and rounding; (b) phosphatidylserine externalization and (c) specific DNA fragmentation. Amongst the associated biochemical changes, we followed the time course degradation of actin, one of the first substrate targeted by caspases in apoptotic cells. Actin degradation which is used as a marker of apoptosis has been also investigated. The whole set of findings reported in this paper led us to conclude that the apoptotic process starts to be set up in the first few minutes *postmortem* and progresses then during time.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Animals and muscle sampling.** Five 10 to 12 weeks old Wistar rats provided by the research center rat breeding group were used in the present work. Animals were anesthetized by intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (0.1ml/100g of rat weight) and then killed by decapitation. For each animal, *Gastrocnemius* (red muscle) and *Plantaris* (white muscle) muscles were excised from the left hind leg within 1h postexanguination. The muscle from the right hind leg was maintained on place and excised 24h *postmortem* after storage of the carcass at 10°C for 5 hours and then at 4°C up to 1 day *postmortem*. These two muscles were used to study the extent of cell shrinkage and rounding together with the phosphatidylserine externalization. Because more samples were needed for DNA fragmentation studies, this experiment was performed on a larger muscle, namely rat *Longissimus* muscle, from which samples were taken at each predefined times *postmortem* from the left side and then from the right side of the carcass.

**Muscle cells shrinkage.** Muscle strips from *Gastrocnemius* and *Plantaris* muscles were immersed in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4, for 45 min at room temperature. After 3 washes with PBS buffer, samples were bathed in 30% sucrose in PBS buffer up to equilibrium. Blocks were mounted in a Reichert Frigocut 2800 (Leika, Heidelberg, Germany) and frozen in situ at -20°C. Thick transverse sections of about 10  $\mu$ m were cut and observed without any additional staining or treatment with an Axioplan 2E Zeiss light microscope (Zeiss, Lyon, France).

**Estimation of the Extent of shrinkage.** The estimation was carried out on samples excised just after bleeding from rat *Longissimus* muscle, a larger muscle enabling analysis of a greater number of samples. Samples were prepared for microscopy examination as described above for cells shrinkage. The contrast of the image was adjusted in order to identify clearly the cell limits using Corel Paint Shop Pro X application from Macromedia (Paris). After printing the image presented in Figure 1, cells were cut out with or without the associated extracellular space and pieces of paper corresponding to the cell alone (grey (G) area in Figure 1) and to the cell plus the extracellular space (grey (G) +black (B) area in Figure 1) were weighted. The extent of shrinkage was calculated using the following equation:

$$\text{Shrink} = (1 - (G / (G + B))) * 100$$

where “Shrink” is the extent of shrinkage (%), “G”, the weight of the cell alone and (G+B), the weight of the cell plus the associated extracellular space. Measurements were carried out on 1 to 3 cells per cut and 5 cuts were analyzed for each animal. A total of 52 fibers were analyzed on samples prepared within the first 10 min after animal decapitation. As a reference we used the cell volume for a negligible extracellular space (B=0 and cell weight= B+G).

**Phosphatidylserine externalization and Laminin labeling.** Phosphatidylserine externalization was investigated using 2.5 x 6 mm strips from *Gastrocnemius* and *Plantaris* muscles. These samples were stretched and fixed with needles on cork plates before immersion in 1% (v/v) paraformaldehyde, 0.1% (v/v) glutaraldehyde, 0.1 M sucrose in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, for 15 min at room temperature. FITC-Annexin V Conjugate (Sigma-Aldrich A9210, Saint-Quentin Fallavier, France) was used for Phosphatidylserine detection. After three washes with PBS buffer for 5 min, muscle strips were incubated in PBS buffer containing FITC labeled Annexin V (1.8 µg/ml) for 24h at 4°C and kept overnight in the dark upon mild stirring. One strip was used as a control and similarly incubated in the same buffer but in the absence of Annexin V. After three washes with PBS buffer for 5 min, muscles were cut into small pieces (1 x 3 mm) parallel to the fibre axis. These small cuts were frozen at -160°C in isopentane immersed in liquid nitrogen and subsequently kept at -80°C until use. Transversal sections (10 µm) were then cut using a Reichert Frigocut 2800 (Leika) and dried in the dark at room temperature before fixation in PBS buffer containing 2% formol. Thin Annexin V labeled cuts were then treated for Laminin labeling as previously described (9), using a rabbit anti-Laminin (Sigma-Aldrich) primary

antibody (dilution: 1/100) followed by the addition of a cyanine 3 conjugated goat anti-rabbit IgG (dilution: 1/150) as the secondary antibody (Santa Cruz SC-5879, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany). Finally, sections were mounted on glass slides in Mowiol and observed by using an Axioplan 2E Zeiss light microscope. FITC-Annexin V conjugate was revealed using  $\lambda_{exc}$  488 nm and  $\lambda_{emm}$  530 nm whereas for cyanine 3-goat antirabbit IgG conjugate  $\lambda_{exc}$  554 nm and  $\lambda_{emm}$  568 nm were used.

**DNA fragmentation.** Detection of DNA fragmentation was performed using two rat *Longissimus* muscles. The first sample was excised from animals anesthetized by intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (0.1ml/100g of rat weight). The animal was then immediately killed by decapitation. The muscle was maintained on the eviscerated and dressed carcass. Next samples were taken from the muscles maintained on the carcass at different sampling time (2, 15, 30 min; 1, 2, 4, 7, 24 and 48h *postmortem*). Thin cuts were prepared as described above and stained using the traditional Hematoxylin/ Erythrosin method. Fragmented DNA was revealed using a monoclonal antibody (apostain, **AbCys s.a**, Paris) recognizing specifically mono stranded DNA fragments of regular length characterising apoptotic cells. Detection of fragmented DNA was carried out according to the recommendation of the manufacturer AbCys.

**Preparation of samples for electron microscopy:** For routine ultrastructural studies, rat muscle samples were treated as previously described (10).

**Actin degradation.** Time course degradation of actin was investigated using rat *Longissimus* muscle from 5 animals. After animal bleeding, muscle was maintained on the carcass and samples (1.5 to 2 g) for actin analysis and pH measurement excised at 1, 3, 5, 7, 9, 24, 48 and 72h *postmortem*. Muscle crude extracts were prepared by homogenizing 1g of muscle in 2ml of 10 mM Tris HCl buffer, pH 7.0, containing 0.1M KCl, 4mM EDTA and 5mM MCE with a polytron homogenizer. An aliquot (10  $\mu$ l) of the 5000 x g supernatant was diluted by addition of 5 $\mu$ l 30 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1% MCE, heat denatured for 5 min in a boiling water-bath, cooled in cold water and frozen at -80°C until used. Quickly thawed samples were subjected to SDS-PAGE (12%) according to Laemmli (11). Western blot were carried out as previously described (12) and actin fragments revealed using a rabbit anti-actin polyclonal antiserum as the primary antibody and horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody. Densitometry was carried out using Unscantit 4.1 from Ritme Informatique (Paris).

**pH measurement.** A sample of fresh muscle (0.4 g) was homogenized in 3.6 ml of cold 5 mM iodoacetate and the pH determined on the suspension using a WTW pH meter (Amilabo, Chassieu, France) equipped with a combined glass electrode.

## RESULTS

**Muscle Cells shrinkage.** Cell shrinkage which is one of the first steps of the cell death program (7), has been investigated on both rat *Gastrocnemius* and *Plantaris* muscles. Similar findings were obtained for both muscles. Thus only those corresponding to *Gastrocnemius* muscle are presented hereafter. As shown in Figure 2a, after 1h *postmortem*, some cells are shrunk (left part of the white line) whereas some other are not (right part of the white line). It is worthy to remember here that each cell can decide by itself, independently from the others, to commit suicide by engaging into the cell death program at the right time. This explains why, within the same cut, the behaviour of each cell can be different. The extra-cellular space is thus minimal and more regular in the right part of the plate as compared to the left part, where this space is abnormally large and variable from one area to another.

An estimation of the extent of shrinkage has been performed as described in the Materials and Methods section on rat *Longissimus* samples excised just after bleeding. For each cell examined, the reference is the same cell before shrinkage meaning that  $\text{shrink} = 0$  and  $\text{total cell weight} = G+B$ . On average, cell volume decreased by about 20% ( $20 \pm 6\%$ ). This shrinkage results very likely from the cytoskeletal induced traction forces on the cell membrane with a concomitant water out flux towards the extracellular space.

The intensity of the forces concerned at the time of the cellular retraction is sufficiently important to cause wrenching of anchorage structures (costameres, integrins, ...) from the membrane. They also cause a retraction of all intracellular organelles contributing, at least partly, to their dysfunctions. This feature is illustrated in Figure 2b for a 2h *postmortem* sample from *Gastrocnemius* muscle showing a clear release (black arrow) of part of the membrane corresponding to the costamere region, the membrane fragment being still anchored to the transversal intermediate filaments emanating from the Z-line (open arrowhead).

Figure 2c presents a cut from the same *Gastrocnemius* muscle at time 24h *postmortem*. After 24h, all cells are shrunk and extra-cellular space increased significantly, suggesting a time-dependent progress of the cell death process. Another interesting feature is that, in the

24h *postmortem* sample, almost all fibres showed the typical rounding appearance of cells dying by apoptosis (7).

**Phosphatidylserine externalisation.** Analysis of phosphatidylserine externalisation was performed on both rat *Gastrocnemius* and *Plantaris* muscles and, as no difference was observed, only results of the former muscle are presented herein.

Besides cell shrinkage, another characteristic feature of apoptosis is the externalization of phosphatidylserine (PS), a class of acidic phospholipids normally located on the internal leaflet of the lipid bilayer. However, in some physiologic conditions, the internal PS is exposed to the external surface especially in dying cells (13-16). Phosphatidylserine (PS) externalization is thus regarded as one of the earliest hallmarks of cells undergoing programmed cell death (17). In living organisms, macrophages recognize the PS externalized cells through a specific PS receptor, resulting in a possible contribution of macrophages to the target cell dismantling (18).

To comfort the idea that the onset of the cell death program takes place immediately after bleeding, an assumption supported by the intense cell shrinkage observed as soon as 1h *postmortem*, redistribution of PS has been investigated on small muscle fibers bundles using a FITC labeled specific PS-binding protein, Annexin V, as a specific probe.

To attest the extracellular location of PS, we referred to Laminin, a major component of the basal lamina. In living cells, the primary function of the Laminin protein family is the anchorage of the plasma membrane to the extracellular matrix. Hence, these proteins are located in the vicinity of the external leaflet of the plasma membrane (19) and constitute an interesting internal control to verify that the PS labeling is extracellular and not intracellular.

Small muscle fiber bundles taken at 1h (Figure 3A) and 24h (Figure 3B) *postmortem* were incubated with FITC-labeled annexin V for 24h and then frozen. Frozen cuts **obtained from** the Annexin V labeled samples (Figure 3-A1) were then treated with a primary rabbit Laminin antibody, revealed with a FITC-labeled goat anti-rabbit secondary antibody (Figure 3-A2) and examined under the light microscope for Annexin V and Laminin fluorescence. Note that serial thin cuts were obtained from the central part of the frozen sample avoiding the peripheral fibers which can be damaged during preparation of the sample.

As depicted in Figure 3-A1 (1h *postmortem* sample) and 3-B1 (24h *postmortem* sample) analysis of the Annexin V distribution in transversal muscle thin cuts led to a specific green

fluorescent labeling of the periphery of the fibers. In addition, the labeling intensity appeared to be greater in the 24h *postmortem* sample suggesting a time course progress in the PS externalization during the first 24h post-exsanguination. No fluorescence was detected in fibers treated with the same buffer in which Annexin V was omitted (Figure 3-A4). Immunostaining of rat muscle fibers prepared 1h (Figure 3-A2) or 24h (Figure 3-B2) *postmortem* with a Laminin rabbit polyclonal antibody revealed with a cyanin 3 conjugated goat anti-rabbit IgG led to specific fluorescent red labeling of the periphery of the fibers. When the first antibody was omitted, no fluorescence was detected (Figure 3-B4).

Merging images corresponding Laminin and PS labeling led to a yellow color, a result indicative of a co-localization of Laminin and PS-bound Annexin V. Such color change was observed both at 1h (Figure 3-A3) and 24h (Figure 3-B3) *postmortem* samples. The co-localization of both antigens confirms that Annexin V is bound to extracellular PS and not to intracellular acidic phospholipids. It is noteworthy that the yellow color is more intense in the 24h sample, suggesting an increase in the number of externalized PS between 1 and 24h *postmortem*.

The present results clearly indicate that PS groups are externalized in *postmortem* muscle as soon as 1h *postmortem* and that the extent of PS externalization increased between 1 and 24h *postmortem*. By contrast, Laminin labeling tends to decrease between 1h (Figure 3-A2) and 24h (Figure 3-B2), a feature indicative of a probable degradation of this protein soon after death.

**DNA fragmentation in *postmortem* rat *Longissimus* muscle.** For a purpose of clarity, a more extended discussion will be included in this chapter. Most researches about apoptosis and, more generally, about the programmed cell death, have been and are still carried out on mononucleated cells. As a result, very few are known about muscle cells which greatly differ from usual cell models in that muscle cells are multinucleated. At the functional level, muscle fibers consist of a series of consecutive segments controlled by different nuclei. Each nucleus thus governs only one segment and, under certain adverse conditions, each segment will have a particular behavior being able to be different from the neighboring segments. The use of DNA fragmentation into regular mono- and oligonucleosomal fragments of about 180bp for apoptosis detection is highly controversial in muscle tissue. One major reason is that the number of nuclei concerned during apoptosis is quantitatively highly reduced. As reported by Adams et al. (20) data on the occurrence of skeletal muscle apoptotic nuclei in human or

animal disease models indeed range between 0.03% and 2.1% of the total nuclei. In severe pathological conditions, the TUNEL-positive chromatin-cleavage of muscle fiber nuclei did not exceed 10% of the total damaged muscle cells (21). Now, what could be expected in *postmortem* muscle?

*Postmortem*, the onset of the cell death programme will occur in a non pathological tissue and no amplification of the process could be expected as compared to the severe pathological conditions mentioned before. We observed shrinkage of muscle cells and externalization of phosphatidylserine, two major hallmarks of cells undergoing programmed cell death but could we expect to detect DNA fragmentation? According to the findings depicted in Figure 4, the answer to that question is no but DNA fragmentation was observed in mononucleated cells present in the extracellular matrix. Although it does not concern muscle cells nuclei, this observation constitutes another very strong argument to support the onset of the cell death programme or apoptosis in *postmortem* muscle.

As shown in Figure 4b, few minutes after bleeding an important shrinkage of muscle cells can be observed as compared to the control sample excised from the same muscle on the anaesthetized animal just before bleeding (Figure 4a) where the extracellular space is very limited and regular from one place to another. This change provides a realistic explanation of the extracellular space enhancement reported as the pH is still high (22).

In Figure 4c (15 min *postmortem* sample), DNA fragmentation (dark brown colour) was detected in a mononucleated cell (probably a fibroblast) located within the extracellular matrix. Note the important accumulation in the close proximity of other cells which could correspond to resident macrophages also called ED2 and ED3 macrophages which are known to be unable to develop any phagocytose activity towards degenerative cells (23). Interestingly, such resident macrophages can be observed above and below where they seemed to delineate an empty cell (open arrow). The alignment of these suspected resident macrophages around the dyed cells might contribute to their isolation from their neighbours as soon as they committed to the "suicide" programme. Macrophages are probably attracted by the cells engaged in apoptosis through the translocation of phosphatidylserine to the external leaflet of the membrane, the major signal of its suicide status (17). By contrast, no DNA fragmentation seemed to take place in muscle cells nucleus (closed arrow heads). Moreover, blood macrophages recognize the PS externalized cells through a specific PS receptor, resulting in a possible contribution of macrophages to the target cell dismantling (18).

Figure 4d (24h *postmortem* sample) emphasized the DNA fragmentation occurring in an apoptotic mononucleated cell and further confirmed the accumulation of resident macrophages in the close proximity of the dying cell. In addition, we could suspect that the area indicated by an open star could be a totally degraded fibre with its altered membrane (close arrow heads). The fact that total dismantling of muscle fibres can be completed within the first 24h *postmortem*, is in total contradiction to our previous statement about the extent of apoptosis in *postmortem* muscle (see the introduction section) and is probably a rare exception calling for more detailed investigations. However, we do not actually have a clear overview of what could be expected in *postmortem* muscle.

**Actin degradation.** Amongst the biochemical changes associated with apoptosis, degradation of actin by caspases occurs early in cells undergoing programmed cell death or apoptosis (24-25) and the generated fragments used as a probe for apoptosis detection (26). On the other hand, several groups have observed a degradation of actin in *postmortem* muscle (27-30). Considering these findings, it was decided to follow the degradation of actin in *postmortem* rat *Longissimus* muscle by western blotting and densitometry quantification of the major band observed with a Mr of 32 kDa.

After SDS-PAGE analysis of total muscle extracts prepared at various sampling times, proteins were revealed using a polyclonal anti-actin antibody. The major actin degradation product identified showed a Mr of about 32 kDa (Figure 5b).

Identity of this fragment was established by MALDI-TOF mass spectrometry analysis. The peptide finger prints of the purified protein fragment (Figure 5a), matched with the muscle alpha actin sequence (SwissProt ID: P68133). The coverage of the mature actin sequence was about 50% and the identified peptides were widely distributed along the sequence (from Ala 29 to Arg 372) suggesting that this 32 kDa band is a mixture of different actin fragments of similar Mr. This was supported by the identification of two actin fragments of 31 and 32 kDa after caspase *in vitro* digestion of this protein (25).

The 32 kDa fragment observed in *postmortem* rat muscle (Figure 5b) was quantified by densitometry and the relative amount of this fragment plotted versus time together with the pH drop profile (Figure 5c). According to the results presented here, the amount of the 32 kDa actin fragment increased exponentially after animal death and reached its maximum level as

the pH achieved its ultimate value. Both parameters, i.e. density of the 32 kDa band and pH, were found to be highly correlated to each other (coefficient of determination  $r^2=0.89$ ).

## DISCUSSION

Since the beginning of the present decade, several reports suggested a contribution of caspases, especially caspase 3, to the *postmortem* proteolysis (1-2, 4). On the other hand, caspases are the driven motor of the programmed cell death by apoptosis development. The present work intended therefore to obtain evidence supporting the onset of the apoptotic process in *postmortem* muscle.

The concept of apoptosis was introduced by Kerr et al. (31) to indicate a form of cellular death totally different from necrosis, from both the morphological and biochemical points of view. In muscle tissue, chronological events conducting to apoptosis are the same than in mononucleated cells which are usual models for such studies (32). As previously reviewed (8), in contrast to necrosis often considered as a “disordered” cellular death, apoptosis is regarded as an “ordered” cellular death proceeding through a series of chronological and strictly regulated events:

- Dying cells lose their contact with neighboring cells and signal their status by externalization of phosphatidylserine which are normally located on the inner leaflet of the membrane.
- Concomitantly, the general condensation affecting the dying cells and their organelles led to an intense shrinkage and a significant reduction in the cell volume together with an increase in the extracellular space.
- Mitochondria undergo several major modifications leading to a release of pro-apoptotic proteins including cytochrome c.
- After condensation of the nucleus, chromatin is cleaved in regular fragments of approximately 180 pairs of bases.

According to Green (33), programmed cell death is a rapid process taking place within few minutes to few hours. Hence, if apoptosis set up in *postmortem* muscle, the first characteristic changes induced by process would be detectable soon after animal death. Four of the above hallmarks of apoptosis, including cell shrinkage, phosphatidylserine externalization, DNA fragmentation and actin degradation, were therefore investigated.

It was shown that cell shrinkage is detectable few minutes after exsanguination and that this change progress over time to reach its maximum about 24 hours *postmortem*. For samples excised within 1h *postmortem*, the cell volume decreased by about 20% but all cells are not concerned at the same time, comforting the idea that each cell decides when it will commit to suicide and engages into the cell death programme. After 24 hours, all cells are shrunk and all have the rounding shape characterizing apoptosis. Cell shrinkage led to an important increase in the extracellular space. This increase in the extracellular space was generally ascribed to a decrease in the capacity of myofibrillar protein to bind water during the acidification of muscle and the consequent pH drop (34). The causes of the large raise of the extracellular space in *postmortem* muscle would have to be reconsidered in the light of the present findings.

One of the major consequences of cell shrinkage is the strong constraints supported by the anchorage structures associated to the plasma membrane (costameres, integrins,..) which can be strongly altered. As illustrated in the present work, costameres are sometimes wrenched from the membrane while they are still attached to the transversal intermediate filaments emanating from the Z-line. This limited opening of the membrane will facilitate water flux towards the extracellular space.

The second hallmark of apoptosis considered was the externalization of phosphatidylserine (PS) which move from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane. Using FITC-labeled Annexin V as a specific probe of these acidic phospholipids, it was shown that a strong green labeling was noted in the vicinity of the membrane. To attest the extracellular location of PS, we referred to Laminin, a major component of the basal lamina located in the vicinity of the external membrane leaflet, which ensures the connection of the extracellular matrix to the cell membrane. Laminin was labeled with a specific antiserum and revealed using a cyan 3-conjugate secondary antibody (red color). When the fluorescent images were merged the color changed to yellow indicative of a co-localization of the proteins, i.e. Annexin V and Laminin. In addition, we noted a decrease in the Laminin labeling intensity probably suggesting a probable alteration of this protein over the first 24h *postmortem*. In contrast, intensity of PS labeling seemed to increase over this time laps suggesting a time dependent raise in the number of PS group transferred on the outer leaflet.

The last hallmark of apoptosis studied was the degradation of DNA into standard fragment of about 180bp. In the literature, it was emphasized that fragmentation in muscle cell DNA is

only observed in severe pathological conditions (20-21). Hence, we were not expecting to detect DNA fragmentation in muscle nuclei. However, in apoptotic cells, this process will equally concern muscle and mononucleated cells in which DNA fragmentation could be probably observed. Indeed, whilst no fragmentation was detected in muscle nuclei, several mononucleated cells nucleus were labelled by apostain, a specific antibody recognizing monostranded DNA fragments of regular length, indicative of a fragmentation of DNA characteristic of the apoptotic process.

Taken together, the present findings clearly indicate that after animal bleeding, muscles will engage more or less rapidly in the cell death program through the onset of the apoptotic process. Actin is considered to be one of the first protein substrate to be degraded by caspases. We therefore looked for the time course changes affecting this protein in rat *Longissimus* muscle maintained on the carcass, using western blot analysis of crude muscle extracts. We showed that the amount of the more characteristic 32 kDa actin fragment, a hallmark of the proteolytic action of caspases, increases exponentially over the first 24h *postmortem* and reached its maximum at the rigor completion. The identity of this fragment was established by Maldi-Tof mass spectrometry peptide finger print. Actin, the major protein of the thin filaments, is also implicated in the transversal intermediate filaments connecting myofibrils to the fiber membrane. Which of this actin is degraded by caspases is unknown but we must keep in mind that the total amount of the 32 kDa fragment is negligible as compared to the total actin of the myofiber.

**In conclusion**, the present work provides, for the first time, indisputable evidence supporting the set up of apoptosis in muscle immediately after animal death. It has been further proven that this process affects cell metabolism, oxidative processes affecting proteins, lipids and meat color, cytoskeletal network degradation. These different events contributing the development of different meat qualities (tenderness, color, flavor and juiciness) must be reconsidered in relation with the complex apoptotic induced modifications of cell metabolism and physiology.

Abbreviations used: EDTA, ethylen diamine tetraacetic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; IgG, Immunoglobulin; MCE, 2-mercaptoethanol; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PS, phosphatidylserine; SDS, sodium dodecyl sulfate.

## Acknowledgements

Many thanks to Christine Barboiron, Arnaud Delavaud and Jean-Luc Montel (URH unit, C2M team) for their invaluable assistance in light microscopy studies. This work is part of one of the QUAPA transversal project funded by INRA. The visit of S. Becila in our institute was funded by a grant from the Algerian Ministry of Education. Many thanks for this support.

## REFERENCES

- (1) Ishida, N., Yamashita, M., Koizumi, N., Terayama M., Ineno T., & Minami, T. Inhibition of post mortem muscle softening following *in situ* perfusion of protease inhibitors in tilapia. *Fisheries Sci.* 2003, 69, 632-638.
- (2) Huang, M., Huang, F., Xu, X., Zhou, G. Influence of caspase3 selective inhibitor on proteolysis of chicken skeletal muscle proteins during post mortem aging. *Food Chem.* 2009, 115, 181-186.
- (3) Kemp, C. M., Parr, T. The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle. *Animal.* 2008, 2, 1254-1264.
- (4) Camou, J. P., Marchello, J. A., Thompson, V. F., Mares, S. W., Goll, D. E. Effect of *postmortem* storage on activity of  $\mu$ - and m-calpain in five bovine muscles. *J. Anim. Sci.* 2007, 85, 2670-2681
- (5) Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med.* 2004, 8, 432-444.
- (6) Fuentes-Prior, P., Salvesen, G. S. The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem.J.* 2004, 384, 201-232.
- (7) Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2008, 9, 231-241.
- (8) Ouali, A., Herrera-Mendez, C.H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., Sentandreu, M.A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.* 2006, 74, 44-58.
- (9) Raynaud, F., Fernandez, E., Coulis, G., Aubry, L., Vignon, X., Bleimling, N., Gautel, M., Benyamin, Y., Ouali, A. Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J.* 2005, 272, 2578-2590.
- (10) Vignon, X., Beaulaton, J., Ouali, A. Ultrastructural localization of calcium in *postmortem* bovine muscles: a cytochemical and X-ray microanalytical study. *Histochem. J.* 1989, 21, 403-411.
- (11) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227, 680-685.
- (12) Aubry, L., M.A. Sentandreu, D., Levieux, Ouali, A., Dutaud, D.. Bovine muscle 20S proteasome. III: Quantification in tissue crude extracts using ELISA and radial immunodiffusion techniques and practical applications. *Meat Sci.* 2006, 74, 345-353.
- (13) Op den Kamp, J.A.F. Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 1979, 48, 47-71.
- (14) Devaux, P.F. (1992). Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* 1992, 21, 417-439.
- (15) Zachowski, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: Transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* 1993, 294, 1-14.
- (16) Williamson, P., Schlegel, R.A. Back and forth: The regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells. *Mol. Membr. Biol.* 1994, 11, 199-216.
- (17) Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., LaFace, D. M., Green, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 1995, 182, 1545-1556.

- (18) Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., Henson, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 1992, 148, 2207–2216.
- (19) Colognato, H., Yurchenco, P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dynam.* 2000, 218, 213-234.
- (20) Adams, V., Gielen, S., Hambrecht, R., Schuler, G. Apoptosis in skeletal muscle. *Front.Biosci.* 2001, 6, d1-11.
- (21) Tews, D.S., Goebel, H.H. DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophies. *Neuropath. Appl. Neuro.* 1997, 23, 331-338.
- (22) Guignot, F., Vignon, X., Monin, G. Post mortem evolution of myofibril spacing and extracellular space in veal muscle. *Meat Science*, 1993, 33, 333–347.
- (23) McLennan, I.S. (Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres. *Cell Tissue Res.* 1993, 272, 193-196.
- (24) Mashima, T, Naito, M, Fujita, N, Noguchi, K, Tsuruo, T. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 217, 1185-1192
- (25) Kayalar C., T. Testa O., P., Zhong M. L.T., Bredesen, D.E. Cleavage of actin by interleukin 1(3-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, 93, 2234-2238.
- (26) Yang, F., Sun, X., Beech, W., Teter, B., Wu, S., Sigel, J. Vinters, H.V., Frautschy, S.A., Cole, G.M.. Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 1998, 152, 379-389.
- (27) Sancho, R., Jaime, I., Beltran, J.A., Roncales, P. Degradation of actin by cathepsins in beef fibers stored at 20°C. *J. Muscle Foods.* 1997, 8, 137-146.
- (28) Lametsch, R., Roepstorff, P., Bendixen E. Identification of Protein Degradation during Postmortem Storage of Pig Meat. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5508-5512.
- (29) Lametsch, R., Karlsson, R.A., Rosenvold ,K., Andersen, H. J., Roepstorff, P., Bendixen, E. Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6992-6997.
- (30) Morzel, M.; Hamelin, M.; Sante´-Lhoutellier, V.; Sayd, T.; Monin, G.; Chambon, C. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci.* 2004, 67, 689-696.
- (31) Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R.). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer.* 1972, 26, 239–257.
- (32) Fidzianska, A., Kaminska, A., Glinka, Z. Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. *Neuropat. Polska.* 1991, 29, 19–28.
- (33) Green, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.* 2005, 121,671–674.
- (34) Offer, G., Trinick, J. On the mechanism of water holding in meat: The swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Sci.* 1983, 8, 245-281.
- (35) Prochazkova, J., Kylarova, D., Vranka, P., Lichnovsky, V. Comparative study of apoptosis-detecting techniques: TUNEL, apostain, and lamin B. *Biotechniques.* 2003, 35, 528-534.

#### 4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Ces résultats s'inscrivent dans la continuité des résultats de la publication n°2 ce travail est réalisé en commun par Delphine MEILHAC et moi-même dans le cadre de son Master 1. Cette expérience nous a permis de tester d'autre marqueur de l'apoptose afin de connaître quelle voie est empruntée une fois que le phénomène est déclenché. Le suivi cinétique de ces marqueurs est fait par l'analyse des western blots réalisés sur des extraits de muscle *longissimus dorsi* de rat.

Les marqueurs recherchés sont :

- La caspase 3 : est une caspase effectrice qui déstructure la cellule lors de la phase d'exécution de l'apoptose.
- La caspase 8 : est une caspase impliquée dans la phase d'initiation de l'apoptose
- Le cytochrome c : une fois libéré par les mitochondries il va former un complexe capable d'activer la procaspase 9 laquelle activera, à son tour, les caspases effectrices. Donc un bon marqueur du déclenchement du processus d'apoptose.

Au cours de la réalisation de cette partie nous avons également mesuré le pH du muscle, ainsi que la concentration des protéines dans le culot et le surnageant ce qui nous a amené à des constatations très intéressantes qui seront présentées dans nos résultats en plus des résultats sur la recherche des marqueurs de l'apoptose par Western blot.

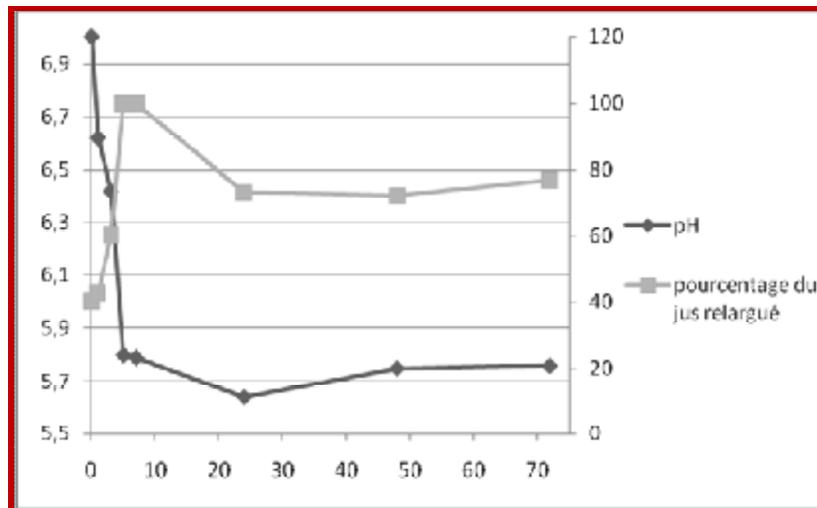
##### 4.1. MODIFICATION PHYSICOCHIMIQUES DANS LE MUSCLE DE RAT

Au cours de l'extraction des mitochondries par densitomètre, afin de rechercher les marqueurs de l'apoptose, nous avons observé. Après centrifugation, une variation très importante du volume de du tampon d'extraction en fonction du temps de prélèvement du muscle (**Figure 67**).

Nous avons noté une augmentation importante de la quantité de surnageant récolté entre 2 et 4h post mortem (**Figure 68**). L'augmentation du volume de liquide relargue les premières heures où le pH est encore élevé est probablement liée à une rétraction importante des cellules. Cette chute de rétention d'eau des protéines myofibrillaires est accentuée par la



**Figure 67 :** Evolution de la quantité de surnageant récolté lors de l'extraction du muscle de rat



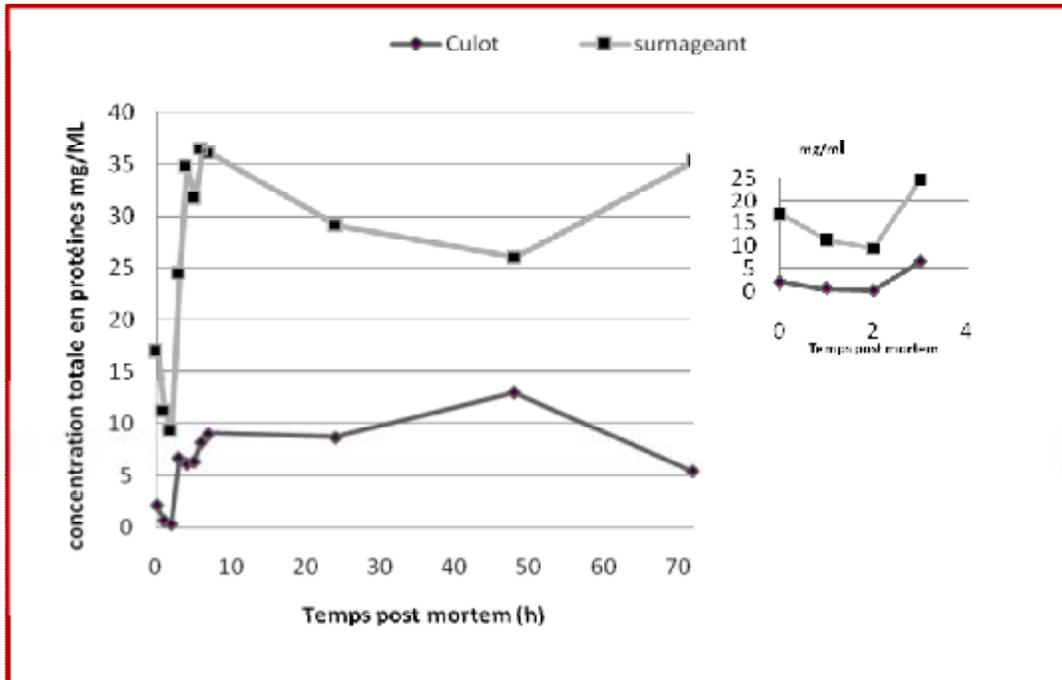
**Figure 68.** Evolution du pH et du volume du surnageant de l'extrait musculaire de rat au cours du temps post mortem

vitesse de chute du pH du muscle. Le pouvoir des myofibrilles à retenir l'eau est très influencée par la chute du pH post mortem : en s'approchant de leur point isoelectrique, le pH agit sur les liaisons eau/protéines, qui conduit à une diminution de la quantité d'eau immobilisée dans le réseau protéiques (Boakye et Mittal 1993)

Nous avons également, observé une augmentation de concentration des protéines totales dans le surnageant et le culot. Le dosage des protéines a été fait par la méthode de Bradford. (**Figure 69**). Pour les deux fractions, on observe une allure semblable entre les deux courbes. Tout d'abord, une diminution jusqu'à 2 h post mortem, suivi d'une rapide augmentation entre 3 et 6 h post mortem (Figure 69). Cependant en remarque l'augmentation de la concentration des protéines dans le surnageant et beaucoup plus importante que dans le culot. Donc les protéines en plus tendance à ce solubilisées au cours du temps post mortem cela pourrait être s'expliquer par l'altération de l'ultra-structure myofibrillaire et l'affaiblissement des liaisons entre protéines en s'approchant de leurs point isoélectrique, qui augmenteraient leurs solubilité au cours du temps post mortem.

Plusieurs travaux en démontrer une augmentation de la solubilité des protéines au cours de la transformation du muscle en viande (Rosset et *al.*, 1984). Cette dégradation est du à une action enzymatique, principalement celle des calpaïnes qui sont très actives aux premières heures post mortem, le pH étant encore élevé (Koochmaraie 1992a ; Taylor 1995b ; Sentandreu et *al.*, 2002). Une fois le pH chute Après la mort de l'animal, entraînant la rupture des membranes des lysosomes et donc une libération des cathepsine. Des études *in vitro*, où les protéines myofibrilles sont incubées avec des enzymes lysosomales, révèlent qu'elles sont capables de dégrader la troponine T, la titine, l'actine, la myosine, l' $\alpha$ -actinine (Mikami et *al.*, 1987 ; Ouali et *al.*, 1987). Même si plusieurs des changements post mortem de l'ultrastructure du muscle peuvent être imités par le traitement des myofibrilles avec les extraits lysosomaux, certains autres telle la diminution de la densité de la ligne Z sont expliqués par le traitement des myofibrilles avec des calpaïnes ou le protéasome.

Puisque tous ces changements structurels identifiés dans le muscle post mortem ne peuvent pas être expliqués par l'action d'un seul système protéolytique, en effet le processus est multienzymatique impliquant ces systèmes et probablement d'autre dont la fonction, dans le muscle post mortem, est moins bien connu (protéasome, caspases,...) (Ouali et *al.*, 2006).



22

**Figure 69.** Evolution de la concentration en protéines totaux dans les deux fractions culot et surnageant de extrait musculaire de rat au cours du temps post mortem

## 4.2. RECHERCHE DE MARQUEUR DE LA VOIE APOPTOTIQUE PAR WESTERN BLOT

### 4.2.1. Révélation de l'activation de la caspase3

Dans le monde vivant, toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant :

Un prodomaine N-terminal de taille variable, ayant un rôle primordial dans les interactions protéine-protéine, en particulier avec les protéines régulatrices de l'apoptose

Un second domaine qui deviendra, après clivage, la grande sous-unité (L pour Large) et qui porte le site actif de l'enzyme avec un résidu cystéine (C) et un résidu histidine (H)

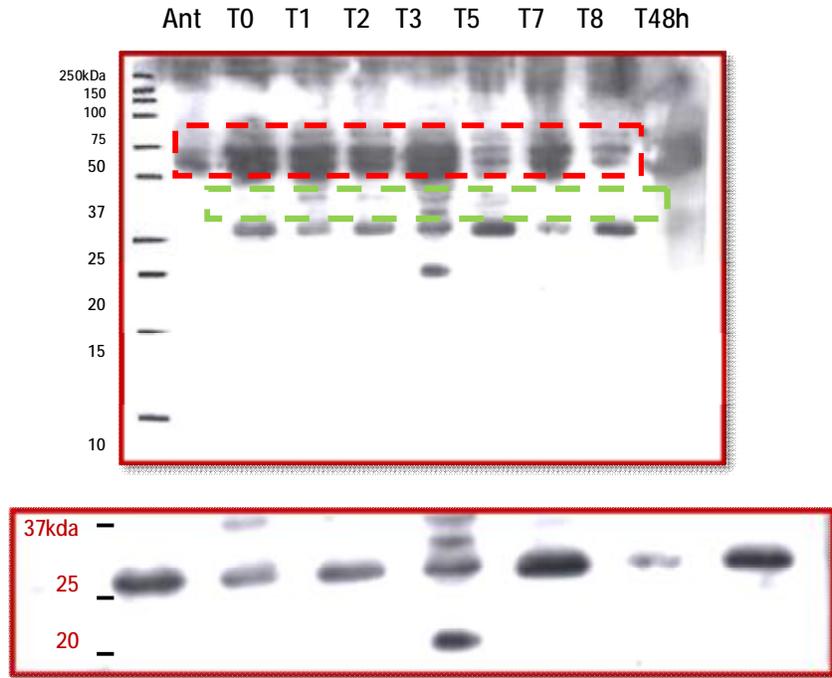
Un troisième domaine qui deviendra, après clivage, la petite sous-unité (S pour small) et qui a un rôle conformationnel.

Sous cette forme, l'enzyme est inactive. Pour qu'elle soit activée, l'enzyme doit subir une maturation au cours de laquelle le prodomaine N-terminal est éliminé. Pour l'activation de la caspase 3 des clivage de la procaspase 3 génère des fragment de 20, 17 et 11kDa (Liu et al., 2005). Le poids moléculaire de la procaspase 3 est de 32 kDa (Kemps et al., 2006). La caspase 3 est une caspases effectrices qui déstructure la cellule lors de la phase d'exécution de l'apoptose.

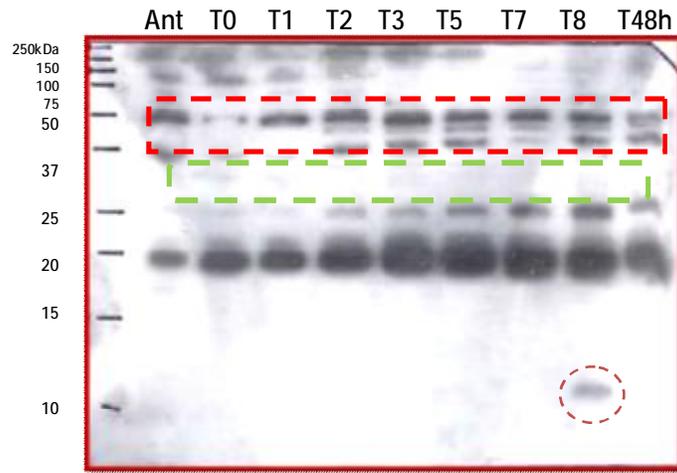
Le Westen blots effectué sur le surnageant et révélé au sérum polyclonaux dirigé contre la caspase 3 montre une bande de 32 et une bande à 20 kDda qui correspond respectivement à la procaspase et à l'isoforme active de la caspase 3 (**Figure 70**). La forme active de la caspace 3 apparait à 3 h post mortem.

Pour les bandes de hauts poids moléculaires entre (35 et 75kDa) et entre (150-250 kDa), elles représentent des formes complexées de la caspase 3 avec des inhibiteurs endogènes.

Le Western blots révélé a la caspase 3 réalisé sur le culot qui contient normalement les extrait de mitochondrie et tout les organites de la cellule, révélé la même bande de 20 kDa la forme active de la caspase 3 (**Figure 71**). Cette forme est présente dans la cellule musculaire avant la mort de animal, l'intensité de cette bande augmente après la saigné de animal avec l'apparition à 2h post mortem de deux autre bande a poids moléculaire de 21 et 25 kDa.



**Figure 70** Western blots réalisé sur les surnageant de rat avec l'anticorps polyclonaux dirigé contre la caspase 3. Ant. représente le prélèvement avant la mort de animal T0,...T48 représente les différents temps de prélèvements après la saigné de l'animal



**Figure 71** Western blots réalisé sur le culot de rat avec l'anticorps polyclonaux dirigé contre la caspase 3 Ant. représente le prélèvement avant la mort de animal T0,...T48 représente les différents temps de prélèvements après la saigné du rat

Une bande 11 kDa apparaît à 8 h post mortem elle représente une autre forme active de la caspase 3, (zone en rouge **Figure 71**). Cette forme d'isoforme active de la caspase 3 a été rapporté par Liu et al., 2005.

En remarque que la procaspase 3 n'est pas présente dans le culot (zone verte de la **figure 70 et 71**) comparativement au western du surnageant ou en retrouve le liquide intra et extracellulaire et tout les éléments de cellule musculaire à faible poids moléculaires.

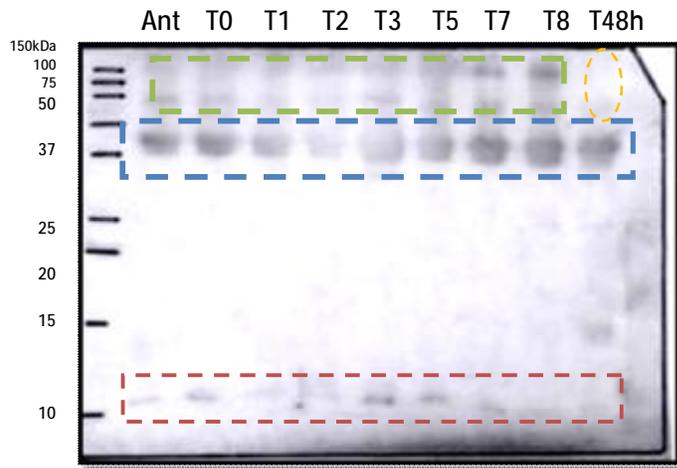
Cette différence de forme présente entre les deux fractions du culot et surnageant pourrai être expliqué par la localisation de la caspase 3 dans cellule musculaire. On la retrouve généralement au niveau du réticulum endoplasmique au niveau du cytosol et dans les mitochondrie (Nakagawa et al., 2000). et après broyage du muscle elle passe dans la fraction soluble. Kemp et al 2006 rapports des poids moléculaires de 20 et 32 de la forme active chez le porc.

On retrouve également quelques bandes de hauts poids moléculaires entre (35 et 75 kDa) et entre (150-250 kDa), elles représentent des formes complexées de la caspase 3 avec des inhibiteurs endogènes. Ce pendant elles sont moins intense dans le culot que dans le surnageant (zone rouge **figure 70 et 71**).

Le tissu musculaire contient plusieurs inhibiteurs de sérine protéases (Sentandreu et al., 2002). Kuehn et al. (1984) ont montré l'existence de quatre activités inhibitrices dans la fraction cytosolique du muscle squelettique de rat. Trois de ces activités correspondent à des protéines de 50, 65 et 65 kDa et sont des homologues des inhibiteurs de sérine protéinases de la famille des serpins.

#### 4. 2. 2. Révélation de l'activation de la caspase 8

Le précurseur de la caspase 8 inactive a un poids moléculaire de 55 kDa pendant la phase d'activation, la caspase 8 mature est libéré son poids moléculaires est de 18 et 11 kDa sont générés. On a aussi la procaspase 8 qui a un poids de 44/42 kDa (Belka et al., 1999 ; Vit et al., 2001 ; Philchenkov 2004). En ce qui concerne la caspase 8, l'évolution du taux de la forme mature de la caspase 8 augmente au cours du temps (**Figure 72 zone en rouge**). Cependant en remarque plus la présence de la procaspase 8 poids entre 44/42 kDa (Figure 72



**Figure 72** Western blots réalisé sur les surnageant de rat avec l'anticorps polyclonaux dirigé contre la caspase 8. Ant. représente le prélèvement avant la mort de animal T0,...T48 représente les différents temps de prélèvements après la saigné de l'animal

zone bleu). Nous avons également remarqué des forme complexé de l'enzyme à des poids moléculaires plus élevés entre 60 et 150 kDa (**figure 72** zone en vert), à 48h post mortem les bandes de hauts poids moléculaires formant des complexes disparaissent (zone jaune **figure 72**).

#### 4. 2. 3. Révélation du cytochrome c

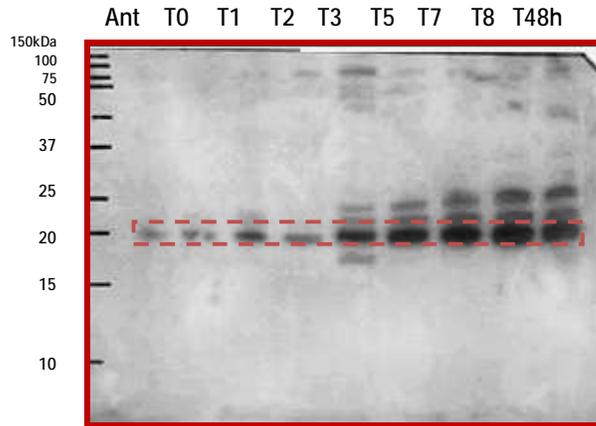
Le Western blots révélé au cytochrome c réalisé sur le culot qui contient normalement les extrait de mitochondrie et tout les organites de la cellule, révélé une bande de 20 kDa (**Figure 73**), l'intensité de cette dernière augmente au cours du temps post mortem. A 3h post mortem en remarque 3 autres bandes leurs poids moléculaires varie entre 20 et 25 Kda. Le cytochrome C a normalement un poids moléculaire 12,3 kDa, mais nous avons observé lors de nos test sur le sérum d'anticorps contre le cytochrome c testé sur une solution du cytochrome c acheté du commerce (Sigma, C2037 from bovine heart) se western nous révèle que cette molécule s'oxyde rapidement une voie extraite et se dimerise pour formé un complexe à environ 20/22 kDa (**Figure 74**). Le même phénomène d'oxydation a été observé par Semenкова et al., 2003

L'analyse par densitométrie (l'application d'UNSCANIT de l'informatique de RITME Paris) de la bande du cytochrome c oxydé (**figure 74** Zone rouge) révèle que a quantité maximal est obtenu au bout de 7 h post mortem qui correspond a un pH de 5,8. Cette valeur est environ 3 plus grand que le niveau basique au temps ante mortem (**Figure 75**).

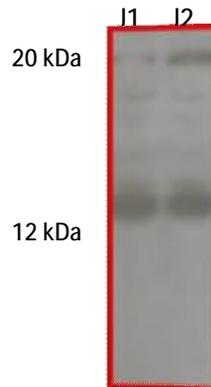
Selon l'effecteur déclenchant de l'apoptose, on distingue deux voies d'initiation du processus qui sont la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

La voie extrinsèque implique les récepteurs de mort présents sur la face externe de la membrane cellulaire qui, après activation, vont conduire à la formation de complexes membranaires intracellulaires. Ce complexe est l'activateur des caspases initiatrices, lesquels iront activer ensuite les caspases exécutrices.

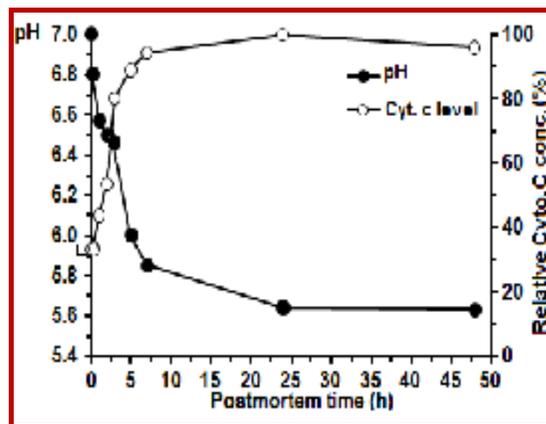
La voie intrinsèque est initiée par une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 (Bid) qui va s'associer à la mitochondrie et libérer le cytochrome c dans le cytoplasm. Parallèlement, le calcium dont l'origine peut être diverse (reticulum sarcoplasmique, extracellulaire, ...) va s'accumuler dans la mitochondrie et contribuer à la libération du cytochrome c. Ce cytochrome c va former un complexe capable d'activer la procaspase 9



**Figure 73** Western blots réalisés sur le culot mitochondriale de rat avec l'anticorps polyclonaux dirigé contre le cytochrome c. Ant. représente le prélèvement avant la mort de animal T0,...T48 représente les différents temps de prélèvements après la saigné de l'animal



**Figure 74** : Western blot avec un anticorps anti-cytochrome c. la solution utilisé est préparé avec du cytochrome c acheté 1g/ml. Deux temps on été testés J1et J2 qui correspond à 24h et 48h après la préparation de la solution



**Figure 75** : Evolution de la concentration en cytochrome c dans le culot mitochondriale et du pH intramusculaire du muscle *longissimus dorsi* de rat au cours du temps post mortem

laquelle activera, à son tour, les caspases exécutrices. Le point commun à ces deux voies est le passage nécessaire par des complexes d'activations des caspases initiatrices.

Les observations des westerns blots réalisés sur les surnageants et les culots mitochondriaux révélés avec des anticorps anti-cytochrome c, anti-caspase-3 et anti-caspase-9 confirment les résultats obtenus pour les paramètres déjà testés à savoir la rétraction cellulaire ; l'externalisation des groupements phosphatidylserine, l'hydrolyse de l'actine et la dégradation de l'ADN.

Au cours du suivi de la cinétique d'évolution de concentration de la caspase 3 nous avons observé une augmentation de l'intensité de la bande de la forme mature de la caspase 3. Cette augmentation est concomitante avec l'augmentation de la concentration du cytochrome c dans l'extrait mitochondrial. L'activation de la caspase 3 représente une étape clef dans l'apoptose puisque cette étape est considérée comme le point de non retour du processus apoptotique. Suite à ces résultats il est donc envisageable de penser que la voie empruntée est la voie intrinsèque mitochondriale.

#### **4. Conclusion**

Ces résultats très préliminaires semblent confirmer la mise en place du processus apoptotique peu après la mort de l'animal. Toutefois, il est un peu tôt pour tirer des conclusions sur les mécanismes et les stimuli déclenchant le processus apoptotique même si l'anoxie et l'altération des mitochondries semblent être les deux premières voies à explorer.

# **Chapitre IV : INHIBITION DE CASPASES INITIATRICES ET EXECUTRICES PAR LES bovSERPINA3-1 ET A3-3**

## **Préambule**

Ce travail a été réalisé, pendant mes différents séjours en France, en collaboration avec Carlos HERRRA-MENDEZ, étudiant Mexicain en séjour à Clermont Ferrand pour la préparation de sa thèse, et Xavier BLANCHET, étudiant en thèse au Laboratoire de Génétique moléculaire Animale à l'Université de Limoges. La collaboration à ce travail m'a permis de me former aux mesures de cinétiques enzymatiques et, plus particulièrement, à la détermination des constantes d'association caractérisant la vitesse d'interaction des serpins avec leurs protéases cibles.

Avant de présenter l'article qui est publié dans le Journal FEBS Letters, je voudrais présenter la séquence complète des deux serpins utilisées dans ce travail (bovSERPINA3-1 et A3-3 ainsi que la méthode utilisée pour déterminer la constante d'association ( $k_{ass}$ ) des serpins avec la caspase 8, caspase initiateur et la caspase 3, caspase exécuteur. Ce protocole soumis avec l'article en document complémentaire (Supplemental data file), est publié en même temps que l'article et sera disponible en ligne par Internet.

# Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3

Carlos H. Herrera-Mendez<sup>1</sup>, **Samira Becila**<sup>1</sup>, Xavier Blanchet<sup>1</sup>, Patrick Pelissier, Didier Delourme, Gerald Coulis, Miguel A. Sentandreu, Abdelghani Boudjellal, Laure Bremaud, Ahmed Ouali

<sup>1</sup> **Contribution similaire de ces auteurs à ce travail**

## 5. Supplemental data file

Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3

Carlos H. Herrera-Mendez<sup>d1</sup>, Samira Becila, Xavier Blanchet, Patrick Pelissier, Didier Delourme, Gerald Coulis, Miguel A. Sentandreu, Abdelghani Boudjellal, Laure Bremaud<sup>b</sup>, Ahmed Ouali

Content:

1. Full sequence of the mature serpins investigated
  2. Determination of the second order association rate constant
- 

1. Full sequence of the mature serpins investigated:

>BovSerpina A3-1 previously designed endopin 1A\* (GenBank: AAY22405)

```
1      LPENVVVKDQ HRRVDGHTLA SSNTDFAFSL YKQLALKNPV KNVILSPLSV SIALAFSLG
61     ARGSTLTEIL EGLKFNLTEI QEKEIHHSFQ HLLQALNQPS NQLQLSVGNA MFVQEELKLL
121    DKFIEDAQVL YSSEAFPTNF RDSEAARSLI NDYVKNKTQG KIEELFKYLS PRTELVLVNY
181    IYFKAQWKTP FDPKHTEQAE FHVSDNKTVE VPMMLDLET PYFRDEELGC TLVELTYTSN
241    DSALFILPDE GKMRDLEAKL TPETLTRWRN SLQPRRIHEL YLPKFSIKSN YELNDILSQL
301    GIRKIFANAD LSGITGTADL VVSQVVHGAA LDVDEEGTEG AAATGISMR TILRIIVRVN
361    RPFLIAIVLK DTQSIIFLGK VTNPSEA
```

(\* The presumed P1 residues (Arg<sup>350</sup> for trypsin and Asp<sup>371</sup> for caspases) are in bold and underlined

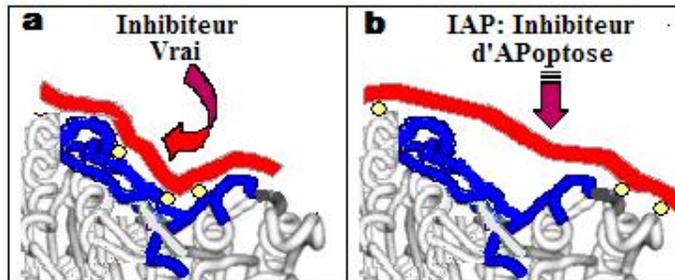
>BovSerpina A3-3 previously designed endopin 1B\* (GenBank: AAY22406)

```
1      LPENVVVKDR HRRVDGHTLA SSNTDFAFSL YKQLALKNPV KVMFSPPLSV SMALAFSLG
61     ARGPTLTEIL EGLKFNLTEI QETQIHQGFQ HLLQALNRPR NQLQLSVGNA MFVQEELKLL
121    DKFIEDARVL YSSEAFPTNF RDPEAAKSLI NDYVKNKTQG KIEELFKDLS PRTELVLVNY
181    VYFKAQWKTR FDPKHTEQAE FHVSDNKTVE VPMMLDLET PYFRDEELGC TLVELTYTSN
241    DSALFILPDK GKMQDLEAKL TPEMLTRWRN SLQPRRIHEL YLPKFSIKSN YELNDTLSQM
301    GIKKIIFTDAD LSGITGTADL VVSQVVHGAA LDVDEEGTEG AAATGIGIER TFLRIIVRVN
361    RPFLIAVVLK DTQSIIFLGK VTNPSEA
```

(\* The presumed P1 residues (Arg<sup>350</sup> for trypsin and Asp<sup>371</sup> for caspases) are in bold and underlined

2. Determination of the second order association rate constant

Caspases (1 nM and 3.5 nM for caspases 3 and 8, respectively) were incubated with 100 μM of their appropriate substrates and incubated in plate wells and the reaction proceeds in a total final volume of 500 μl. The fluorescence was recorded continuously and after defined laps of time, 5 μl of inhibitor was added and the fluorescence recorded again. The relative fluorescence increase was then plotted versus time (Figure S1).



**Figure76 :** Mode d'interaction d'un inhibiteur vrai (a) et des IAP (b) avec le site actif de l'enzyme. (a) l'inhibiteur vrai a une forme complémentaire du site actif (en bleu) de l'enzyme et occupe tout ce site grâce à plusieurs points d'interaction (ronds jaune) avec la protéine enzymatique. (b) Les points de liaison des IAP à la protéine enzymatique sont hors du site actif et ces protéines vont induire un encombrement du site actif suffisant pour empêcher la fixation des protéines substrats.

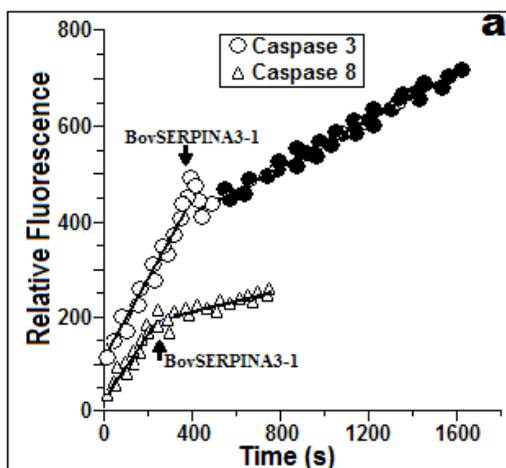


Figure S1: Recording of the time course change in the fluorescence before and after addition of the inhibitor (bovSERPINA3-1).

For each inhibitor concentration, fluorescence values obtained after addition of the inhibitor were taken out (closed circles in Figure S1) and used for the determination of  $\text{Ln} ([P]_{(t+dt)} - [P]_t)$ . Calculated values were then plotted against time (Figure S2) and  $k_{\text{obs}}$  for each serpin concentration tested derived from,

$$\text{Ln} ([P]_{(t+dt)} - [P]_t) = C + k_{\text{obs}}t$$

where  $[P]_{(t+dt)}$  is the product concentration at time  $(t + dt)$  of the association reaction and  $[P]_t$  is the product concentration at time  $t$ .

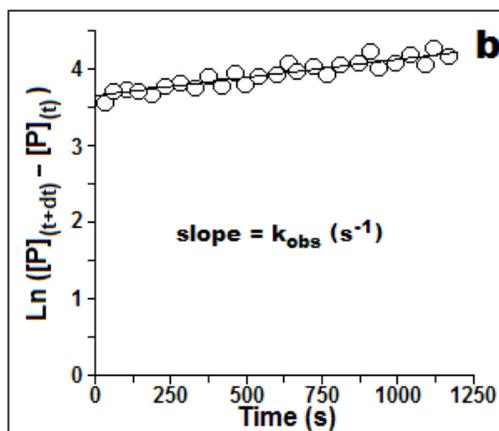
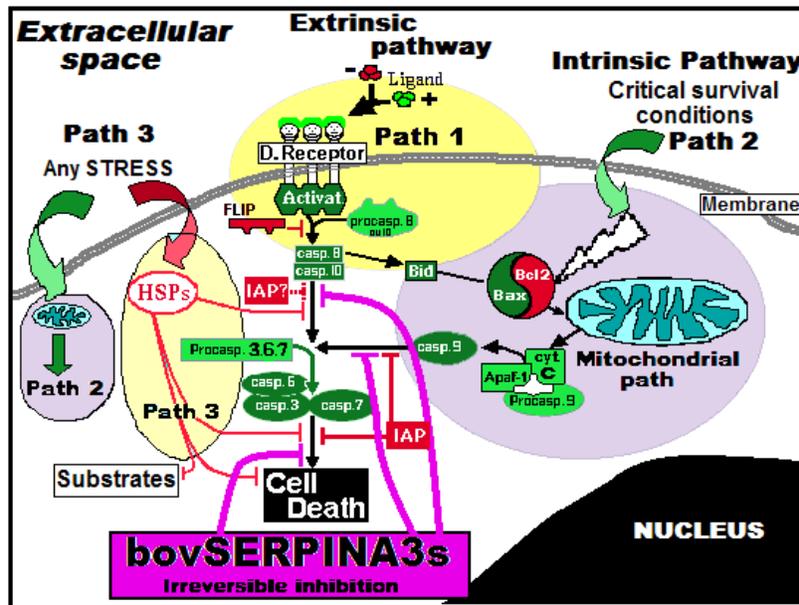


Figure S2: Plot of  $\text{Ln} ([P]_{(t+dt)} - [P]_t)$  versus time which estimates  $k_{\text{obs}}$  for each concentration of inhibitor tested.



**Figure 77.** Régulation du processus apoptotique. Voie 1 aussi appelée extrinsèque : après activation du récepteur de mort par son effecteur proapoptotique, il y a activation du complexe membranaire intracellulaire associé au récepteur qui va fixer diverses protéines pour former un complexe capable d'activer la procaspase 8 par des interactions spécifiques. Cette voie est régulée par des inhibiteurs porteurs des mêmes motifs de liaison de la caspase 8 que ceux qui sont présents sur les complexes activateurs. Ces inhibiteurs vont venir en compétition avec les activateurs pour fixer les procaspases 8 et 10. Si les caspases initiateuses parviennent à être activées, la cellule possède des inhibiteurs d'apoptose (IAP) capables de ralentir voire stopper le processus en inactivant la caspase 8. Ces IAP seraient aussi capables d'inactiver les caspases effectrices (caspases 3 et 7). Voie 2 aussi appelée intrinsèque : Sous l'impulsion de Bax (partie en vert), une protéine proapoptotique, il y a formation d'un complexe qui va se fixer sur la membrane externe de la mitochondrie et altérer cette dernière avec une accumulation concomitante de calcium dans la mitochondrie. Cette altération va conduire à la libération de cytochrome c qui va contribuer à la formation, avec d'autres protéines, d'un complexe responsable de l'activation de la procaspase 9. Cette action de Bax peut être contrecarrée par Bcl-2, protéine à activité antiapoptotique. Si le complexe parvient à se former, le processus peut encore être bloqué par les inhibiteurs d'apoptose (IAP) qui vont s'associer à la procaspase 9 et empêcher son activation. Voie 3 : cette voie constitue la conséquence primaire des différents types de stress que la cellule ou l'organisme va subir. Dans ce cas, la réaction des cellules se traduit par une synthèse intense d'HSP's (Heat Shock Proteins) dont l'action va globalement se traduire par un ralentissement du processus apoptotique. En parallèle, le stress peut conduire à une activation de la voie 2 ou voie mitochondriale et calcium dépendante. Abréviations : Apaf-1, APOptose Activating Factor-1 ; IAP, Inhibitor of APOptose ; Bax et Bcl2 : deux protéines de la même famille avec effets opposés ; Activat. : complexe d'activation des caspases initiateuses ; Cyt c : cytochrome c ; HSP: heat shock proteins ou protéines du stress.

The second order rate constant ( $k_{ass}$ ) was derived according to the following relationship.

$$k_{ass} = (k_{obs} / I) (1 + S/Km)$$

The plot of  $k_{obs}$  versus [I] (Figure S3) is a straight line and the association rate was derived from the slope according to the following equation:

$$\text{Slope value} = k_{ass} / (1 + S/Km)$$

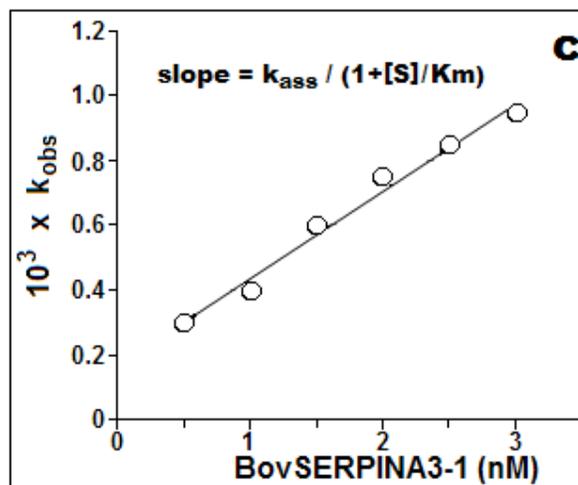


Figure S3: Plot of  $k_{obs}$  versus inhibitor concentrations allowing the determination of the second order association rate constant  $k_{ass}$ .

#### 4. DISCUSSION-CONCLUSION

Ce travail est le premier à démontrer l'expression dans les tissus et cellules de mammifères, de serpins capables d'inhiber fortement à la fois les caspases initiateur et les caspases exécutrices. La seule serpine connue à ce jour pour ses capacités à inhiber les caspases est une serpine d'origine virale (virus responsable de la fièvre jaune) dénommée CrmA pour Cytokine Response Modifier A (Ray et al., 1992). Pour le virus, cette serpine permet une inhibition du processus de mort cellulaire et de tout processus inflammatoire, deux mécanismes conduisant à la mort des cellules infectées. L'inhibition de ces processus va permettre au virus de se multiplier, par réplication de son matériel génétique, dans la cellule hôte.

Dans les cellules de mammifères, les seuls inhibiteurs connus des caspases font tous parti de la famille des inhibiteurs d'apoptose ou IAP pour Inhibitor of Apoptosis Proteins. En fait, il ne s'agit pas de véritables inhibiteurs puisqu'ils n'interagissent pas, comme le font tous les inhibiteurs de protéases connues à ce jour, avec les acides aminés responsables de la catalyse de l'hydrolyse des liaisons peptidiques et situées dans le site actif des enzymes (**Figure 76**).

Par ailleurs, au cours du processus apoptotique, les mitochondries vont subir des altérations profondes et libérer dans le cytosol, des inhibiteurs des IAP qui vont dissocier les complexes caspases/IAP déjà formés. Ceci rend peut-être le système IAP moins efficace dans l'inhibition de l'apoptose ou d'une inflammation déclarée.

Les serpins purifiées à partir du muscle de bovin sembleraient constituer un moyen de contrôle plus efficace du processus apoptotique dans la mesure où elles sont capables de former des complexes stables avec les caspases. Ces complexes étant covalents, l'inhibition des caspases est, par voie de conséquence, pratiquement irréversible. Le mécanisme d'action de ces serpins semble un peu différent de celui rapporté pour le CrmA et devra être élucidé.

Ces 2 serpins font parties d'une famille comprenant au moins 8 serpins différentes qui peuvent se classer en deux sous-familles. Une première comprenant les bovSERPINA3-1 à A3-6 ? Chacun des membres de cette première sous-famille serait capable d'inhiber la trypsine et les caspases sans pour autant pouvoir préciser si chacune a une caspase particulière comme cible ou si chacune peut agir sur plusieurs caspases comme nous l'avons vu avec les deux spécimens étudiés. La seconde sous-famille serait constituée des bovSERPINA3-7 et

A3-8, serpin incapable d'inhiber la trypsine mais capable d'inhiber fortement l'élastase et peut-être, pour l'une d'entre elle, les caspases. Ce dernier point reste toutefois à vérifier. Ces deux sous familles pourraient correspondre aux sous familles des caspases connues pour être impliquées dans les processus de mort cellulaire (caspases initiateur et exécutrices) ou dans les processus inflammatoires (caspases de l'inflammation). Tous ces éléments très prospectifs ne sont, pour le moment, que des hypothèses de travail pour le futur.

Si nous nous intéressons au processus de mort cellulaire par apoptose, nous pouvons essayer de préciser le rôle potentiel de ces serpin dans l'apoptose.

#### **4.1. IMPLICATION DES bovSERPINA3s DANS LE PROCESSUS APOPTOTIQUE**

Selon la nature du stimulus qui déclenche la mort cellulaire par apoptose, on distingue deux voies d'activation de ce processus : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (**Figure 77**).

##### **4.1. Voie extrinsèque**

Dans ce cas le stimulus déclencheur de l'apoptose est d'origine extracellulaire. Il s'agit d'un ligand qui va venir se fixer sur le récepteur de mort (Death Receptor). La fixation de ce ligand au récepteur va déclencher l'activation de complexes transmembranaires capables d'activer les procaspases initiateur (caspases 8 et 10) en caspases actives qui vont, à leur tour, activer, par protéolyse ménagée, les procaspases effectrices (caspase 3, 6 et 7) en caspases actives. Ces dernières vont ensuite initier la dégradation des structures cellulaires et la mort de la cellule.

Dans tous les cas, cette voie est associée à une altération profonde des mitochondries qui vont déverser, dans le compartiment cytoplasmique, des activateurs du processus apoptotique intervenant à différents niveaux du processus [cytochrome c, inhibiteur capable de dissocier les complexes caspases-IAP (Inhibiteur d'apoptose), ...etc].

##### **4.2. Voie intrinsèque**

Cette voie est déclenchée par la cellule elle-même lorsque celle-ci se trouve dans des conditions difficiles de survie et où la mort cellulaire est le seul échappatoire. L'initiation du processus est le résultat d'une altération profonde des mitochondries qui vont libérer des activateurs d'apoptose similaires à ceux qui interviennent dans la voie extrinsèque. C'est le

cas en particulier du cytochrome c qui est indispensable à la formation de l'apoptosome (complexe impliquant le Cyt C, l'Apaf-1 (*Apoptose Activating Factor-1*) et la procaspase 9) et d'autres constituants à activité pro-apoptotique. Une fois activée, la caspase 9 va à son tour activer les procaspases exécutrices en caspases actives.

#### **4.3. Les points de contrôle très étudiés à des fins thérapeutiques**

Plusieurs points de contrôle du processus apoptotique font aujourd'hui l'objet d'investigations intenses en vue de trouver des agents thérapeutiques plus efficaces, contre des pathologies liées à des dysfonctionnements de ce processus de mort cellulaire, comme les cancers.

Le premier point de contrôle concerne les inhibiteurs d'apoptose (IAP) avec comme objectif de réduire leur expression ou leur efficacité à inhiber les caspases (Watson and Fitzpatrick, 2005 ; Domagoj and Fairbrother, 2007). A noter que si les IAP sont des inhibiteurs très efficaces des caspases 1 et 9, ils sont beaucoup moins efficaces à inhiber les autres caspases.

Le second point concerne les protéines de la famille Bcl2 (B-cell lymphoma protein 2) qui régulent l'altération des mitochondries, certaines de ces protéines ayant en effet le pouvoir de protéger ces organites (activité anti-apoptotique) alors que d'autres (activité pro-apoptotique) ont un effet opposé (Vogler et al., 2009). L'objectif sera dans ce cas à rechercher à privilégier l'action des protéines de cette famille ayant une action anti-apoptotique et donc celles qui préviendront toute altération des mitochondries.

#### **4.4. Implication des bovSERPINA3s dans le processus apoptotique**

Comme cela est indiqué sur la **figure 77**, les bovSERPINA3s vont s'insérer à tous les stades du processus en participant au contrôle des activités des caspases initiateur (caspases 8, 9 et 10) et des caspases exécutrices (caspases 3, 6 et 7). Leur aptitude à inhiber de façon pseudo-irréversible les caspases va en faire des acteurs de tout premier plan pour bloquer le processus apoptotique et, par voie de conséquence, elles peuvent jouer un rôle important dans les processus de cancérisation qui ont en commun, l'immortalisation et la prolifération rapide des cellules malignes. Même si l'inhibition de toutes les caspases par les bovSERPINA3s ne soit pas encore démontrée, il est probable que, du fait de la redondance

observée au sein de ce groupe de serpins, l'un ou l'autre des différents membres de cette famille auront la possibilité d'inactiver l'une ou l'autre des caspases.

Sur le plan de la mise en place des qualités de la viande, il nous faut maintenant préciser le rôle de ces inhibiteurs dans la régulation de la protéolyse post mortem et mieux comprendre le rôle des caspases dans cette protéolyse dont l'intensité, rappelons le, est proportionnelle à la tendreté ultime de la viande.

Sur le plan des pathologies associées à un dysfonctionnement de l'apoptose, Les questions auxquelles nous devons maintenant répondre sont :

- Quelles sont, chez l'homme, les serpins capables d'assurer la même fonction que les bovSERPINA3s ?
- Comment rendre inactif ces serpins ou comment diminuer leur expression dans des cellules malignes ?
- La réduction de l'activité de ces serpins conduira-t-elle à une augmentation de la mortalité de ces cellules et donc à une réduction de la prolifération des cellules malignes et, par voie de conséquence, une réduction de la tumeur ?

## Conclusion générale

L'objectif de notre travail de thèse était d'identifier des marqueurs biologiques de la tendreté de la viande d'agneau. Pour cela, la stratégie d'étude a consisté à mesurer en cinétique plusieurs caractéristiques biologiques du muscle, connues pour avoir un rôle dans le processus d'attendrissage, et de déterminer quels processus biologiques étaient principalement responsables de la variabilité de l'attendrissage existant entre des animaux similaires et entre les muscles d'une même carcasse.

D'après les résultats obtenus, la mesure de la structure de la viande par pénétrométrie permet de discriminer les échantillons en fonction de l'âge des animaux, mais aussi, en fonction du type musculaire. Car il mesure à la fois la résistance du tissu conjonctif et des protéines myofibrillaires. Le pénétromètre peut être utilisé pour une estimation globale de la tendreté de la viande d'agneau et peut donc se substituer à la mesure sensorielle de la tendreté.

Cette étude préliminaire a permis de définir un certain nombre de points importants pour la mesure de la conductivité électrique. Nous avons montré l'influence de plusieurs autres facteurs sur cette mesure électrique et en particulier celle de la concentration en protéines, du volume de jus utilisé et également de la température.

Les caractéristiques du muscle, suivies au cours du stockage, évoluent de la même manière quelque soit l'animal et quelque soit le muscle. Ainsi le pH chute, à l'inverse de la quantité du jus extractible, de la conductivité électrique et de l'osmolarité. Tandis que la profondeur de pénétration chute les six premières heures phase de rigor mortis pour augmenter entre 8h et 24h *post mortem* phase d'attendrissage de la viande. Tous les paramètres restent stables après 24 *post mortem*.

Les résultats obtenus mettent en évidence que la cinétique d'évolution des différentes caractéristiques est très variable en fonction de l'animal, bien que les animaux aient été choisis les plus similaires possible. Si l'effet « animal » est hautement significatif, l'effet lié au type de muscle est très faible sur les différentes caractéristiques.

Nous nous garderons bien de tirer des conclusions trop hâtives sur les analyses discriminantes réalisées dans le cadre de ce travail. La principale raison est le nombre trop restreint des animaux utilisés dans cette expérience. La seconde est que la variabilité est, certainement, très restreinte et non représentative de la variabilité réelle que l'on peut observer dans un grand troupeau. Néanmoins, il est clair que l'approche statistique utilisée

permettrait une bonne sélection des meilleures variables à analyser et une bonne analyse de la variabilité du caractère qui nous intéresse en l'occurrence la dureté ultime des viandes. Il faudrait mettre en place une nouvelle expérimentation avec un lot d'animaux plus grand et une présélection des variables à mesurer plus effective. Cette présélection des variables peut prendre en compte les résultats de cette expérience que l'on qualifiera de préliminaire.

Les observations de la polyphasie de l'évolution du pH, ainsi que l'observation de la dégradation de l'actine les premières heures après abattage des animaux nous ont conduits à reconsidérer le concept actuel de la transformation du muscle en viande. Nous sommes donc en présence de nouvelles données qui nous permettent d'admettre une nouvelle hypothèse. Et si dès la mort de l'animal, les cellules musculaires vont s'engager dans la voie de la mort cellulaire par apoptose ?

Les résultats majeurs de notre travail est la caractérisation de la mise en évidence de l'apoptose dans le muscle juste après la mort de l'animal. Nous avons observé que :

- la cellule en apoptose s'isole des cellules voisines. Elle utilise toute une machinerie protéique préformée dans la cellule prête à l'emploi dès la perception du signal d'apoptose. Ce dernier est émis par une inversion de la polarité de la membrane au travers de la translocation des phospholipides situés sur la face interne de la membrane plasmique (phosphatidylserine) vers la face externe de cette membrane et une translocation inverse des phospholipides normalement situés sur la face externe (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine. Ce changement est probablement responsable de la chute discontinue du pH dans les 6-8 premières heures.

- dans le muscle quelque minutes après la saignée un rétrécissement de l'espace intracellulaire se produit, il est de 20 % du volume initiale de la cellule.

- le taux du cytochrome c augmente au cours du temps post mortem ce qui suggère que les mitochondries sont altérées pendant cette phase. Le cytochrome c, élément moteur de la mort cellulaire,

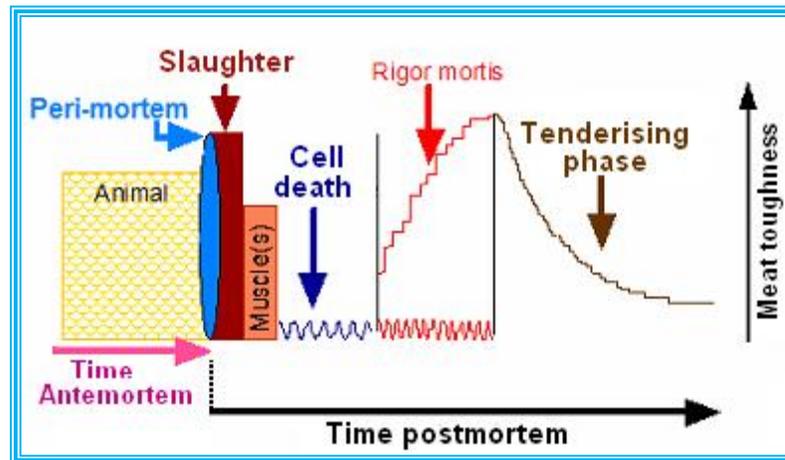
- au cours du suivie de la cinétique d'évolution de concentration de la caspase 3, nous avons observé une augmentation de l'intensité de la bande de la forme mature de la caspase 3. Cette augmentation est concomitante avec l'augmentation de la concentration du cytochrome c dans l'extrait mitochondrial. L'activation de la caspase 3 représente une étape clef dans

l'apoptose puisque cette étape est considérée comme le point de non retour du processus apoptotique. Suite à ces résultats il est donc envisageable de penser que la voie empruntée est la voie intrinsèque mitochondriale.

Ces résultats très préliminaires semblent confirmer la mise en place du processus apoptotique peu après la mort de l'animal. Toutefois, il est un peu tôt pour tirer des conclusions sur les mécanismes et les stimuli déclenchant le processus apoptotique même si l'anoxie et l'altération des mitochondries semblent être les deux premières voies à explorer.

La recherche de prédateurs biologiques de la tendreté et des autres qualités de la viande est une nécessité absolue pour valoriser au mieux les carcasses en les orientant, rapidement après l'abattage, vers une utilisation optimale sur la base de leurs qualités potentielles. C'est aussi une nécessité absolue pour pouvoir incorporer les qualités de la viande dans les programmes de sélection génétique. Dans le schéma traditionnel de transformation du muscle en viande (**Figure 78**), il serait donc nécessaire de rajouter une étape avant la phase de *rigor mortis* qui correspondrait à la phase de mise en place de la mort cellulaire et de l'apoptose avec toutes les conséquences qui lui sont associées et ses effets sur les phases de *rigor* et de maturation.

Concernant la dernière partie de notre travail, qui porte sur l'étude des cinétiques enzymatiques et, plus particulièrement, à la détermination des constantes d'association caractérisant la vitesse d'interaction des serpins avec leurs protéases cibles à savoir la caspase 8, caspase initiateur et la caspase 3, caspase exécuteur de l'apoptose. Ceci démontre l'expression dans les tissus et cellules de mammifères, de serpins capables d'inhiber fortement à la fois les caspases initiateur et les caspases exécuteurs. La seule serpine connue à ce jour pour ses capacités à inhiber les caspases est une serpine d'origine virale (virus responsable de la fièvre jaune) dénommée CrmA pour Cytokine Response Modifier A (Ray et al., 1992). Leur aptitude à inhiber de façon pseudo-irréversible les caspases va en faire des acteurs de tout premier plan pour bloquer le processus apoptotique et, par voie de conséquence, elles peuvent jouer un rôle important dans les processus de cancérisation qui ont en commun, l'immortalisation et la prolifération rapide des cellules malignes. Même si l'inhibition de toutes les caspases par les bovSERPINA3s ne soit pas encore démontrée, il est probable que, du fait de la redondance observée au sein de ce groupe de serpins, l'un ou l'autre des différents membres de cette famille auront la possibilité d'inactiver l'une ou l'autre des caspases.



**Figure 78.** Les différentes phases de transformation du muscle en viande à prendre en considération

## Perspectives

Notre travail de thèse soulève de nombreuses perspectives aussi bien sur le plan des approches méthodologiques, des résultats scientifiques que sur le plan des valorisations utiles pour la filière viande.

### *Aspects méthodologiques*

Ce travail de thèse a permis au laboratoire de l'I.N.A.T.A.A. d'acquérir une méthode de mesure de la texture de la viande par pénétrométrie. Cependant, nous ne pouvons préjuger de la validité de la mesure pour tous les muscles de la carcasse. Les relations trouvées demandent à être confortée par des essais sur un nombre d'animaux plus important et sur divers muscles consommés, préférentiellement, pour leur tendreté. D'autres facteurs de variabilité de la tendreté doivent être testés comme l'espèce, la race, le sexe. D'autre part la mise au point de la technique de mesure de la conductivité l'électrique dévoile une potentialité importante d'utilisation dans le domaine du contrôle de la qualité de la viande. Il reste à faire des recherches pour séparer l'effet des différents facteurs tel que pH, état des membranes, taux de gras, et état de maturation.

### *Aspects scientifiques*

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence de nouveaux marqueurs de qualité de la viande par la caractérisation de la mise en place de apoptose dans le muscle *post mortem*. Cependant, les effectifs d'animaux étaient limités. La poursuite immédiate de ce travail est donc de valider la pertinence de ces marqueurs d'apoptose dans d'autre type de muscles et d'autres espèces.

Concernant les serpines, la régulation du processus apoptotique serait la fonction la plus probable que nous pourrions envisager dans l'avenir. Dans ce cas, il sera indispensable de mieux comprendre leur genèse et leur fonction afin de tenter de clarifier leurs rôles :

Sur le plan de la mise en place des qualités de la viande, il nous faut maintenant préciser le rôle de ces inhibiteurs dans la régulation de la protéolyse *post mortem* et mieux comprendre le rôle des caspases dans cette protéolyse dont l'intensité, rappelons-le, est proportionnelle à la tendreté ultime de la viande.

Sur le plan des pathologies associées à un dysfonctionnement de l'apoptose, Les questions auxquelles nous devons répondre sont :

- Quelles sont, chez l'homme, les serpinines capables d'assurer la même fonction que les bovSERPINA3s ?
- Comment rendre inactif ces serpinines ou comment diminuer leur expression dans des cellules malignes ?

La réduction de l'activité de ces serpinines conduira-t-elle à une augmentation de la mortalité de ces cellules et donc à une réduction de la prolifération des cellules malignes ?

Enfin, l'expérience acquise va nous permettre de nous ouvrir à des productions animales particulières, spécifiques des régions de l'Afrique du Nord et destinées à la production de viandes. C'est le cas du dromadaire qui gagne en part de marché aussi bien au Maroc, en Tunisie qu'en Algérie. Notre expérience dans le domaine de la qualité des viandes nous permettra ainsi de venir en aide aux producteurs de dromadaires du sud de l'Algérie.

- A** **Abbot, M. T., Pearson, A. M., Price, J. F. & Hosper, G. R. (1977).** Ultrastructural changes during autolysis of red and white porcine muscle. *J. Food Sci.*, 42, 1185-1188.
- Adams, J. M. & Cory, S. (2002).** Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14(6), 715-720.
- Adams, V., Gielen, S., Hambrecht, R. & Schuler, G. (2001).** Apoptosis in skeletal muscle. *Front Biosci.*, 6, D1-D11.
- Adrian, C. & Martin, S. J. (2001).** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.*, 26, 390-397.
- Agarkova, I., Ehler, E., Lange, S., Schoenauer, R. & Perriard, J. C. (2003).** M-band: a safeguard for sarcomere stability?. *J. Mus. Res. Cell Mot.*, 24 (2-3), 191-203.
- Akaaboune, M., Hantai, D., Smirnova, I., Lachkar, S., Kapsimeli, M., Verdere-Sahque, M. & Festoff, B. W. (1998).** Developmental regulation of the serpin protease nexin I, localisation during activity dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *J. Comp. Neurol.*, 397, 572-579.
- Akaaboune, M., Verdere-Sahque, M., Lachkar, S., Festoff, B. W. & Hantai, D. (1995).** Serine proteinase inhibitors in human skeletal muscle: expression of beta-amyloid protein precursor and alpha 1-antichymotrypsin *in vivo* and during myogenesis *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, 165, 503-511.
- Alarcon-Rojo, A. D. & Dransfield, E. (1995).** Alteration of *post mortem* ageing in beef by the addition of enzyme inhibitors and activators. *Meat Sci.*, 41, 163-178.
- Alasnier, C., Remignon, C. H. & Gandemer, G. (1996).** Lipid characteristics associated with oxidative and glycolytic fibres in rabbit muscles. *Meat Sci.*, 43, 213-224.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvensen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. & Yuan, J. (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- Annand, R. R., Dahlen, J. R., Sprecher, C. A., de Dreu, P., Foster, D. C., Mankovich, J. A., Talanian, R. V., Kiesel, W. & Giegel, D. (1999).** Caspase-1 (interleukin-1beta-converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochem. J.*, 342, 655-665.
- Appel, W. (1986).** Chymotrypsin: molecular and catalytic properties. *Clin. Biochem.*, 19, 317-322.
- Arrigo, A. P. (2005).** In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation. *J. Cell. Biochem.*, 94, 241-246.
- Arrigo, A. P., Paul, C., Ducasse, C., Manero, F., Kretz-Remy, C., Viot, S., et al. (2002).** Small stress proteins : Novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 28, 185-204.
- Asada, K., Ishino, Y., Shimada, M., Shimojo, T., Endo, M., Kimizuka, F., Kato, I., Maki, M., Hatanaka, M. & Murachi, T. (1989).** cDNA cloning of human calpastatin: sequence homology among human, pig and rabbit calpastatins. *J. Enzyme Inhib.*, 3, 49-56.
- Ashgar, A. & Bhatti, A. R. (1987).** Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: their significance in muscle physiology and during *post mortem* ageing events in carcasses. *Adv. Food Resch.*, 31, 343-451.
- Ashmore, C. R. & Doerr, L. (1971).** Comparative aspects of muscle after types in different species. *Exp. Neurology*, 31, 408-418.
- Auerbach, P., Bantle, S., Keller, S., Hinderling, V., Leu, M., Ehler, E. & Perriard, J. C. (1999).** Different domains of the M-band protein myomesin are involved in myosin binding and M-band targeting. *Mol. Biol. of the Cell*, 10, 1297-1308.
- Averna, M., De Tullio, R., Passalacqua, M., Salamino, F., Pontremoli, S. & Melloni, E. (2001).** Changes in intracellular calpastatin localization are mediated by reversible phosphorylation. *Biochem. J.*, 354, 25-30.
- Avery, N. C., Sims, T. J., Warkup, C. & Bailey, A. J. (1996).** Collagen cross-linking in porcine *Longissimus lumborum*: Absence of a relationship with variation in texture at pork weight. *Meat Sci.*, 42, 355-369.

## B

- Azuma, T., Pals, G., Mohandas, T. K., Couvreur, J. M. & Taggar, R. T. (1989).** Human gastric cathepsin E. Predicted sequence, localization in the chromosome 1 and sequence homology with other aspartic proteinase. *J. Biol. Chem.*, 264 (28), 16748-16753.
- Baba, T., Watanabe, K., Kashiwabara, S & Arai, Y. (1989).** Primary structure of human proacrosin from its cDNA sequence. *FEBS. Lett.*, 27, 296-300.
- Bailey, A. J. & Light, N. D. (1989).** *Connective tissue in meat and meat products*. New York: Elsevier applied Science.
- Bailey, A. J. (1972).** The basis of meat texture. *J. Sci. Food Agri.*, 23, 995-1007.
- Bailey, A. J. (1988).** Connective tissue and meat tenderness. Proc. 34<sup>th</sup> ICoMST, Brisbane, 8, 152-160.
- Bailey, K. (1948).** Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem. J.*, 43, 271-279.
- Balcerzak, D., Querengesser, L., Dixon, W. T. & Baracos, V. E. (2001).** Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscles. *J. Anim. Sci.*, 79, 94-107.
- Ball, E. H., Jain, N. & Sanwal, B. D. (1997).** Colligin a collagen binding serpin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 425, 239-245.
- Barnier, V. M. H. (1995).** *Determinants and predictors of beef tenderness*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.
- Barrett, A. J. (1977).** Nomenclature and classification. In *Proteinases in mammalian cells and tissues*. Pp. 10-34. Edited by A. J. Barret. North-Holland: Publishing Company.
- Barrett, A. J. (1980a).** Fluorimetric assay for cathepsin B and cathepsin H. *Biochem. J.*, 187, 909-912.
- Barrett, A. J. (1980b).** Mammalian proteases. A glossary and bibliography. In *Protein breakdown in health and disease*. Edited by D. Evered & J. Whelan.
- Barrett, A. J. (1986).** The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.*, 12, 193-196.
- Barrett, A. J. (1987).** The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed. Biochim. Acta.*, 45, 1363-1374.
- Barrett, A. J. (1994).** Classification of peptidases. *Methods Enzymol.*, 244, 1-15.
- Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M. & Hamade, K. (1982).** L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido (4 guanidino)-butane (E64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.*, 201, 189-198.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. (1998).** *Handbook of proteolytic enzymes*. London: Academic Press.
- Beauchamp, N. J., Pike, R. N., Daly, M., Butler, L., Makris, M., Dafforn, T. R., Zhou, A., Fitton, H. L., Preston, F. E., Peake, I. R. & Carrell, R. W. (1998).** Antithrombins Wibble and Wobble (T85M/K): Archetypal Conformational Diseases With In Vivo Latent-Transition, Thrombosis, and Heparin Activation. *Blood*, 92, 2696-2706.
- Beatty, K., Bieth, J. & Travis, J. (1980).** Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized  $\alpha$ -proteinase inhibitor and  $\alpha$ -1-antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, 255, 3931-3934.
- Bechtel, P. (1979).** Identification of a high molecular weight actin-binding protein in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 254, 1755-1758.
- Becila S. (2002)** Etude de l'influence des paramètres physico-chimique sur la maturation de la viande d'agneau . Thèse de magister, Université Mentouri de Constantine 2002
- Beecher, G. R., Cassens, R. G., Hoekstra, W. G. & Briskey, E. J. (1965).** Red and white fibre content and associated *post mortem* properties of seven porcine muscles. *J. Food Sci.*, 30, 969-976.

- Beecher, G. R., Kastenschmidt L. L., Hoekstra, W. G., Cassens, R. G. & Briskey, E. J. (1969).** Energy metabolites in red and white strained muscles of the pig. *Agr. Food Chem.*, 17, 29-33.
- Beere, H. M. (2001).** Stressed to death: Regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Science's STKE*, 93, RE1.
- Beere, H. M. (2004).** The stress of dying: The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.*, 117, 2641-2651.
- Beere, H. M. (2005).** Death versus survival: Functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.*, 115, 2633-2639.
- Belizario, J. E., Lorite, M. J. & Tisdale, M. J. (2001).** Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrats by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. *British J. Cancer*, 84, 1135-1140.
- Bendall, J. R. & Swatland, H. J. (1988).** A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Sci.*, 24, 85-126.
- Bendall, J. R. (1973).** *Post mortem* in muscle. In *The structure and function of Muscle*. Vol. 2, Part. 2, pp. 243-309. Edited by G. H. Bourne. London: Academic Press.
- Bennett, H. T. (1960).** The structure of striated muscle as seen by the electron microscope. In *The structure and Function of Muscle*: Vol. 1, pp. 137-181. Edited by G. H. Bourne. New York : Academic Press Inc.
- Berkaloff, A., Bourguet, J., Favard, P., Lacroix, J. (1977).** *Biologie et physiologie cellulaires*. 9<sup>ème</sup> Ed. Paris : Hermann Collection Méthodes. 344 pp.
- Bieth, J. G. (1974).** Some kinetics consequences of the tight binding of protein-proteinase-inhibitors to proteolytic enzymes and their application to the determination of dissociation constants. In *Proteinase inhibitors*. Pp. 463-469. Edited by H. Fritz, H. Tscesche, L. J. Greene & E. Truscheit. Germany: Bayer-Simposium V.
- Bieth, J. G. (1980).** Pathophysiological interpretation of kinetic constants of protease inhibitors. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, 16(suppl), 183-195.
- Bieth, J. G. (1984). *In vivo* significance of kinetic constants of protein proteinase inhibitors. *Biom. Med.*, 32, 387-397.
- Bige, L., Ouali, A. & Valin, C. (1985).** Purification and characterization of a low molecular weight cysteine proteinase inhibitor from bovine muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 843, 269-275.
- Biral, D., Jakubiec-Puka, A., Ciechomska, I., Sandri, M., Rossini, K., Carraro, U. & Betto, R. (2000).** Loss of dystrophin and some dystrophin-associated proteins with concomitans signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension. *Acta. Neuropathol.*, 100, 618-626.
- Bird, J. W. C. & Carter, J. (1980).** Proteolytic enzymes in striated and non striated muscle. In *Degradation processes in hearth and skeletal muscles*. Pp. 51-83. Edited by K. Wildenthal. Amsterdam: Elsevier North-Holland.
- Birkedal-Hansen, H, Moore, W. G. I., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., Decarlo, A. & Engler, J. A. (1993).** Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 4, 197-250.
- Bode, W. & Huber, R. (1992).** Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 204, 433-451.
- Bode, W., Meyer, E. & Powers, J. C. (1989).** Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate secificity and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry*, 28, 1951-1963.
- Bodwell, C. E. (1971).** Tropomyosin B. In *Contractil Proteins and Muscle*: pp. 155-178. Edited by K. Laki. New York: Marcel Pekker, Inc.
- Bodwell, C. E., Pearson, A. M. & Spooner, M. C. (1965).** *Post mortem* changes in muscle. I. Chemical changes in beef. *J. Food Sci.*, 30, 766-772.

- Boehm, M., Kendall, T. L., Thompson, V. F. & Goll, D. E. (1998).** Changes in the calpains and calpastatin during *post mortem* storage of bovine muscle. *J. Anim. Sci.*, 76, 2415-2434.
- Bonnet, M., Ouali, A. & Koop, J. (1992).** Beef muscle osmotic pressure as assessed by differential scanning calorimetry (DSC). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 27, 349-408.
- Bottinelli, R & Reggiani, C. (2000).** Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Biophys. & Mol. Biol.*, 73, 195-262.
- Boudjellal A., Becila S., Coulis G. Hernan Herrera-Mendez C., Aubry L., Lepetit J., Harhoura K., Angel Sentandreu M. and Ouali A. (2007).** Polyphasic character of postmortem pH drop in bovine and ovine muscles: consequences on meat texture and possible causes. *African Journal of Agricultural Research Vol. 3 (3)*, pp. 195-204.
- Boujellal (2007).** "A la recherche de marqueurs biologiques de la qualité des viandes- caractérisation de la maturation et enquête auprès des professionnels- " thèse d'état. Université Mentouri de Constantine.
- Bouton, P. E., Harris, P. V., Macfarlane, J. J., & Shorthose, W. R. (1982).** Influence of pH on the Warner-Bratzler shear properties of mutton. *Meat Sci.*, 6, 27-36.
- Bouton, P. E., Carroll, F. D., Harris, P. V. & Shorthose, N. R. (1973).** Influence of pH and fibre contraction state upon factors affecting the tenderness of bovine muscle. *J. Food Sci.*, 38, 404-407.
- Bozzo, C., Stevens, L., Toniolo, L., Mounier, Y. & Reggiani, C. (2003).** Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *Am. J. Physiol.*, 285, C575-C583.
- Bradford, M. (1976).** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 250, 249-256.
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A. & Henson, P. M. (1997).** Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cell requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of aminophospholipid translocated. *J. Biol. Chem.*, 272, 26159-26165.
- Brenner, C. & Kroemer, G. (2000).** Apoptosis. Mitochondria-the death signal integrators. *Science*, 289(5482), 1150-1151.
- Brooke, M. H. & Kaiser, K. (1970).** Muscle types fibres: How many and what kind?. *Arch. Neurol.*, 23, 369-379.
- Brown, W. D. & Dolev, A. (1963).** Effect of freezing on autoxidation of oxymyoglobin solution. *J. Food Sci.*, 27, 211-213.
- Bruce, D., Perry, D. J., Borg, J. Y., Carrell, R. W. & Wardell, M. R. (1994).** Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (187 Asn-Asp). *J. Clin. Invest.*, 94, 2265-2274.
- Buchter, L. & Zeuthen, P. (1971).** The effect of ageing on the organoleptic qualities of PSE and normal pork loins. In *Condition and meat quality of pigs for slaughter*. Pp. 247-254. Edited by P. Wageningen.
- Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L. & Eigenbrodt, E. T. (1993).** Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 117, 1208-1214.
- Burke, R. F., Levine, D. N., Tsairis, P. & Zajac, F. F. (1973).** Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat *gastrocnemius*. *J. Physiol. Lond.*, 234, 723-748.
- Busby, T. F., Atha, D. H. & Ingham, K. C. (1981).** Thermal denaturation of antithrombin III. Stabilization by heparin and lyotropic anions. *J. Biol. Chem.*, 256, 12140-12147.
- Busconi, L., Folco, E. J. E., Martone, C. B., Trucco, R. E. & Sanchez, J. J. (1984).** Identification of two alkaline protease and a trypsin inhibitor from muscle of white croaker (*micropogon opercularis*). *Febs.*, 176, 211-214.
- Bush, W. A., Stromer, M. H., Goll, D. E. & Suzuki, A. (1972).** Ca<sup>+2</sup>- specific removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 52 (2), 367-381.

C

- Businaro, R., Nori, S. L., Toesca, A., De Renzis, G., Ortolani, F., De Santis, E & Fumagalli, L. (1995).** Immunohistochemical detection of three serum protease inhibitors in mouse skeletal muscle by confocal laser scanning microscopy. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 100 Suppl 1:123-130.
- Cannon, J., Morgan, J. B., Heavner, J., Mckeith, F. K., Smith, G. C. & Meeker, D. L. (1995).** Pork quality audit: A review of the factors influencing pork quality. *J. Muscle Foods*, 6, 369-402.
- Carlson, L. & Thornell, E. (2001).** Desmin related myopathies in mice and man. *Acta Physiol.*, 171, 341-348.
- Carrell, R. & Owen, M. (1985).** Plakalbumin, alpha I-antitrypsin, antithrombin and mechanism of inflammatory thrombosis. *Nature*, 317, 730-732.
- Carrell, R. & Travis, J. (1985).**  $\alpha$ -1-antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.*, 10, 20-24.
- Carrell, R. W., Evans, D. L. & Stein, P. E. (1991).** Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis. *Nature*, 353, 576-578.
- Carrell, R. W., Lomas, D., Stein, P. & Whisstock, J. (1997).** Dysfunctional variants and the structural biology of the serpins. In *Chemistry and Biology of Serpins*. Pp. 207-222. Edited by F. C. Church, D. D. Cunningham, D. Ginsburg, M. Hoffman, S. R. Stone & M. Hoffman. New York:Plenum Press.
- Carrell, R. W., Stem, P. E., Fermi, G. & Wardell, M. R. (1994).** Biological implication of a 3 Å structure of dimeric antithrombin. *Structure*, 2, 257-270.
- Cassens, R. G. & Cooper, C. C. (1971).** Red and white muscle. *Adv. Food research*, 19, 1-74.
- Cassens, R. G., Briskerg, E. J. & Hoekstra, W. G. (1963).** Electron microscopy of *post mortem* changes in porcine muscle. *J. Food Sci.*, 28, 680-684.
- Cerreti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A., Huebner, K. & Black, R. A. (1992).** Molecular cloning of the interleukin-1-Beta-converting enzyme. *Science*, 256, 97-100.
- Chan, S. T., Segundo, B., McCormick, M. B. & Steinec, D. F. (1986).** Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 (20), 7721-7725.
- Chase, T. & Shaw, E. (1967).** P-nitrophenyl-p<sup>3</sup>-guanidino benzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 29, 508-514.
- Chase, T. & Shaw, E. (1969).** Comparison of the esterase activities of trypsin, plasmin and thrombin on guanidinobenzoate esters. Titration of the enzymes. *Biochemistry*, 8, 2212-2224.
- Chase, T. & Shaw, E. (1970).** Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenyl-p<sup>3</sup>-guanidinobenzoate HCl. *Methods Enzymol.*, 19, 20-27.
- Chen, M. G., Shin, C. L. & Wang, K. (1993).** Nebulin as an actin zipper. *J. Biol. Chem.*, 268, 20327-20334.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., et al. (2001).** Bcl-2, Bcl-x (L) sequester BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell*, 8(3), 705-711.
- Chow, M. K., Lomas, D. A. & Bottomley, S. P. (2004).** Promiscuous  $\beta$ -strand interactions and the conformational diseases. *Curr. Med. Chem.*, 11, 491-499.
- Christensen, S. & Sottrup, J. (1994).** Characterization of two serpins from bovine plasma and milk. *Biochem. J.*, 303, 383-390.
- Chrystall, B. B. & Devine, C. E. (1985).** Electrical stimulation: its early development in New Zealand. *Adv. Meat Res.*, 1, 73-119.

**Chuang, Y. J., Swanson, R., Raja, S. M. & Olson S. T. (2001).** Heparin enhances the specificity of antithrombin for thrombin and factor Xa independent of the reactive center loop sequence. Evidence for an exosite determinant of factor Xa specificity in heparin-activated antithrombin. *J Biol Chem.*, 276, 14961-14971.

**Clarke, P. G. H. & Clarke, S. (1995).** Historic apoptosis. *Nature*, 378, 230.

**Cong, M., Thompson, V. F., Goll, D. E. & Antin, P. B. (1998).** The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 273, 660-666.

**Cook, C. F. & Wright, R. G. (1966).** Alterations in the contracture band patterns of unfrozen and *pre rigor* frozen ovine muscle due to variations in *post mortem* incubation temperatures. *J. Food Sci.*, 31, 801-806.

**Cory, S. & Adams, J. M. (2002).** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2 (9), 647-656.

**Coughlin, P., Sun, J., Cerruti, L., Selem, H. H. & Bird, P. (1993).** Cloning and molecular characterization of a human intracellular serine proteinase inhibitor. *Proc. Natl. Sci.*, 90, 9417-9421.

**Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. (1996).** Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 801-847.

**Crawford, C., Brown, N. R. & Willis, A. C. (1993).** Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin. *Biochem. J.*, 296, 135-142.

**Currie, R. W. & Wolfe, F. H. (1980).** *Rigor* related changes in mechanical properties (tensile and adhesive) and extracellular space in beef muscle. *Meat Sci.*, 4, 123-143.

**D**

**Dahlman, B., Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S. & Kluetzel, P. M. (2000).** Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J. Mol. Biol.*, 303, 643-653.

**Dahlman, B., Ruppert, T., Kluetzel, P. M. & Kuehn, L. (2001).** Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie*, 83, 295-299.

**Davey, C. L. & Gilbert, K. V. (1966).** Studies in meat tenderness. II. Proteolysis and the ageing of beef. *J. Food Sci.*, 31, 135-140.

**Davey, C. L. & Winger, R. J. (1979).** The structure of skeletal muscle and meat toughness. In *Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects*. Pp. 97-132. Edited by D. A. Oparry & L. K. Creamer. London: Academic Press.

**Davie, E. W., Fujikawa, K & Kisiel, W. (1991).** The coagulation cascade: initiation, maintenance and degradation. *Biochemistry*, 20, 10363-10370.

**Davis, R. L., Shrimpton, A. E., Holohan, P. D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G. H., et al. (1999).** Familial dementia caused by polymerisation of mutant neuroserpin. *Nature*, 401, 376-379.

**Dayton, W. R., Goll, D. E., Zeece, M. G., Robson, R. M. & Reville, W. J. (1976).** A Ca<sup>+2</sup> activated protease possible involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*, 15, 2150-2158.

**De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F. (1955).** Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, 60, 604-617.

**Delgado, E. F., Geesink, G. H., Marchello, J. A., Goll, D. E. & Koohmaraie, M. (2001).** The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *J. Anim. Sci.*, 79, 398-412.

**Demeyer, D. I., Casteels, M. & Clinquart, A. (1999).** La qualité de la viande : du muscle à viande. In : *La viande ?*. Pp. 75-96. Edited par A. Clinquart, J. Fabry & M. Casteels. Liège, France : BAMST asbl.

**DeTullio, R., Sparatore, B., Salamino, F., Melloni, E. & Pontremoli, S. (1998).** Rat brain contains multiple mRNAs for calpastatin. *FEBS Lett.*, 422, 113-117.

- Devlin, G. L., Chow, M. K. M., Howlett, G. J. & Bottomley, S. P. (2002).** Acid denaturation of alpha-antitrypsin: characterisation of a novel mechanism of serpin polymerization. *J. Mol. Biol.*, 324, 859-870.
- Dirks, A. J. & Leeuwenburgh, C. (2005).** The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Med.*, 35, 473-483.
- Doumit, M. E., Lonergan, S. M., Arbona, J. R., Killefer, J. & Koochmaraie, M. (1996).** Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of skeletal muscle calpastatin. *J. Anim. Sci.*, 74, 2679-2686.
- Doyle, M. F. & Haley, P. E. (1993).** Mezzothrombin: active intermediate formed during prothrombin signal lysed activation of prothrombin. *Methods Enzymol.*, 222, 299-312.
- Dransfield, E. (1992a).** Modelling *post mortem* tenderisation. III: Role of calpain I in conditioning. *Meat Sci.*, 31, 85-94.
- Dransfield, E. (1992b).** Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. Proc. 38<sup>th</sup> ICoMST, Clermont-Ferrand, 1, 71-78.
- Dransfield, E. (1993).** Modelling *post mortem* tenderisation IV: role of calpains and calpastatin in conditioning. *Meat Sci.*, 34, 217-234.
- Dransfield, E. (1994).** Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Sci.*, 36, 105-121.
- Dransfield, E., Jones, R. C. & Macfie, H. J. H. (1980-1981).** Quantifying changes in tenderness during storage of beef. *Meat Sci.*, 5, 131-137.
- Dutaud, D. (1998).** Quantification et caractérisation de protéasome 20S de muscle de bovin en relation avec l'attendrissage de la viande bovine. PhD Thesis, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.
- Dutaud, D., Taylor, R. G., Picard, B. & Ouali, A. (1996).** Le protéasome: une nouvelle protéase impliquée dans la maturation de la viande. *Viandes et Prod. Carnés*, 17, 333-335.
- Dutson, T. R. & Lawrie, R. A. (1974).** Release of lysosomal enzymes during *post mortem* conditioning and their relationship to tenderness. *J. Food Technol.*, 9, 43-50.
- Dutson, T. R., Pearson, A. M. & Merkel, R. A. (1974).** Ultrastructural *post mortem* changes in normal and low quality porcine muscle fibers. *J. Food Sci.*, 39, 32-37.
- E** **Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. (1999).** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and fonctions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 383-424.
- Ebashi, S., Ebashi, F. & Maryama, K. (1964).** A new protein factor promoting contraction of actomyosin. *Nature*, 203, 645-646.
- Edmunds, T., Nagainis, P. A., Sathe, S. K., Thompson, V. F. & Goll, D. E. (1991).** Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of  $\mu$ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1077 (2), 197-208.
- Eldering, E., Verpy, E., Roem, D., Meo, T. & Tosi, M. (1995).** COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J. Biol. Chem.*, 270, 2579-2587.
- Eliers, J. D., Tatum, J. D., Morgan, J. B. & Smith, G. C. (1996).** Modification of early *post mortem* muscle pH and use of *post mortem* ageing to improve beef tenderness. *J. Anim. Sci.*, 74, 790-798.
- Ellis, R. E., Yuan, J. Y., Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, 663-698.
- Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Imahori, K. & Suzuki, K. (1987).** Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 3590-3594.
- Engel, W. K. (1962).** The essentialy of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in investigation of neuromuscular disease. *Neurology*, 12, 778-784.

**Eppenberger, H. M., Perriard, J. C., Rosenberg, U. R. & Strehler, E. E. (1981).** The M<sub>r</sub> 165,000 M-Protein myomesin: A specific protein of cross-striated muscle cells. *J. Cell Biol.*, 89, 185-193.

**Ervasti, J. M. & Campbell, K. P. (1991).** Membrane organisation of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66, 1121-1131.

**Essen-Gustavsson, B. & Fjelkner-Mudig, S. (1985).** Skeletal muscle characteristics indifferent breeds of pigs in relation to sensory properties. *Meat Sci.*, 13, 33-47.

**Essen-Gustavsson, B., Karlström, K. & Londström, K. & Enfält, A. (1994).** Intramuscular fat and muscle fibre lipid contents in halothane-gene-free pigs fed high or low protein diets and its relation to meat quality. *Meat Sci.*, 38, 269-277.

**Essen-Gustavsson, B., Karlström, K. & Londström, K. (1992).** Muscle fibre characteristics and metabolic response at slaughter in pigs of different halothane genotypes and their relation to meat quality. *Meat Sci.*, 31, 1-11.

**Ethinger, J. D., Zak, R. & Fischman, D. A. (1976).** Compositional studies of myofibrils from rabbit striated muscles. *J. Cell Biol.*, 68, 123-141.

**F** **Faber, J. P., Poller, W., Olek, K., Baumann, U., Carlson, J., Lindmark, B. & Eriksson, S. (1993).** The molecular basis of alpha 1-antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease. *J. Hepatol.*, 18, 313-321.

**Faller, B. & Bieth, J. (1991).** Kinetics of interaction of chymotrypsin with eglin c. *Biochem. J.*, 280, 27-32.

**Fernandez, X. & Tornberg, E. (1991).** A review of the causes of variation in muscle glycogen content and ultimate pH in pigs. *J. of Mus. Foods*, 2, 209-235.

**Festoff, B. W., Rao, J. S. & Hantai, D. (1991).** Plasminogen activators and inhibitors in the neurovascular system: III. The serpin protease nexin 1 is synthesized by muscle and localized at neuromuscular synapses. *J. Cell Physiol.*, 147, 76-86.

**Fibbi, G., Barletta, E., Dini, G., Del Rosso, A., Pucci, M., Cerletti, M. & Del Rosso, M. (2001).** Cell invasion is affected by differential expression of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system in muscle satellite cells from normal and dystrophic patients. *Lab. Invest.*, 81, 27-39.

**Fidzianska, A., Kaminska, A. & Glinka, Z. (1991).** Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. *Neuropatol. Polska*, 29, 19-28.

**Fischer, U., Janicke, R. U., Schulze-Osthoff, K. (2003).** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.*, 6 (11), 1028-1042.

**Flower, T. R., Chesnokova, L. S., Froelich, C. A., Dixon, C. & Witt, S. N. (2005).** Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *Mol. Biol.*, 35(15), 1081-1100.

**Follet, M. J., Norman, G. A. & Ratcliff, P. W. (1974).** The *antirigor* excision and air cooling of beef *semimembranosus* muscles at temperatures between -5°C and +15°C. *J. Food Technol.*, 9, 509-523.

**Forrest, J. C. (1979).** *Fundamentos de Ciencia de la Carne*. 1<sup>st</sup> Edn. Zaragoza : Acribia, 364 pp.

**Franke, W., Schmid, E., Osborn, M. & Weber, K. (1978).** Different intermediate sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 5034-5038.

**Fraser, A. & Evan, G. A. (1996).** A license to kill. *Cell*, 85, 781-784.

**Fraser, R. D. B., MacRae, T. P. & Suzuki, E. (1979).** Molecular and fibrillar structure of collagen. In *Fibrous proteins: Scientific, industrial and medical aspects*. Pp. 179-206. Edited by D. A. D. Parry & L. K. Creamer. London: Academic Press Inc.

**Froelich, C. J., Zhang, X., Huding, D., Wintler, U. & Fianna, W. L. (1993).** Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycans in matrix synthesized by chondrocytes. *J. Immunol.*, 151, 7161-7171.

G

- Fuentes-Prior, P. & Salvesen, G. S. (2004).** The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem. J.*, 384, 201-232.
- Gaboriaud, C., Serre, L., Guy-Crotte, O., Forest, E. & Fontecillacamps, J. C. (1996).** Crystal structure of human trypsin 1 : un expected phosphorylation of Tyr 151. *J. Mol. Biol.*, 259, 995-1010.
- Gadek, J. E. (1992).** Adverse effects of neutrophils on the lung. *Am. J. Med.*, 92, 27-31.
- Gadek, J. E., Fells, G. A., Wright, D. G. & Crystal, R. G. (1980).** Human neutrophil elastase functions as a type collagen collagenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1815-1822.
- Gaillard, O. (2002).** Les troponines. *Immuno-anal. & Biol. spécial.*, 17, 297-301.
- Gann, G. L. & Merkel, R. A. (1978).** Ultrastructural changes in bovine *Longissimus* muscle during *post mortem* ageing. *Meat Sci.*, 2, 129-144.
- Garnett, R. A. F., O'Donovan, M. J., Stephens, J. A. & Taylor, A. (1978).** Motor unit organisation of human *gastrocnemius*. *J. Physiol.*, 287, 33-43.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S. A. (1992).** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119, 493-501.
- Geesink, G. H., Nonneman, D. & Koohmaraie, M. (1998).** An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356, 19-24.
- Geiger, B. (1979).** A 130 K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*, 18, 193-205.
- Gettins, P. G. W. (2002).** Serpin structure, mechanism and function. *Chem. Rev.*, 102, 4751-4803.
- Gettins, P. G. W., Patston, P. A. & Olson, S. T. (1996).** *Serpins: Structure, Function and Biology*. RG Landes Company, Austin.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D.A., Imai, B. S. & Mische, S. M. (1999).** Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, 20, 601-605.
- Glanville, R. W. & Kuhn, K. (1979).** The primary structure of collagen. In *Fibrous proteins: Scientific, industrial and medical aspects*. Pp. 133-150. Edited by D. A. D. Parry & L. K. Creamer. London: Academic Press Inc.
- Goldberg, A. L. (1992).** The mechanism and functions of ATP-dependant proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.*, 203 (1-2), 9-23.
- Goldberger, G., Bruns, G. A., Rits, M., Edge, M. D. & Kwiatkowski, D. I. (1987).** Human complement factor 1: analysis of cDNA primary structure and assignment of its gene to chromosome 4. *J. Biol. Chem.*, 262, 10065-10071.
- Goll, D. E., Dayton, W. R., Singh, I. & Robson, R. M. (1991).** Studies of the  $\alpha$ -actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J. Biol. Chem.*, 266 (13), 8501-8510.
- Goll, D. E., Klesse, W. C. & Szpacenko, A. (1989).** Skeletal muscle proteases and protein turnover. In *Animal growth regulation*. Pp. 141-182. Edited by D. R. Hausman & R. J. Martin. New York: Plenum Publishing Corporation.
- Goll, D. E., Klesse, W. C., Okitani, A., Kumamoto, T., Cong, J. & Kapprel, H. P. (1990).** Structural and regulatory properties of the calpains and calpastatins. In *Intracellular calcium-dependent proteolysis*. Pp. 3-24. Edited by R. L. Mellgren & T. Murachi. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G. & Zalewska, T. (1992).** Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays*, 14, 549-556.

- Got, F. (1997).** Accélération des processus de maturation de la viande bovine par traitements technologiques: injection de calcium; applications d'ultrasons de puissance. PhD Thesis. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand, France.
- Gothard, R. H., Mulins, A. M., Boulware, R. F. & Mansard, S. L. (1966).** Histological studies of *post mortem* changes in sarcomere length as related to bovine muscle tenderness. *J. Food Sci.*, 31, 825-828.
- Granger, B. L. & Lazarides, E. (1980).** Synemin: a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle. *Cell*, 22, 727-738.
- Greaser, M. L. & Fritz, J. D. (1995).** *Post mortem* changes in myofibrillar proteins in relation to meat texture. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*. Pp. 293-309. Edited by A. Ouali, D. I. Demeyer & F. J. M. Smulders. Utrecht, Pays-Bas: ECCEAMST.
- Green, D. R. & Kroemer, G. (2004).** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629.
- Gregorio, C., Granzier, H. & Sorimachi, H. (1999).** Muscle assembly: a titanic achievement?. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11, 18-25.
- Gregorio, C., Trombitas, K., Centner, T., Kolmener, B., Stier, G., Konke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Hermann, B., Granzier, H., Sorimachi, H. & Labent, S. (1998).** The NH<sub>2</sub> terminus of titin spans the Z-disk: its interaction with a novel 19-kDa ligand (T-Cap) is required for sarcomeric integrity. *J. Cell Biol.*, 143, 1013-1027.
- Guignot, F. (1992).** Acidification *post mortem* dans le muscle de veau. Conséquences sur la structure et les qualités organoleptiques de la viande. PhD Thèse de la Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Guignot, F., Touraille, C., Renerre, M & Monin, G. (1992).** Relationships between ultimate pH and meat quality in veau. Pp. 367-370. Proc. 38<sup>th</sup> ICoMST, Clermont-Ferrand, France.
- Gura, T. (1997).** How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science*, 277, 768.
- Guroff, G. (1964).** A neutral calcium-activated proteinase from soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.*, 239, 149-155.
- Gustafsson, A. B. & Gottlieb, R. A. (2003).** Mechanisms of apoptosis in the heart. *J. Clin. Immunol.*, 23, 447-459.
- Guttmann, R. P. & Jhonson, G. V. (1998).** Oxidative stress inhibits calpain activity *in situ*. *J. Biol. Chem.*, 273 (21), 13331- 13338.
- Guttmann, R. P., Elce, J. S., Bell, P. D., Isbell, J. C. & Jhonson, G. V. W. (1997).** Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis. *J. Biol. Chem.*, 272 (3), 2005-2012.
- H** **Halliwell, B. (1991).** Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American J. Med.*, 91, 14s-22s.
- Haltiwanger, T. & Lowe, P. (2004).** Role of glycosylation in development. *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 491-537.
- Hamm, R. & Van Hoof, J. (1974).** Einfluss von natriumchlorid auf abbau und kolloid chemische wirkung von zugesetztem adenosintriphosphat in zerkleinertem rindermuskel *post rigor*. *Z. Lebensm.-Unters-Forsch*, 56, 87-99.
- Hamm, R. (1982).** *Post mortem* changes in muscle with regard to processing of hot boned beef. *Food Technol.*, 13, 105-115.
- Hara, K. & Ishihara, T. (1986).** Purification and characterization of serine proteinase inhibitor from carp ordinary muscle. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1226-1228.
- Harkness, R. D. (1979).** Mechanical properties of connective tissues in relation to function. In *Fibrous proteins: Scientific, industrial and medical aspects*. Pp. 207-230. Edited by D. A. D. Parry & L. K. Creamer. London: Academic Press.

- Harper (2000).** *Biochimie*. 25<sup>ème</sup> Edn. Bruxelles: De Boeck.
- Harper, P. L. & Carrell, R. W. (1994).** The serpins. In *Haemostasis and thrombosis*. Pp. 641-648. Edited by D. P. Thomas; E. G. D. Tuddenham. New York: Churchill Livingstone.
- Hartley, B. S. (1960).** Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 29, 45-72.
- Hayashi, Y. (1973).** The structure of the myosin molecule. In *Muscle proteins, muscle contraction and cation transport*. Pp. 27-68. Edited by Y. Tonomura. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Heffron, J. J. & Hegarty, P. V. J. (1974). Evidence for a relationship between ATP hydrolysis and changes in extracellular space and fiber diameter during *rigor* development in skeletal muscle. *Comp. Bioch. Physiol.*, 49, 43-56.
- Hekman, C. M. & Loskutoff, D. J. (1985). Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators than can be activated by denaturants. *J. Biol. Chem.*, 260, 11581-11587.
- Helenius, A. & Markus, A. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291, 2364-2369.
- Henckel, P., Oksbjerg, N., Erlandsen, E., Barton-Gade, P. & Bejerholm, C. (1997). Histo- and biochemical characteristics of the *Longissimus dorsi* muscle in pigs and their relationships to performance and meat quality. *Meat Sci.*, 47, 311-321.
- Henderson, D. W., Goll, D. E. & Strumer, M. H. (1970). A comparison of shortening and Z lines degradation in *post mortem* bovine, porcine and rabbit muscle. *Am. J. Anat.*, 128, 117-136.
- Henderson, P. F. F. (1972). A linear equation that describes the steady kinetics of enzyme and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem. J.*, 127, 321-333.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407 (6805), 770-776 (review).
- Henkart, P. A. & Grinstein, S. (1996). Apoptosis: mitochondria resurrected?. *J. Exp. Med.*, 183, 1293-1295.
- Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Boudjellal, A. & Ouali, A. (2006). Meat ageing : Reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 394-405.
- Hertzman, C., Olsson, U. & Tornberg, E. (1993). The influence of the high temperature, type of muscle and electrical stimulation on the course of *rigor*, ageing and tenderness of beef muscles. *Meat Sci.*, 35, 119-141.
- Hidalgo, C., Craig, R., Ikebe, M. & Padron, R. (2001). Mechanisms of phosphorylation of the regulatory light chain of myosin from tarantula striated muscle. *J. Mus. Res. Cell Mot.*, 22, 51-59.
- Hijikata, T., Fujimaki, N., Osawa, H. & Ishikawa, H. (1998). The direct visualization of structural array from laminin of dystrophin in sarcolemmal vesicles prepared from rat skeletal muscles. *Biol. Cell*, 90, 629-639.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. & Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15, 1573-1581.
- Holmes, W. E., Linen, H. R., Nelles, L., Kloft, C., Nieuwenhuis, H. K., Ruken, D. C. & Collen, D. (1987). Alpha2-antiplasmin enschede: alanine insertion and abolition of plasmin inhibitory activity. *Science*, 238, 209-211.
- Hook, V. Y. & Hwang, S. R. (2002). Novel secretory vesicle serpins, endopin 1 and endopin 2: endogenous protease with distinct target protease specificities. *Biol. Chem.*, 383, 1067-1074.
- Hook, V. Y. H., Purviance, R. T., Azaryan, A. V., Hubbard, G. & Krieger, T. J. (1993). Purification and characterization of alpha 1-antichymotrypsin-like protease inhibitor that regulates prohormone thiol protease involved in enkephalin precursor processing. *J. Biol. Chem.*, 268, 20570-20577.
- Hook, V. Y., Yasothornsrikul, S. & Hwang, S. R. (2002). Novel, chromaffin granule serpins, endopin 1 and endopin 2: endogenous protease inhibitors with distinct target protease specificities. *Ann. NY Acad. Sci.*, 971, 426-444.

- Hopkins, P. C. R., Carrell, R. W. & Stone, S. R. (1993). Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry*, 32, 7650-7657.
- Hornemann, T., Kempa, S., Himmel, M. & Haye, K. (2003). Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J. Mol. Biol.*, 332, 877-887.
- Horvitz, H. R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.*, 59 (S7), 1701s-1706s.
- Howard, A., Lee, C. A. & Webster, H. L. (1960). C.S.I.R.O. *Div. Food Press. Tech.*, Paper N°. 21.
- Huber, R. & Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acct. Chem. Res.*, 11, 114-122.
- Huff-Lonergan, E. & Lonergan, S. M. (1999). *Post mortem* mechanisms of meat tenderisation: the roles of the structural proteins and the calpain system. In *Quality attributes of muscle foods*. Pp. 219-251. Edited by L. Xiong, C. T. Ho & F. Shahidi. New York: Kluwer Academic/Plenum.
- Huff-Lonergan, E. J., Mitsuhashi, T., Beekman, D. D., Parrish, F. C., Olson, D. G. & Robson, R.M. (1996). Proteolysis of specific muscle structural proteins by  $\mu$ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in *post mortem* bovine muscle. *J. Anim. Sci.*, 74, 993-1008.
- Hunt, L. T. & Dayhoff, M. O. (1980). A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III and alpha-1-inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 864-871.
- Huntington, J. A., Read, R. J. & Carrell, R.W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407, 923-926.
- Hwan, S. F. & Bandman, E. (1989). Studies of desmin and  $\alpha$ -actinin degradation in bovine *semitendinosus* muscle. *J. Food. Sci.*, 54, 1426-1430.
- Hwang, S., Steineckert, B., Yasothronrikul, S., Sei, C. A., Toneff, T., Rattan, J. & Hook, V. Y. (1999). Molecular cloning of endopin 1, a novel serpin localized to neurosecretory vesicles of chromaffin cells. Inhibition of basic residue-cleaving proteases by endopin 1. *J. Biol. Chem.*, 274, 34164-34173.
- Hwang, S., Stoka, V., Turk, V. & Hook, V. H. Y. (2005). The novel bovine serpin endopin 2C demonstrates selective inhibition of the cysteine protease cathepsin L compared to the serine protease elastase in cross-class inhibition. *Biochemistry*, 44, 7757-7767.
- I**m, H., Seo, E. J. & Yu, M. H. (1999). Metastability in the inhibitory mechanism of human  $\alpha$ 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.*, 274, 11072-11077.
- Imperiali, B. & O'Connor, S. E. (1999). Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 643-649.
- Ishiguro, H., Higashiyama, S., Namikawa, C., Kunimatsu, M., Takano, E., Tanaka, K., Ohkubo, I., Murachi, T. & Sasaki, M. (1987). Interaction of human calpains I and II with high molecular weight and low molecular weight kininogens and their heavy chain: mechanism of interaction and the role of divalent cations. *Biochemistry*, 26, 2863-2870.
- Ishiura, S., Morufushi, H., Suzuki, K. & Imahori, K. (1978). Studies of calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. Purification and characterisation. *J. Biochem.*, 84, 225-230.
- Janciauskiene, S. (2001). Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1535, 221-235.
- J**anoff, A. (1985). Elastase in tissue injury. *Ann. Rev. Med.*, 36, 207-216.
- Jensen, O. N. (2006). Interpreting the protein language using proteomics. *Mol. Cell Biol.*, 7, 391-403.
- Jeremiah, L. E. (1982). Factors affecting consumption, selection and acceptability of meat purchases. *J. Consum. Stud. Home econom.*, 6, 137-154.

- Jiang, S. T. (2000). Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. *Food Sci. Agric. Biol.*, 2, 55-74.
- Jin, H., Wu, Z., Tian, T. & Gu, Y. (2001). Apoptosis in atrophic skeletal muscle induced by brachial plexus injury in rats. *J. Trauma*, 50, 31-35.
- Johnson, D. J. D. & Huntington, J. A. (2004). The Influence of Hinge Region Residue Glu-381 on Antithrombin Allosteric and Metastability. *J. Biol. Chem.*, 279, 4913-4921.
- K** Joseph, R. L. & Connolly, J. (1977). The effects of suspension method chilling rate and *post mortem* ageing period on beef quality. *J. Food Sci.*, 12, 231-247.
- Karlsson, A. H., Klont, R. E. & Fernandez, X. (1999). Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Liv. Prod. Sci.*, 60, 255-269.
- Kaslik, G., Kardos, J., Szabo, E., Szilagyi, L., Zavodszky, P., Westler, W. M., Markley, J. L. & Graf, L. (1997). Effects of serpin binding on the target proteinase: global stabilization, localized increased structural flexibility, and conserved hydrogen bonding at the active site. *Biochemistry*, 36, 5455-5464.
- Kawamura, Y. H., Kume, Y., Itoh, S., Kimura, S. & Maruyama, K. (1995). Localization of three fragments of connectin in chicken breast muscle sarcomeres. *J. Biochem.*, 117, 201-207.
- Kay, J., Heath, R., Dahlmann, B., Kuehn, L. & Strauber, W. T. (1985). Serine proteinases and protein breakdown in muscle. In *Intracellular catabolism*. Pp. 195-205. Edited by E. A. Khairallah, J. S. Bond & J. W. C. Bird. New York: Alan R. Liss.
- Kay, J., Jupp, R. A., Richards, A. D., Thomas, D. J., Yamamoto, K., Reid, W. A., Dunn, B. M. & Samloff, I. M. (1988). The aspartic proteinases, cathepsin E and cathepsin D in relation to protein degradation within cells. In *Intracellular proteolysis. Mechanisms and regulation*. Pp. 155-168. Edited by N. Katunuma & E. Kominami.
- Kem, G., Kern, D., Jaenicke, R. & Seckler, R. (1993). Kinetics of folding and association of different glycosylated variants of invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Sci.*, 2, 1862-1868.
- Kemp, C. M., Parr, T., Bardsley, R. G. & Buttery, P. J. (2006). Comparison of the relative expression of caspase isoforms in different porcine skeletal muscles. *Meat Sci.*, 73, 426-431.
- Kerr, J. F. R., Winterford, C. M., Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73, 2013-2026.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J. Cancer*, 26, 239-257.
- Kezdy, F. J. & Kaiser, E. T. (1969). Principles of active site titration of proteolytic enzymes. *Methods in enzymology*, 19, 3-27.
- Kiesling, K. H. & Hansson, I. (1983). Fiber composition and enzyme activities in pig muscles. *Swedish J. Agric. Res.*, 13, 257-261.
- Kim, O., Chung, S. S., Woo, K. M., Ha, D. B. & Chung, C. H. (1992). Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor from chicken skeletal muscle. *Biochem. International*, 27, 963-972.
- King, N. L. (1981). Breakdown of connectin during cooking of meat. *Meat Sci.*, 11, 27-43.
- Kinoshita, N. (1973). The structure and function of muscle cells. In *Muscle Proteins, Muscle Contraction and Cation Transport*, pp. 5-26. Edited by Y. Tonomura. Tokyo: University of Tokio Press.
- Kirschke, H., Barret, A. J. & Rawlings, N. D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Prot. Profile*, 2, 1581-1643.
- Klont, R. E., Brocks, L. & Eikelenboom, G. (1998). Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci.*, 49, Suppl., s219-s229.
- Kominami, E., Ishido, K., Muro, D. & Sato, N. (1992). The primary structure and tissue distribution of cathepsin C. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 373 (7), 367-373.

- Koohmaraie, M. (1992). Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification and characterization and comparison of its effects on myofibrils with  $\mu$ -calpains. *J. Anim. Sci.*, 70, 3697-3706.
- Koohmaraie, M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation processus of meat. *Meat Sci.*, 43S, S193-S201.
- Koohmaraie, M., Seideman, S. C., Schollmeyer, J. E., Dutson, T. R. & Crouse, J. D. (1987). Effect of *post mortem* storage on calcium dependant proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Sci.*, 19, 187-196.
- Koohmaraie, M., Seideman, S. C., Schollmeyer, J. E., Dutson, T. R. & Babiker, A. S. (1988). Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. *J. Anim. Sci.*, 67, 934-942.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D. H., Crouse, J. D. & Mersmann, H. J. (1991). *Post mortem* proteolysis in *longissimus* muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J. Anim. Sci.*, 69, 617-624.
- Korpula-Mastalerz, R. & Dubin, A. (1996). The intracellular serpin family. *Acta Biochem. Pol.*, 43, 419-429.
- Kosteliansky, U. E. & Gneushev, G. H. (1983). Vinculin localization in cardiac muscle. *FEBS Lett.*, 159, 158-160.
- Krem, M. M., Rose, T. & Di Cera, E. (1999). The C-terminal sequence encodes function in serine proteases. *J. Biol. Chem.*, 274, 28063-28066.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 60, 619-642.
- Kruger, M., Wright, J. & Wang, K. (1991). Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size and epitope profile. *J. Cell Biol.*, 115, 97-107.
- Kruggel, W. G. & Field, R. A. (1971). Soluble intramuscular collagen characteristics from stretched and aged muscle. *J. Food Sci.*, 36, 1114-1117.
- Kuehn, L., Rutschmann, M., Dahlmann, B. & Reinauer, H. (1984). Identification of four distinct serine proteinase inhibitor in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 96-102.
- Kumamoto, T., Kleese, W. C., Cong, J. Y., Goll, D. E., Pierce, P. R. & Allen, R. E. (1992). Localization of the  $\text{Ca}^{+2}$ -dependant proteinases and their inhibitor in normal, fasted and denervated rat skeletal muscle. *Anat. Rec.*, 232 (1), 60-67.
- Kumamoto, T., Ueyama, H., Sugihara, R., Kominami, E., Goll, D. E. & Tsuda, T. (1997). Calpain and cathepsins in the skeletal muscle of inflammatory myopathies. *Eur. Neurol.*, 37 (3), 176-181.
- Kumamoto, T., Ueyama, H., Watanabe, J., Yoshiuka, K., Miike, T., Goll, D. E., Ando, M. & Tsuda, T. (1995). Immunohistochemical study of calpain and its endogenous inhibitor in the skeletal muscle of muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.*, 89 (5), 399-403.
- Labouesse, M. C. (1994). *C. Elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent: "small is beautiful". *Med. Sci.*, 10, 337-341.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Laki, K. (1971). Actin. In *Contractile proteins and muscle*. Pp. 97-134. Edited by K. Laki. New York: Marcel Dekker Inc.
- Lane, R. D., Allan, D. M. & Mellgren, R. L. (1992). A comparison of the intracellular distribution of  $\mu$ -calpain, m-calpain and calpastatin in proliferating human A431 cells. *Exp. Cell Res.*, 203, 5-16.
- Larzul, C., Lefaucheur, L., Ecolan, P., Gogué, J., Talmant, A., Sellier, P., Le Roy, P. & Monin, G. (1997). Evolution *post mortem* du tissu musculaire et conséquences sur les qualités de la viande du porc. *J. Rech. Porcine Fr.*, 20, 201-214.
- Lawrie, R. A. (1998). *Lawrie's Meat Science*, 6<sup>th</sup> Ed. Suffolk: Edmundsbury Press.

- Lazarides, E. & Hubbard, B. D. (1976). Immunological characterization of the subunit of the 100 Å filaments from muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 4344-4348.
- Lee, C., Park, S. H., Lee, M. Y. & Yu, M. H. (2000). Regulation of protein function by native metastability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 7727-7731.
- Lee, W. J., Ma, H., Takano, E., Yang, H. Q., Hatanaka, M. & Maki, M. (1992). Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J. Biol. Chem.*, 267, 8437-8442.
- Leeuwenburgh, C. (2003). Role of apoptosis in sarcopenia. *The Journals of Gerontology. Series A, Biol. Sci. Med. Sci.*, 58, 999-1001.
- Lefaucheur, L. & Gerard, D. (2000). Muscle fiber plasticity in farm mammals. *Proceedings of the American Society of Animal Science*. Available at: <http://www.asas.org/jas/symposium/proceedings/0307.pdf>
- Libby, P. & Goldberg, A. L. (1990). Effects of chymostatin and other proteinase inhibitors on protein breakdown and proteolytic activities in muscle. *Biochem. Journal.*, 188, 213-218.
- Light, N. D. & Champion, A. E. (1984). Characterization of muscle epymisium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem. J.*, 219, 1017-1026.
- Liu, C. C. & Ahearn, J. M. (2001). Apoptosis of skeletal muscle cells and the pathogenesis of myositis: a perspective. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 3, 325-333.
- Liu, X. S., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. D. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89, 175-184.
- Liu, Y., Fields, R., Festoff, B. W. & Nelson, P. G. (1994). Proteolytic action of thrombin is required for electrical activity-dependent synapse reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 10300-10304.
- Locker, R. H. & Hagyard, C. J. (1963). A cold shortening effect in beef muscles. *J. Sci. Food Agric.* 14, 787-793.
- Locker, R. H. & Leet, N. G. (1975). Histology of highly-stretched beef muscle. The fine structure of grossly stretcheed single fibers. *J. Ultrastruc. Res.*, 52, 64-75.
- Loeberman, H., Tokuoka, R., Deisenhofer, J. & Huber, R. (1984). Human  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J. Mol. Biol.*, 177, 531-557.
- Lusby, M. L., Ridpath, J. F., Parrish, F. & Robson, R. (1983). Effect of *post mortem* storage on degradation of the myofibrillar protein titin in bovine *longissimus* muscle. *J. Food Sci.*, 48, 1787-1790.
- Ly, J. D., Grubb, D. R. & Lawen A. (2003). The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8, 115-128.
- M** Mac Bride, M. A. & Parrihs, F. C. (1977). The 30 000 Dalton component of tender bovine *longissimus* muscle. *J. Food Sci.*, 42 (6), 1627-1629.
- Machlin, L. J. & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1, 441-445.
- Maher, P. A., Cox, G. F. & Singer, S. J. (1984). A new high molecular weight protein of the Z-bands of adult striated muscle and of early myotubes in culture. *J. Cell Biol.*, 99, (4, Pt. 2): 27a (Abstr.).
- Maher, P. A., Cox, G. F. & Singer, S. J. (1985). Zeugmatin: a new high molecular weight protein associated with Z-lines in adult and early embryonic striated muscle. *J. Cell Biol.*, 101, 1871-1883.
- Majino, G. & Jons, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *American J. Pathol.*, 146, 3-15.
- Maki, M., Takano, E., Osawa, T., Ooi, T., Murachi, T. & Hatanaka, M. (1988). Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, 263, 10254-10261.

- Maltin, C. A., Warkup, C. C., Matthews, K. R., Grant, C. M., Porter, A. D. & Delday, M. L. (1997). Pig muscle fibre characteristics as a source of variation in eating quality. *Meat Sci.*, 47, 237-248.
- Mann, M. & Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Biotechnol.*, 21, 255-261.
- Margolius, H. S. (1996). Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes*, 45 (suppl. 1), 514-519.
- Marsh, B. B. & Carse, W. A. (1974). Meat tenderness and the sliding filament hypothesis. *J. Food Technol.*, 9, 129-139.
- Marsh, B. B. & Leet, N. G. (1966). Studies in meat tenderness. III. The effects of cold shortening on tenderness. *J. Food Sci.*, 31, 450-459.
- Marshall, C. J. (1993). Evolutionary relationships among the serpins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 342, 101-119.
- Martin, S. J., Reutlingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., et al. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, 182, 1545-1556.
- Martin, S.J. & Green, D. R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell*, 82, 349-352.
- Maruyama, K. (1971). Regulatory proteins. In *Contractil Proteins and Muscle*. Pp. 289-313. Edited by K. Laky. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Maruyama, K. (1985). Myofibrillar cytoskeletal proteins of vertebrate striated muscle. In *Developments in Meat Science*. Edited by R. Lawrie. Elsevier, Applied Science, 3, 25-50.
- Maruyama, K., Yoshioka, T., Higuchi, H., Ohashi, K., Kimura, S. & Natori, R. (1985). Connectin filaments link thick filaments and Z-lines in frog skeletal muscle as revealed by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.*, 101, 2167-2172.
- Masaki, T. & Takaiti, O. (1974). M-protein. *J. Biochem.*, 75, 367-380.
- Mathialagan, N. & Hansen, T. R. (1996). Pepsin-inhibitory activity of the uterine serpins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 13653-13658.
- Mathoniere, C. (1999). Etude de la texture de la viande bovine par analyse sensorielle, enregistrements de la mastication méthodes mécaniques. PhD. Thesis. Université Blaise Pascal. Laboratoire Rheologie-Structure-Texture. Saint Genès-Champanelle, France.
- Matsura, T., Togawa, A., Kai, M., Nishida, T., Nakada, J., Ishibe, Y., et al. (2005). The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface. *Biochim. Biophys. Acta*, 1736, 181-188.
- Matsura, T., Kimura, S., Ohtsuka, S. & Maruyama, K. (1991). Isolation and characterization of a 1200 kDa peptide of a connectin. *J. Biochem.*, 110, 474-478.
- Matthews, B. W., Sigler, P. B., Henderson, R. & Blow, D. M. (1967). Tridimensional structure of chymotrypsin. *Nature*, 214, 652-656.
- Mayfield, R. K., Shimojo, N. & Jaffa, A. A. (1996). Skeletal muscle kallikrein: potential role in metabolic regulation. *Diabetes*, 45 (suppl. 1), 520-523.
- Mbebi, C., Hantai, D., Jandrot-Perrus, M., Doyennette, M. A. & Verdier-Sahoque, M. (1999). Protease nexin I expression is upregulated human skeletal muscle by injury-related factors. *J. Cell Physiol.*, 179, 305-314.
- Meier, P., Finch, A. & Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.
- Meynier, A. & Gandener, G. (1994). La flaveur des viandes cuites: relations avec l'oxydation des phospholipides. *Viandes Prod. Carnés*, 15, 179-182.

- Mignon, A., Rouquet, N. & Joulin, V. (1998). Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ?. *Med. Sci.*, 14, 9-17.
- Mikami, M., Whiting, A. H., Taylor, M. A. J., Maaewicz, R. A. & Etherington, D. J. (1987). Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates. *Meat Sci.*, 21, 81-87.
- Mikus, P. & Ny, T. (1996). Intracellular polymerization of the serpin plasminogen activator inhibitor type 2. *J. Biol. Chem.*, 271, 10048-10053.
- Mishra, N. C. & Kumar, S. (2005). Apoptosis: A mitochondrial perspective on cell death. *Indian J. Exp. Biol.*, 43, 25-34.
- Mohamad, N., Gutierrez, A., Nunez, M., Cocca, C., Martin, G., Cricco, G., et al. (2005). Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell*, 29, 149-161.
- Monin, G. & Ouali, A. (1992). Muscle differentiation and meat quality. In *Developments in Meat Science*, pp. 89-157. Edited by R. Lawrie. London: Elsevier Applied Science.
- Monin, G. (1988). Evolution *post mortem* du tissu musculaire et conséquences sur les qualités de la viande de porc. *Journées Rech. Porcine en France*, 20, 201-214.
- Monin, G. (1997). Phenotypic and genetic parameters for *Longissimus* muscle fiber characteristics in relation to growth, carcass and meat quality traits in Large White pigs. *J. Anim. Sci.*, 75, 3126-3137.
- N Mykles, D. L. (1989). High-molecular-weight serin proteinase from lobster muscle that degrades myofibrillar proteins. *J. Exp. Zool.*, 250, 244-252.
- N Nagase, H. (1996). Matrix metalloproteinases. In *Zinc metalloproteinases in health and disease*. Pp. 153-204. Edited by N. M. Hooper. London: Taylor and Francis Ltd.
- Nakamura, H., Yoshimura, K., Mecelvaney, N. G. & Crystal, R. G. (1992). Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individual with cystic fibrosis induces IL-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J. Clin. Invest.*, 89, 1478-1484.
- Negishi, H., Yamamoto, E. & Kuwata, F. (1996). The origin of the 30 kDa appearing during *post mortem* ageing of bovine muscle. *Meat Sci.*, 42 (3), 289-303.
- Neurath, H. (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, 224, 350-357.
- Nicholson, D. W. (1996). ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nat. Biotechnol.*, 14, 297-301.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 6 (11), 1028-1042.
- Nicholson, D. W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 407, 810-816.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376, 37-43.
- Nishimura, T., Hattori, A. & Takahashi, K. (1995). Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef. *Meat Sci.*, 39, 127-133.
- Nishimura, T., Hattori, A. & Takahashi, K. (1996). Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during *post mortem* ageing of beef. *Meat Sci.*, 42, 251-260.
- Nogushi, T. & Kandatsu, M. (1969). Inhibition of autolytic breakdown of muscle proteins by the sarcoplasm and the serum of rat. *Agric. Biol. Chem. Short Communication*, 33, 1226-1228.
- O O'Farrell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.
- Offer, G. & Knight, P. (1988). The structural basis of water-holding in meat. I-II. *Dev. Meat Sci.*, 4, 63-243.

- Offer, G. (1983). On mechanism of water-holding in meat. The swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Sci.*, 8, 245-281.
- Ogata, T. & Mori, M. (1964). Histochemical studies of oxidative enzymes in vertebrate muscles. *J. Histochem. Cytochem.*, 12, 171-182.
- Olson, S. T., Stephens, A. W., Hirs, C. H., Bock, P. E. & Bjork, I. (1995). Kinetic characterization of the proteinase binding defect in a reactive site variant of the serpin, antithrombin. Role of the P1' residue in transition-state stabilization of antithrombin-proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.*, 270, 9717-9724.
- Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T. C., Beckman, J. S., Ishiura, S. & Suzuki, K. (1998). Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J. Biol. Chem.*, 273, 17073-17078.
- Orlowski, M. & Wilk, S. (1981). A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 814-822.
- Ouali, A. & Talmant, A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Sci.*, 28, 331-338.
- Ouali, A. (1976). Contribution à l'étude du rôle des protéases musculaires dans la maturation de la viande. PhD. Thesis. Université de Clermont II.
- Ouali, A. (1990a). La maturation des viandes: facteurs biologiques et technologiques de variation. *Viandes Prod. Carnés*, 11, 281-290.
- Ouali, A. (1990b). Meat tenderisation: possible causes and mechanisms. A review. *J. Muscle Foods*, 1, 129-165.
- Ouali, A. (1991). Sensory quality of meat as affected by muscle biochemistry and modern technologies. In *Animal biotechnology and the quality of meat production*. Pp. 85-185. Edited by L. O. Fiems; B. G. Cottyn & D. I. Demeyer. Amsterdam: Elsevier Science.
- Ouali, A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251-265.
- Ouali, A. (1999). Structure and biochemistry of muscle as related to meat texture. Proc. 14<sup>th</sup> European Symposium of the Quality of Poultry Meat. *Bologna*, 1, 91-121.
- Ouali, A., Dufour, E., Obled, A., Deval, C. & Valin, C. (1988). Action des protéinases musculaires sur les myosines rapide et lente. Relation avec la protéolyse *post mortem* dans les muscles de type contractile variable. *Rep. Nut. Développ.*, 28, 839-844.
- Ouali, A., Garrel, N., Obled, A., Deval, C. & Valin, C. (1987). Comparative action of cathepsins D, B, H, L and of a new lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils. *Meat Sci.*, 19, 83-100.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. & Sentandreu, M. A. (2006). Reinvesting the conversion of muscle into meat and underlying mechanisms. *Meat Sci.*, 74, 44-58.
- Ouali, A., Obled, A., Cottin, P., Mercodi, N., Duscastaing, A. & Valin, C. (1983). Comparative effects of *post mortem* storage and low calcium requiring neutral proteinase on bovine and rabbit myofibrillar proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 466-476.
- Ouali, A., Rouchon, P., Zabari, M., Berri, M., Zamora, F. & Tassy, C. (1995). Natural serine and cysteine proteinase inhibitors in bovine skeletal muscle. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*. Pp. 85-105. Edited by A. Ouali, D. I. Demeyer & F. J. M. Smulders. Utrecht, Pays Bas: ECCEAMST.
- Ouali, A., Vignon, X. & Bonnet, M. (1991). Osmotic pressure in *post mortem* bovine muscles : factors of variation and possible causative agents. Proc. 37<sup>th</sup> ICoMST, Kumbach, Allemagne, 1, 452-456.
- Ouchterlony, O. (1948). Antigen-Antibody reactions in gels. *Acta Path.*, 26, 507-514.

- Padykula, H. A. & Gauthier, G. F. (1967). Morphological and cytochemical characteristics of fiber types in normal mammalian skeletal muscle. In *Exploratory Concepts in Muscle Dystrophy and Related Disorders*. Edited by A. T. Milhorat. New York: Excerpta Medica.
- Palka, K. (1999). Changes in intramuscular connective tissue and collagen solubility of bovine m. *Semitendinosus* during retorting. *Meat Sci.*, 53, 189-194.
- Papa, I. (1997). Etude de la strie Z de muscle blanc de poisson, mécanismes de destructuration et protéines impliquées. Interaction CapZ-alpha-actinine. PhD. Thesis. Université Montpellier I.
- Park, D. C., Parsons, M. E. & Pennington, F. J. T. (1973). Evidence for Mast-cell origin of proteinase in skeletal muscle homogenates. *Biochem. Soc. Trans.*, 1, 730-734.
- Passeriex, E., Rossignol, R., Chopard, A., Camino, J. F., Manni, J. F., Letellier, T. & Delage, J. P. (2006). Structural organization of the perimysium in bovine skeletal muscle : junctional plates and associated intracellular subdomains. *J. Struct. Biol.*, Article in Press.
- Patston, P. A., Gettins, P., Beechem, J. & Schapira, M. (1991). Mechanism of serpin action: evidence that C1 inhibitor functions as a suicide substrate. *Biochemistry*, 30, 8876-8882.
- Patston, P. A., Hauert, J., Michaud, M. & Bottomley, S. P. (1995). Formation and properties of C1-inhibitor polymers. *FEBS Lett.*, 368, 401-404.
- Patty, L. (1985). Evolution of protease of blood coagulation and fibrinolysis by assembly modules. *Cell*, 41, 657-663.
- Pearson, A. M. & Young, R. B. (1989). *Muscle and Meat Biochemistry*. San Diego: Academic Press Inc. 457 pp.
- Pennacchio, L. A., Bouley, D. M., Higgins, K. M., Scott, M. P., Noebels, J. L. & Myers, R. M. (1998). Progressive ataxia myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nature Genetics*, 20, 251-258.
- Penny, I. F. (1977). The effect of temperature on the drip denaturation an extra cellular space of pork *Lgongissimus dorsi* muscle. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 329-338.
- Perona, J. J. & Craik, C. S. (1997). Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J. Biol. Chem.*, 272, 29987-29990.
- Perona, J. J., Tsu, C. A., McGrath, M. E., Craik, C. S. & Fletterick, R. J. (1993). Relocating a negative charge in the binding pocket of trypsin. *J. Mol. Biol.*, 230, 934-949.
- Perrin, C., Vergely, C. & Rochette, L. (2004). Les calpaïnes: implication en pathologie cardiaque. *Ann. Cardiol. Angéol.*, 53, 259-266.
- Peter, J. B., Balmar, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A. & Stempel, K. E. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 11, 2627-2633.
- Petit, P. X., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., Mignotte, B., Kroemer, G. & Castedo, M. (1997). Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.*, 174, 185-188.
- Pette, D. & Staron, R. S. (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 116, 1-76.
- Pfeiffer, N. E., R. A., Varnell, T. R., Kruggel, W. G. & Kaisser, I. I. (1972). Effects of *post mortem* ageing and stretching on the macromolecular properties of collagen. *J. Food Sci.*, 37, 897-900.
- Pierobon-Bormioli, S., Biral, D., Betto, R. & Salviati, G. (1992). Immunoelectron microscopic epitote locations of titin in rabbit hearth muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 13, 35-38.
- Poirier, J., Ribadeau, J. L., Catila, M., Andre, J. M., Gherardi, R. & Bernaudin, J. F. (1999). *Histologie Moléculaire*. Paris : Masson. 430 pp.
- Pollack, G. H. (1990). *Muscles and molecules*. 3<sup>th</sup> Edn. Seattle: Ebner and Sons. 300 pp.

- Potempa, J., Enghild, J. J. & Travis, J. (1995). The primary elastase inhibitor (elastasin) and trypsin inhibitor (contrapsin) in the goat are serpins related to human  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. *Biochem. J.*, 306, 191-197.
- Potempa, J., Kozus, E. & Travis, J. (1984). The serpin superfamily of proteinase inhibitors : structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.*, 269, 15957-15960.
- Powers, J. C., Boom, R. E., Carroll, D. L., Gopton, B. F., Kam, C. M., Nishino, N., Sakamoto, M. & Tohy, P. M. (1984). Reaction of azapeptides with human leukocyte elastase and porcine. *J. Biol. Chem.*, 259, 4288-4299.
- Primeau, A. J., Adhietty, P. J. & Hood, D. A. (2002). Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Canadian J. App. Physiol.*, 27, 349-395.
- Q** Purchas, R. W. (1990). An assessment of the role of pH differences in determining the relative tenderness of meat from bulls and steers. *Meat Sci.*, 27, 129-140.
- R** Quinsey, N. S., Greedy, A. L., Bottomley, S. P., Whisstock, J. C. & Pike, R. N. (2004). Antithrombin: in control of coagulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36, 386-389.
- Ragg, H., Lokot, T., Kamp, P. B., Atchley, W. R. & Dress, A. (2001). Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses. *Mol. Biol. Evol.*, 18, 577-584.
- Rami, A., Agarwal, R., Botez, G. & Winckler, J. (2000).  $\mu$ -calpain activation, DNA fragmentation and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain Res.*, 866, 299-312.
- Rawlings, N. D. & Barret, A. J. (1994a). Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.*, 244, 461-486.
- Rawlings, N. D. & Barret, A. J. (1994b). Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.*, 244, 19-61.
- Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G.S. & Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell*, 69, 597-604.
- Raynaud, F., Fernandez, E., Coulis, G., Aubry, L., Vignon, X., Bleimling, N., Gautel, M., Benyamin, Y. & Ouali, A. (2005). Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J.*, 272, 2578-2590.
- Reed J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of the programmed cell death. *J. Cell Biol.*, 124, 1-6.
- Reid, K. B., Bentley, D. R., Campbell, R. D., Chong, L. D., SM, R. B., Knstensen, T. & Tack, B. F. (1986). Complement system proteins which interact with C3B or C4B. *Immunol. Today*, 7, 230-234.
- Renerre, M. (1984).** Variabilité entre muscles et entre animaux de la stabilité de la couleur des viandes bovines. *Sci. Aliment.*, 4, 567-584.
- Renerre, M. (1999).** Biochemical basis of fresh meat color. *Proc. 45<sup>th</sup> ICoMST, Tokyo*, 1, 344-353.
- Richards, G. P., Chao, L. & Chao, J. (1997).** Distribution of tissue kallikreins in lower vertebrates: potential physiological roles for fish kallikreins. *Comp. Biochem. Physiol.-C- Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 118, 49-58.
- Rivett, A. J. (1989).** The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 1-8.
- Rivett, A. J. (1993).** Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.*, 291, 1-10.
- Robson, R. M. (1995).** Myofibrillar and cytoskeletal structures and proteins in mature skeletal muscle cells. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*. Pp. 267-288. Edited by A. Ouali, D. I. Demeyer & F. J. M. Smulders. Utrecht, Pays Bas: ECCEAMST.
- Robson, R. M., Hojatt, T. & Parrish, J. (1991).** Biochemical and structural properties of titin, nebulin and intermediate filaments in muscle. *Proc. Recip. Meat Conf.*, 44, 7-20.

- Robson, R. M., O'Shea, J. M., Hartzler, M. K., Rathbun, W. E., Lasalle, F., Schreiner, P. J., Kassang, L.E., Stromer M. J., Lusby, M. L., Ridpath, J. F., et al. (1984).** Role of a new cytoskeletal elements in maintenance of muscle integrity. *J. Food Biochem.*, 8, 1-24.
- Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984).** Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 601-609.
- Roncalés, P., Jaime, I., Beltran, J. A., Geesink, G. H., Laack, H. L. J., Barnier, V. M. H., & Smmulders, F. J. M. (1995).** Meat tenderization: enzymatic mechanisms. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*. Pp. 311-332. Edited by A. Ouali, D. I. Demeyer & F. J. M. Smulders. Utrecht, Pays Bas: ECCEAMST.
- Rouchon, P. (1995).** Inhibiteurs de masse moléculaire élevée des cystéine et des sérine protéinases du muscle squelettique: purification et caractérisation physico-chimique et cinétique. PhD Thesis, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.
- Saito, K., Elce, J. S., Hamos, J. E. & Nixon, R. A. (1993).** Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 2628-2632.
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998).** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391 (6662), 96-99.
- Salvesen, G. (1993).** Can serine proteinase inhibitors inhibit cysteine proteinases?. In *Proteolysis and protein turnover*. Pp. 57-64. Edited by J. S. Bond & A. J. Barrett. London: Portlans Press.
- Salvesen, G. S. & Duckett, C. S. (2002).** IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3(6), 401-410.
- Sandri, M. & Carraro, U. (1999).** Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31, 1373-1390.
- Sandri, M. (2002).** Apoptotic signaling in skeletal muscle fibers during atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nut. Metab. Care*, 5, 249-253.
- Sandri, M., El Meslemani, A. H., Sandri, C., Schjerling, P., Vissing, K., Andersen, J. L., Rossini, K., Carraro, U. & Angelini, C. (2001).** Caspase-3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and Facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment?. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60, 302-312.
- Sanz, M. C., Verde, M. T., Saez, T. & Sanudo, C. (1996).** Effect of breed on the muscle glycogen content and dark cutting incidence in stressed young bulls. *Meat Sci.*, 43, 37-42.
- Schechter, N. M & Plotnick, M. (2004).** Measurement of the kinetic parameters mediating protease-serpin inhibition. *Methods*, 32, 159-168.
- Scheidegger, J. J. (1955).** Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy*, 7, 103-110.
- Schiaffino, S., Ausoni, E., Gorza, L., Saggin, L., Gundersen, K. & Lomo, T. (1988).** Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. *Acta Physiol. Scand.*, 134, 575-576.
- Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K. & Lomo, T. (1989).** Three myosin heavy chain isoformes of type 2 skeletal fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 10, 197-205.
- Schick, C., Bromme, D., Bartuski, A. J., Uemura, Y., Schechter, N. M. & Silverman, G.A. (1998a).** The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 13465-13470.
- Schick, C., Pemberton, P. A., Shi, G. P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A. J., Gornstein, E. R., Bromme, D., Chapman, H. A. & Silverman, G. A. (1998b).** Croos-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry*, 37, 5258-5266.

- Schwartz, W. & Bird, J. W. (1997).** Degradation of a myofibrillar proteins by cathepsins B and D. *Biochemical J.*, 167, 811-820.
- Scopes, R. K. (1964).** The influence of *post mortem* conditions on the solubilities of muscle proteins. *Biochem. J.*, 91, 201-207.
- Scott, F. L., Coughlin, P. B., Bird, C., Hayman, J. A. & Bird, P. (1996).** Proteinase inhibitor 6 cannot be secreted, which suggests it is a new type of cellular serpin. *J. Biol. Chem.*, 271, 1605-1612.
- Seideman, S. C., Crouse, J. & Cross, H. R. (1986).** The effect of sex condition and growth implants on bovine muscle fiber characteristics. *Meat Sci.*, 17, 79-95.
- Sentandreu, M. A., Coulis, G. & Ouali, A. (2002).** Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.*, 13, 400-421.
- Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Whipple, G., Wheeler, T. L., Miller, M. F., Crouse, J. D. & Reagan, J. O. (1991).** Predictors of beef tenderness: development and verification. *J. Food Sci.*, 56, 1130-1135.
- Sharp, J. G. (1957).** Deterioration of dehydrated meat during storage. I. Non-enzymatic deterioration in absence of oxygen at tropical temperatures. *J. Sci. Food. Agric.*, 8, 14-20.
- Shi, Y. (2002).** Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, 9, 459-470.
- Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C. Coughlin, P. B., et al. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.*, 276, 33293-33296.
- Silverman, R. B. (1995).** Mechanism-based enzyme inactivators. *Methods enzymol.*, 249, 240-283.
- Simmons, N. J., Singh, K., Dobbie, P. & Devine, C. E. (1996). The effects of *pre rigor* holding temperature on calpain and calpastatin activity and meat tenderness. *Proc. 42<sup>nd</sup> ICoMST, Lillehammer, Norvege*, 414-415.
- Sinha, U., Sinha, S. & Janoff, A. (1988).** Characterization of sheep alpha-1-proteinase inhibitor. Important differences from the human protein. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 137, 558-563.
- Sivasothy, P., Dafforn, T. R., Gettins, P. G. & Lomas, D. A. (2000).** Pathogenic alpha 1-antitrypsin polymers are formed by reactive loop-beta-sheet A linkage. *J. Biol. chem.*, 275, 33663-33668.
- Sloane, B. F. (1990).** Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin. Cancer Biol.*, 1, 137-152.
- Smulders, F. J. M., Marsh, B. B., Swartz, D. R., Russell, R. L. & Hoenecke, M. E. (1990).** Beef tenderness and sarcomere length. *Meat Sci.*, 28, 349-363.
- Smulders, F. J. M., Van Laak, R. L. J. & Eikelenboom, G. (1991).** Muscle and meat quality: biological basis processing preparation. In *The European meat industry in the 1990's*. Pp. 121-166. Edited by Frans J. M. Smulders. Utrecht: ECCEAMST.
- Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y. & Suzuki, K. (1989).** Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependant protease distinct from both m- and  $\mu$ -types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 264, 20106-20111.
- Sorimachi, H., Ishiura, S. & Suzuki, K. (1997).** Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.*, 328, 721-732.
- Sorimachi, H., Tsukahara, T., Okada-Ban, M., Sugita, H., Ishiura, S. & Suzuki, K. (1995).** Identification of a third ubiquitous calpain species chicken muscles expresses four distinct calpains. *Biochem. Biophys. Acta.* 1261, 381-393.
- Spanier, A. & Bird, J. W. C. (1983).** Endogenous cathepsin B inhibitory activity in normal and myopathic red and white muscle. *Muscle and Nerve*, 5, 313-320.
- Starr, R. & Offer, G. (1971).** Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations. *FEBS Lett.*, 15, 40-44.

- Starr, R. & Offer, G. (1983).** H-Protein and X-Protein. Two new components of the thick filaments of vertebrate skeletal muscle. *J. Mol. Biol.*, 170, 675-698.
- Stein, P. E. & Carrell, R. W. (1995).** What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?. *Nature Struct. Biol.*, 2, 96-113.
- Stein, P. E., Leslie, A. G. W., Finch, I. T., Turnell, W. G., McLaughlin, P. J. & Carrell, R. W. (1990).** Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature*, 347, 99-102.
- Steiner, F., Wober, K. & Fürst, D. (1999).** M band proteins myomesin and skelemin are encoded by the same gene: analysis of its organization and expression. *Genomics*, 56, 78-89.
- Steller, H. (1995).** Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267, 1445-1449.
- Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. (1999).** Caspases: Preparation and characterisation. *Methods*, 17, 313-319.
- Stone, D. & Smille, L. B. (1978).* The amino acid sequence of rabbit skeletal alpha-tropomyosin. The amino terminal half and complete sequence. *J. Biol. Chem.*, 253, 1137-1142.
- Stone, S. R., Whisstock, J. C., Bottomley, S. P. & Hopkins, P. C. R. (1997).** Serpins: a mechanistic class of their own. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 425, 5-15.
- Stryer, L. (1981).** *La biochimie de Lubert Stryer*. New York : Flammarium Medecine Sciences.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., et al. (1999).** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-446.
- Takano, E. & Maki, M. (1999).** Structure of calpastatin and its inhibitory control of calpain. In *Calpain: pharmacology and toxicology of calcium-dependent protease*. Pp. 25-50. Edited by K. K. W. Wang & P. W. Yuen. Philadelphia: Taylor and Francis.
- Takano, E., Maki, M., Mori, H., Hatanaka, M., Marti, T., Titani, K., Kannagi, R., Ooi, T. & Murachi, T. (1988).** Pig heart calpastatin : identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 27, 1964-1972.
- Tanaka, K., Li, K., Ichihara, A., Waxman, L. & Goldberg, A. L. (1986).** A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 261, 15197-15203.
- Tanaka, K., Yoshimura, T., Ichihara, A., Ikai, A., Nishigai, M., Morimoto, M., Sato, M., Tanaka, N., Katsube, Y., Kameyama, K. & Takagi, T. (1988).** Molecular organization of a high molecular weight multi-protease complex from rat liver. *J. Mol. Biol.*, 203, 985-996.
- Tarrant, P. V. (1981).** The occurrence, causes and economic consequences of dark cutting in beef a survey of current information. In *The problem in dark cutting in beef*. Pp. 3-10. Edited by D. E. Hood & P. V. Tarrant. La Haye, Pay Bas: Martinus Nijhoff Publishers.
- Tassy, C. (1998).** Purification et caractérisation d'un inhibiteur de sérine protéinases à partir de muscle squelettique de bovin. PhD Thesis, EPHE, Paris.
- Tassy, C., Herrera-Mendez, C. H., Sentandreu, M. A., Aubry, L., Bremaud, L., Pelissier, P. et al (2005).** Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin inhibiting strongly elastase : purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. *Biochem. J.*, 388, 273-280.
- Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M. & Goll, D. E. (1995).** Is Z-disk degradation responsible for *post mortem* tenderization ?. *J. Anim. Sci.*, 73, 1351-1367.
- Tessitore, L., Bonelli, G. & Baccino, F. M. (1987).** Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumor-bearing rats. *Biochem. J.*, 241, 153-159.
- Tews, D. S. (2002).** Apoptosis and muscle fiber loss in neuromuscular disorders. *Neuromuscul. Disorders*, 12, 613-622.
- Tews, D. S. (2005).** Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle and Nerve*, 32, 443-458.

- Thompson, C. B. (1995).** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.
- Thornberry, N. A. & Lazenby, Y. (1998).** Caspases, enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.
- Thornell, L. P. & Price, M. G. (1991).** The cytoskeleton in muscle cells in relation to function. *Biochem. Soc. Trans.*, 19, 1116-1120.
- Tonomura, Y. (1973).** *Muscle proteins muscle contraction and cation transport*. Tokyo : University Park Press.
- Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J. Y., Altairac, S., Zeggai, S., Martin, E., Treton, J., Courtois, Y. & Cournis, M. F. (2000).** A caspase-independent cell clearance program. The LEI/L-DNase II pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 926, 192-203.
- Tosi, M. F., Zaken, H. & Berger, M. (1990).** Neutrophil elastase cleave C3bi on opsonized *Pseudomonas* as well as CR1 on the neutrophils to create a fonctionnaly important opsonin receptor mismatch. *J. Clin. Invest.*, 86, 300-308.
- Toyohara, H., Makinodan, Y., Tanaka, K. & Ikeda, S. (1983).** Detection of calpastatin and a trypsin inhibitor in carp muscle. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1151-1154.
- Travis, J. & Salvesen, G. S (1983).** Human proteinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 655-709.
- Trout, G. R. (1988).** Techniques for mesuring water-holding capacity in muscle foods- a review of methodology. *Meat Sci.*, 23, 235-252.
- Troy, D. J. & Tarrant, P. V. (1987).** Changes in myofibrillar proteins from electricalls stimulated beef. *Biochem. Soc. Trans.*, 15, 287-298.
- Trump, B. F., Berezsky, I. K., Chang, S. H. & Phelps, P. C. (2001).** The pathways of cell death: Oncosis, apoptosis and necrosis. *Toxicol. Pathol.*, 25, 82-88.
- Turk, V., Brzin, J., Kotnik, M., Lenarcic, B., Popovic, T., Ritonja, A., Trstenjack, M., Begic-Odobasic, L. & Machleidt, W. (1986).** Human cysteine proteinases and their protein inhibitors stefins, cystatins and kininogens. *Biom. Biochim. Acta.*, 45, 1375-1384.
- Twining, S. S. (1994).** Proteolytic activity in tissues. *Crit. Revs. Biochem. Mol. Biol.*, 29, 315-383.
- U** **Uemori, T., Shimojo, T., Asada, K., Asano, T., Kimizuka, F., Kato, I., Maki, M., Hatanaka, M., Murachi, T., Hanzawa, H. et al. (1990).** Characterization of a functional domain of human calpastatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166, 1485-1493.
- Uytterhaegen, L., Claeys, E. & Demeyer, D. (1992).** The effect of electrical stimulation on beef tenderness protease activity and myofibrillar protein fragmentation. *Biochimie*, 74, 275-281.
- Uytterhaegen, L., Claeys, E. & Demeyer, D. (1994).** Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *J. Anim. Sci.*, 72, 1209-1223.
- V** **Valin, C. & Charpenter, J. (1969).** Catabolisme *post mortem* des nucléotides acides solubles libres et liés du muscle de bovin. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 9, 555-562.
- Valin, C. (1982).** Electrical stimulation in France. In *Meat science and technology*. Pp. 107-124. Edited by K. R. Franklin & H. R. Cross. Chicago: National Live Stock and Meat Board.
- Valin, C. (1985).** Les protéases des viandes. In *Hydrolases et dépolymérasés*. Pp. 279-312. Edited by A. Mouranche & C. Costes. Paris: Gauthier-Villars.
- Valin, C. (1988).** Differentiation du tissu musculaire conséquences technologiques pour la filiere viande. *Reprod. Nutr. Develop.*, 28, 845-856.
- Valin, C. (1995).** Animal and muscle variability in tenderisation: possible causes. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*. Pp. 435-442. Edited by A. Ouali; D. I. Demeyer & F. J. M. Smulders. Utrecht (NL): ECCEAMST.

- Valin, C., Palanska, O. & Goutefongea, R. (1975).** Etude de la qualité de viandes de bovin. 1) Etude biochimique de la maturation des viandes de taurillon. *Ann. Tech. Agric.*, 24, 47-64.
- Valin, C., Touraille, C., Vigneron, P. & Ashmore, C. (1982).** Prediction of meat quality traits based on muscle biopsy fibre typing. *Meat Sci.*, 6, 257-263.
- Van Gorp, M., Festjens, N., Van Loo, G., Saelens, X. & Vandenabeele, P. (2003).** Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304(3), 487-497.
- Varallyay, E., Lengyel, Z. G. & Szilagyl, L. (1997).** The role of disulfide bond C191-C220 in trypsin and chymotrypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 592-596.
- Veiseth, E. & Koohmaraie, M. (2005).** Beef tenderness: Significance of the calpain proteolytic system. Pp. 111-126. Edited by J. F. Hocquette & S. Gigli. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers (EAAP publication No. 112).
- Venugopal, B. & Bailey, M. E. (1978).** Lysosomal proteinases in muscle tissue and leucocytes of meat animals. *Meat Sci.*, 2, 227-231.
- Verdiere-Sahuque, M., Akaaboune, M., Lachkar, S., Festoff, B. W., Jandrot-Perrus, M., Garcia, L., Barlovatz-Meimon, G. & Hantai, D. (1996).** Myoblast fusion promotes the appearance of active protease nexin 1 on human muscle cell surfaces. *Exp. Cell Res.*, 222, 70-76.
- W** **Vignon, X., Beaulaton, J. & Ouali, A. (1989).** Ultrastructural localisation of calcium in *post mortem* bovine muscle : a cytochemical and X-ray microanalytical study. *Histochem. J.*, 21, 403-411.
- Walls, E. W. (1960).** The microanatomy of muscle. In *The Structure and Function of Muscle*. Vol. 1, pp. 21-62. Edited by G. H. Bourne. New York: Academic Press INC.
- Wang, K. & Singer, S. (1975).** Filamin a new high-molecular weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 4483-4486.
- Wang, K., Mc Clure, J. & To. A. (1979).** Major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 3698-3702.
- Warris, P. D. (1978).** Factors affecting the residual blood content of meat. *Meat Sci.*, 2, 155-159.
- Waterhouse, N. J., Ricci, J. E. & Green, D. R. (2002).** And all a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie*, 84, 113-121.
- Watorek, W., Failey, D., Salvesen, G. & Travis, J. (1988).** Neutrophil elastase and cathepsin E: structure, function and biological control. *Advan. Expt. Med. Biol.*, 240, 23-31.
- Weber, I. T., Hamson, R. W. & Lozzo, R. V. (1996).** Model structure of decorin and implication for collagen fibrillogenesis. *J. Biological Chem.*, 271, 31767-31770.
- Wei, A., Rubm, H., Cooperman, B. S. & Christianson, D. W. (1994).** Crystal structure of an uncleaved serpin reveals the conformation of an inhibitory reactive loop. *Nat. Struct. Biology*, 1, 251-258.
- Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M. E., Crouse, J. D., Hunt, M. C. & Klemm, R. D. (1990).** Evaluation of attributes that affect *longissimus* muscle tenderness in Bos Taurus and Bos Indicus cattle. *J. Anim. Sci.*, 68, 2716-2728.
- Whisstock, J., Skinner, R. & Lesk, A. M. (1998).** An atlas of serpins conformations. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 63-67.
- White, E. (1996).** Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.*, 10, 1-15.
- Wiederanders, B., Brumme, D., Kirshke, H., Figura, K., Schmidt, B. & Peters, C. (1992).** Phylogenetic conservation of cysteine proteinase. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. *J. Biol. Chem.*, 267, 13708-13713.
- Williams, G. T. & Smith, C. A. (1993).** Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, 74, 777-779.

Wright, H. T. & Scarsdale, J. N. (1995). Structural basis for serpin inhibitor activity. *Proteins*, 22, 210-225.

Wyllie, A. (1998). An endonuclease at least. *Nature*, 391, 20-21.

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-556.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306.

## Y

Yamada, H., Saito, F., Fakuta-Chi, H., Zhong, D., Hase, A., Arai, K., Okuyama, A., Maekawa, R., Shimizu, T. & Matsumara, K. (2001). Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum. Mol. Gen.*, 10, 1563-1569.

Youle, R. J. & Karbowsky, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 657-663.

Young, O. A., Graafhuis, A. E. & Davey, C. L. (1980-81). *Post mortem* changes in cytoskeletal proteins of muscle. *Meat Sci.*, 5, 41-55.

Yu, M. H., Lee, K. N. & Kim, J. (1995). The Z type variation of human alpha 1-antitrypsin causes a protein folding defect. *Nature Struct. Biol.*, 2, 363-367.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvits, H. R. (1993). The *C. elegans* death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75, 641-652.

Yuan, J., Wang, M. X. & Murrell, G. A. (2003). Cell death and tendinopathy. *Clin. Sport Med.*, 22, 693-701.

## Z

Zabari, M., Berri, M., Rouchon, P. & Ouali, A. (1991). Fractionation and characterization of proteinase inhibitors from bovine skeletal muscle. *Procc. Of the 37<sup>th</sup> ICOMST, Kulmbach, Netherland*, 2, 510-512.

Zabari, M., Berri, M., Rouchon, P., Zamora, F., Tassy, C., Ribadeau-Dumas, B. & Ouali, A. (1993). Purification and characterization of a polymorphic low Mr bovine muscle cysteine proteinase inhibitor : structural identity with fatty-acid-binding proteins. *Biochimie*, 75, 937-945.

Zamora, F. (1997). Variabilité biologique de l'attendrissage de la viande bovine: prédiction en fonction du facteur animal et du facteur type de muscle. PhD thesis, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.

Zamora, F., Aubry, L., Sayd, T., Lepetit, J., Lebert, A., Sentandreu, M. A. & Ouali, A. (2005). Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Sci.*, 71, 730-742.

Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfield, E. & Ouali, A. (1996). Predicting variability of ageing and toughness in beef *M. Longissimus lumborum* et *thoracis*. *Meat Sci.*, 43, 321-333.

Zhou, A., Stein, P. E., Huntington, J. A. & Carrell, R. W. (2003). Serpin polymerization is prevented by a hydrogen bond network. That is centered on His-334 and stabilized by glycerol. *J. Biol. Chem.*, 278, 15116-15122.

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. & Salvesen, G. S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J. Biol. Chem.*, 272, 7797-7800.

## LISTE DES PUBLICATIONS

Ouali A., Herrera-Mendez C.H., **Becila Samira**, Boudjellal A. (2006). Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes. *Viandes et Produits Carnés*, 24, 205-213.

Carlos Hernan Herrera-Mendez, **Samira Becila**, Abdelghani Boudjellal and Ahmed Ouali. (2006). Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology*. 17, 394-405.

Ahmed Ouali, Carlos Hernan Herrera-Mendez, Gerald Coulis, **Samira Becila**, Abdelghani Boudjellal, Laurent Aubry and Miguel Angel Sentandreu. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74, 44-58.

Ouali A., Herrera-Mendez C. H., Coulis G., **Becila Samira**, Boudjellal A., Harhoura K., Aubry L., Sentandreu M.A. (2007). Meat tenderisation and muscle cell death, two highly related events. *Tehnologija mesa*, 48, 1-15.

Abdelghani Boudjellal,, **Samira Becila**, Gerald Coulis, Carlos Hernan Herrera-Mendez, Laurent Aubry, Jacques Lepetit, Khaled Harhoura, Miguel Angel Sentandreu and Ahmed Ouali. (2007). Polyphasic character of postmortem pH drop in bovine and ovine muscles: consequences on meat texture and possible causes. *African Journal of Agricultural Research Vol. 3 (3)*, pp. 195-204.

Pelissier P., Deloume D., Germot A., Blanchet X., **Becila S.**, Maftah A., Leveziel H., Ouali A. and Bremaud L. (2008) An original SERPINA3 gene cluster : Elucidation of genomic organization and gene expression in the *Bos taurus* 21q24 region. *BMC Genomics*, 9, 151

Gerald Coulis, **Samira Becila**, Carlos H. Herrera-Mendez, Miguel A. Sentandreu, Fabrice Raynaud, Isabelle Richard, Yves Benyamin, and Ahmed Ouali.(2008) Calpain 1 Binding Capacities of the N1-Line Region of Titin Are Significantly Enhanced by Physiological Concentrations of Calcium *Biochemistry* 47, 9174–9183

Carlos H. Herrera-Mendez<sup>1</sup>, **Samira Becila**<sup>1</sup>, Xavier Blanchet<sup>1</sup>, Patrick Pelissier, Didier Delourme ,Gerald Coulis , Miguel A. Sentandreu , Abdelghani Boudjellal , Laure Bremaud , Ahmed Ouali, (2009) Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3. *Federation of European Biochemical SocietiesFEBS Letters* 583 (2009) 2743–2748

**1 These three authors contributed similarly to the present work.**

**Samira Becila**, Carlos H. Herrera-Mendez, Gerald Coulis, Roland Labas, Thierry Astruc, Miguel Angel Sentandreu, Brigitte Picard, Abdelghani Boudjellal, Patrick Pelissier, Laure Bremaud, Ahmed Ouali : *POSTMORTEM ONSET OF APOPTOSIS IN RAT MUSCLES (Article soumis pour publication)*

## **COMMUNICATION ORALE**

PREDICTING VARIABILITY OF TOUGHNESS IN LAMBS MEAT BY PENETRIOMETRY

**BECILA Samira**, BOUDJELLAL Abdelghani, AGLI Abdelnacer, OUALI Ahmed

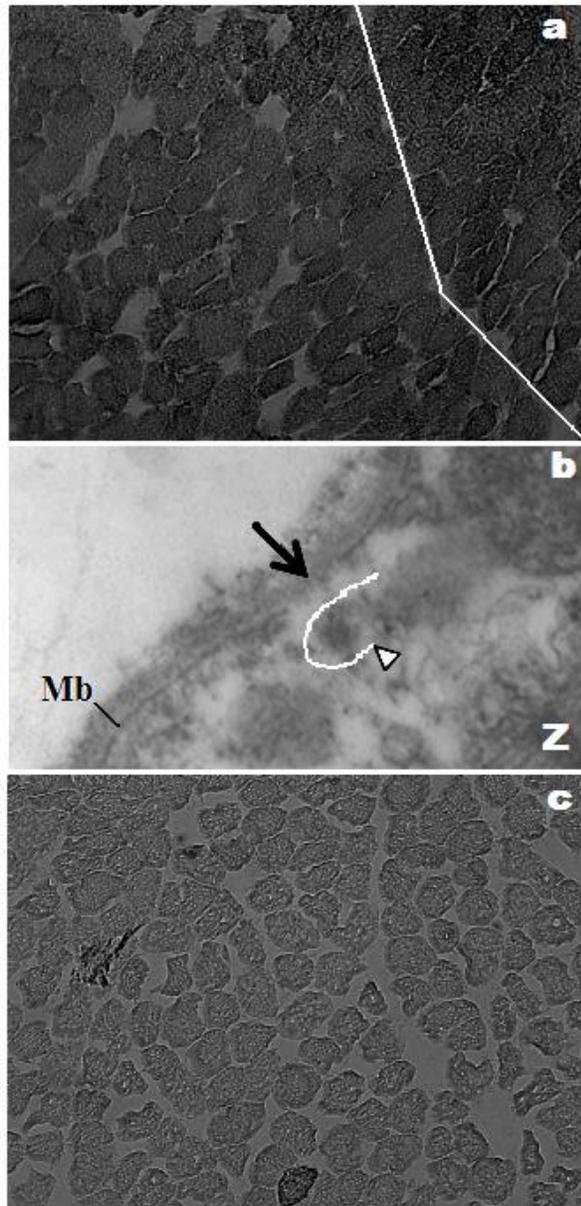
*FIRST EGYPTO-SURIEN CONGRES "AGRICULTURE AND FOOD IN ARAB CONTRIES: CONSTRAINTS AND FUTURE PERSPECTIVES" EGYPTE LE 11 DECEMBRE 2003*

## **COMMUNICATION ECRITE**

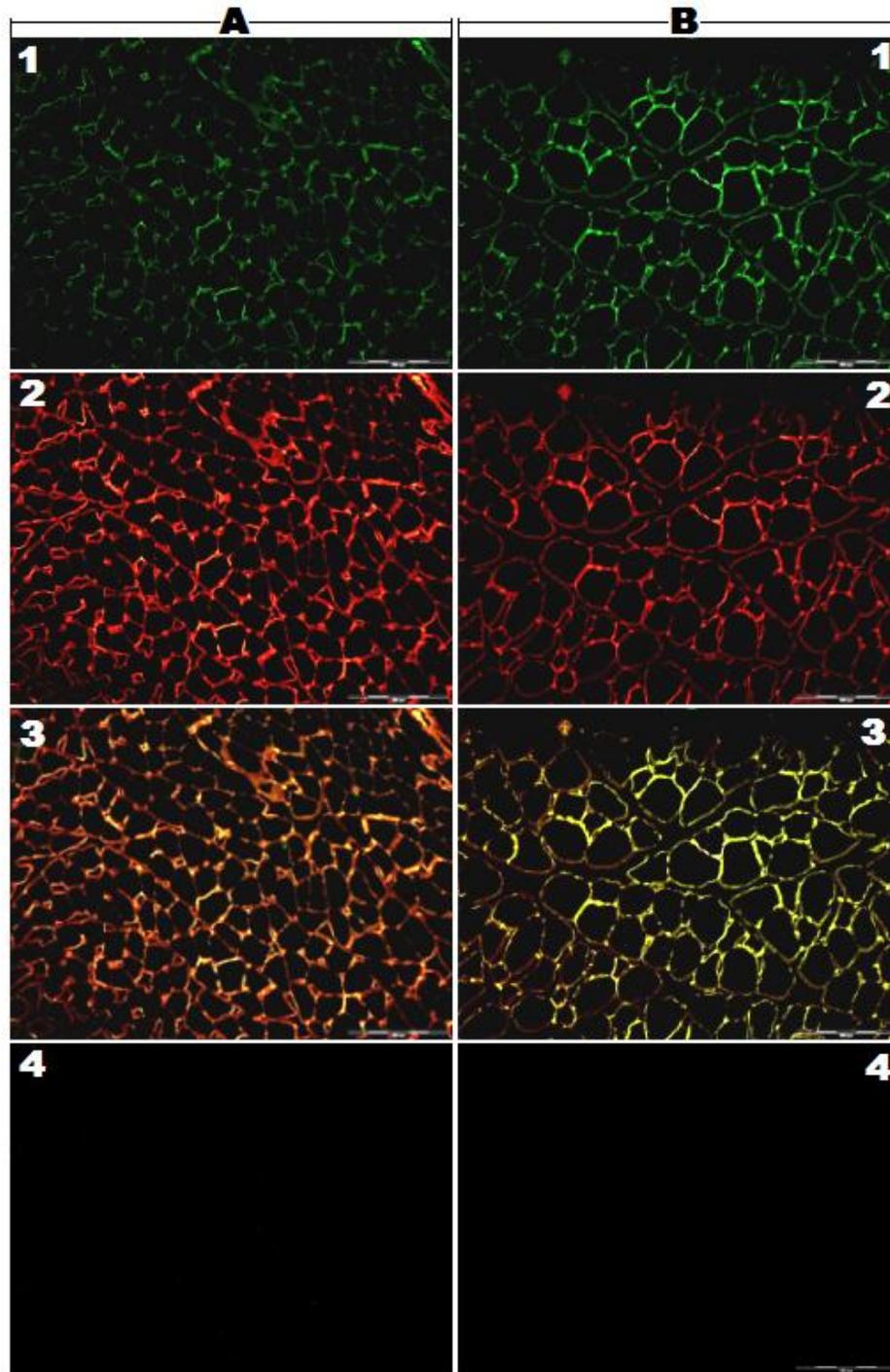
**Becila Samira**, BOUDJELLAL A., AGLI A., OUALI A. Measuring texture of meat with the penetrometer. The first congress of alimenter security, TUNISIE 31 march at 03 April **2006**



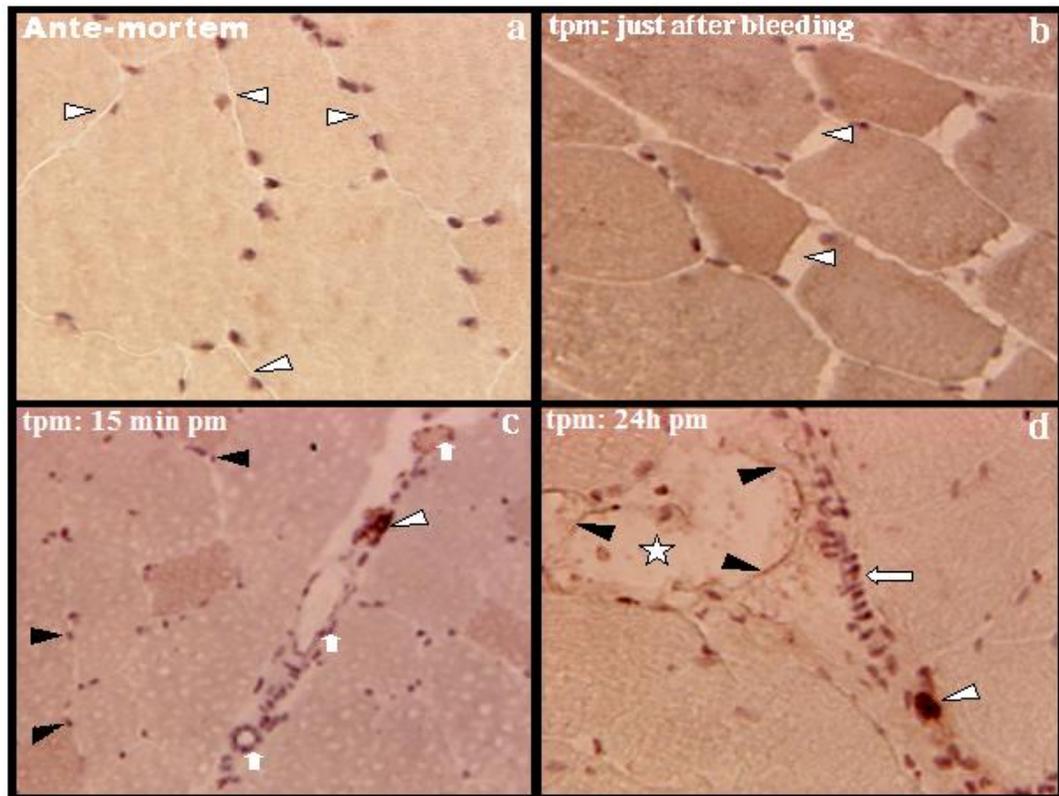
**Figure 1: Estimation of the Extent of shrinkage on** samples excised just after bleeding from rat *Longissimus* muscle. The contrast of the image was adjusted in order to identify clearly the cell limits using Corel Paint Shop Pro X application from Macromedia (Paris). Extracellular space was colored in black. After printing the figure, cells were cut out with or without the associated extracellular space and pieces of paper corresponding to the cell alone (grey area in Figure 1, G) and to the cell plus the extracellular space (grey and black area in Figure 1B) were weighted. The extent of shrinkage was calculated using the following equation:  $\text{Shrink} = (1 - (G / (G + B))) * 100$ , where “Shrink” is the extent of shrinkage (%), “G”, the weight of the cell alone and (G+B), the weight of the cell plus the associated extracellular space.



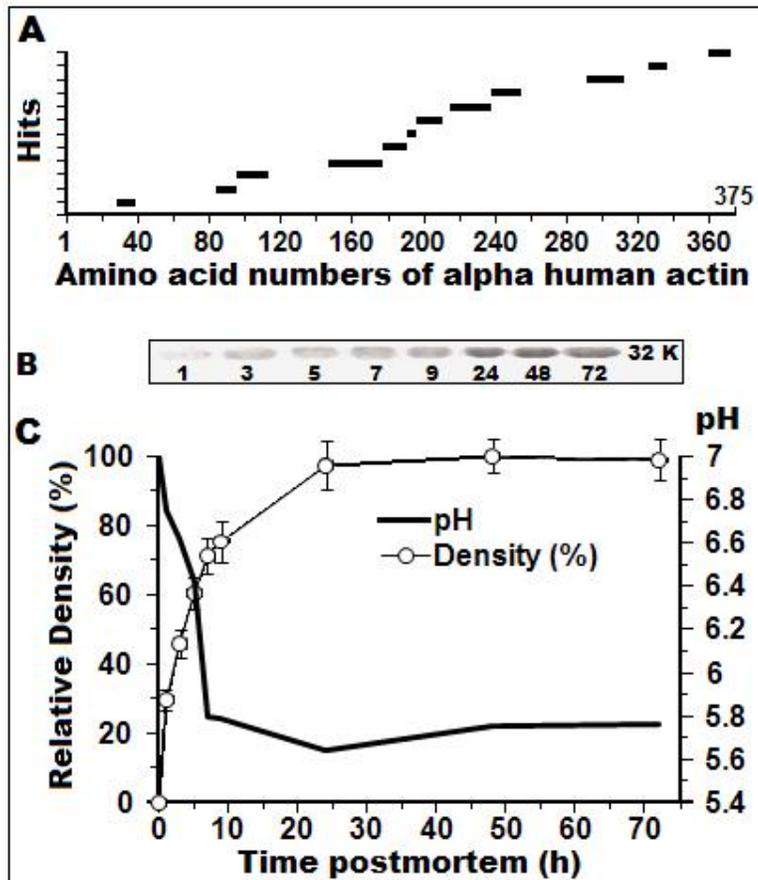
**Figure 2: Cell shrinkage and related structural damage of the membrane.** (a) Transversal section of rat *Gastrocnemius* muscle excised 1h *postmortem* (x 1000). The white line delimited the left region of the section where shrinkage is more important than in the right one. (b) Membrane disruption at the costamere level observed by electron microscopy examination of a 2h *postmortem* sample (magnification: x 100000). The black arrow indicate the position of the hole in the membrane and the white open arrowheads shows the released portion of the membrane still bound to the costamere/Z-line (Z) transversal filaments. (c) Transversal section of rat *Gastrocnemius* muscle excised 24h (x 1000). For more details see the material and methods section.



**Figure 3: Phosphatidylserine externalization and Laminin labeling.** (A) Samples from rat *Gastrocnemius* muscle excised 1h *postmortem*. (B) Samples from rat *Gastrocnemius* muscle excised from the second leg 24h *postmortem*. (1) Samples labeled with a FITC-Annexin V conjugate at 1h (A) and 24h (B) *postmortem*. Note the greater fluorescent labeling of the 24h sample as compared to 1h ( $\lambda_{exc}$  488 nm;  $\lambda_{emm}$  530 nm). (2) Samples labeled with a rabbit specific Laminin antibody revealed with a cyanine 3 goat anti-rabbit IgG conjugate at 1h (A) and 24h *postmortem*. Note the lower fluorescent labeling of the 24h sample as compared to 1h probably indicative of the degradation of the Laminin ( $\lambda_{exc}$  554 nm;  $\lambda_{emm}$  568 nm). (3) Merged image from 1 and 2. (4) Control samples for annexin V (A4) and Laminin (B4) labeling in which the FITC Annexin V conjugate and the primary anti-Laminin antibody respectively were omitted.



**Figure 4: DNA fragment detection.** Immunostaining of apoptosis generated DNA fragments was carried out on rat *Longissimus* muscle using a specific monoclonal antibody (Apostain) (35). Samples were counter stained with the traditional Hematoxylin/ Erythrosin method. (a) Control sample excised ante-mortem from the anaesthetized animal. Open arrow heads indicate the regular and restricted thickness of the interstitial space. (b) Transversal cut of a sample excised just after bleeding and showing shrinkage of muscle fibres and a parallel increase in the extra-cellular space (Open arrow heads). (c) Similar muscle sample excised 15 min after bleeding showing DNA fragment staining (dark brown colour) in a mononucleated cells (open arrow head). In this view of the sample we noticed a high concentration of small cells, probably resident macrophages delineating empty cells or altered blood vessels (open arrows). Muscle cells nucleus showed no DNA degradation (close arrow heads). (d) Similar sample excised 24h *postmortem* and showing a mononucleated cell with fragmented DNA (open arrow head), a high concentration of small cells corresponding very likely to resident macrophages and aligned along a fibre and an empty cell (open star) delineated by a structure resembling to the altered cell membrane (close arrow heads). Abbreviations used: tpm: time *postmortem*; pm: *postmortem*.



**Figure 5: Identification of the 32 kDa actin fragment and the raising level with storage time.** (a) Maldi-ToF mass spectrometry trypsin peptide finger print of the 32 kDa fragment matching well with skeletal muscle alpha actin sequence. (b) The 32 kDa actin fragment as revealed by Western blot. Times of sampling were 1, 3, 5, 7, 9, 24, 48 and 72h *postmortem*. (c) Plot of the density of the 32 kDa band revealed by western blot and of the pH drop profile versus time. Each point is the mean for 5 animals  $\pm$  standard deviation.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3

Carlos H. Herrera-Mendez<sup>d,1</sup>, Samira Becila<sup>c,1</sup>, Xavier Blanchet<sup>b,1</sup>, Patrick Pelissier<sup>b</sup>, Didier Delourme<sup>b</sup>, Gerald Coulis<sup>a</sup>, Miguel A. Sentandreu<sup>e</sup>, Abdelghani Boudjellal<sup>c</sup>, Laure Bremaud<sup>b</sup>, Ahmed Ouali<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>UR370, QuaPA, INRA de Clermont Ferrand – Theix, 63122 Saint Genes Champanelle, France

<sup>b</sup>UGMA, UMR 1061, INRA-Université Limoges, 123, Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France

<sup>c</sup>INATAA, Université de Constantine, Route de Aïn El Bey, 25000 Constantine, Algeria

<sup>d</sup>UNESS, Universidad de Guanajuato, Privada de Arteaga S/N, 38900 Salvatierra, Guanajuato, Mexico

<sup>e</sup>Department of Food Science, C.S.I.C., Apt. 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 June 2009

Revised 21 July 2009

Accepted 30 July 2009

Available online 7 August 2009

Edited by Gianni Cesareni

#### Keywords:

Caspase  
bovSERPINA3  
Serpine  
Inhibitor  
Bovine muscle

### ABSTRACT

**Serpins are a superfamily of structurally conserved proteins. Inhibitory serpins use a suicide substrate-like mechanism. Some are able to inhibit cysteine proteases in cross-class inhibition. Here, we demonstrate for the first time the strong inhibition of initiator and effector caspases 3 and 8 by two purified bovine SERPINA3s. SERPINA 3-1 (uniprotkb:Q9TTE1) binds tightly to human CASP3 (uniprotkb:P42574) and CASP8 (uniprotkb:Q14790) with  $k_{\text{ass}}$  of  $4.2 \times 10^5$  and  $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively. A wholly similar inhibition of human CASP3 and CASP8 by SERPINA3-3 (uniprotkb:Q3ZEJ6) was also observed with  $k_{\text{ass}}$  of  $1.5 \times 10^5$  and  $2.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively and form SDS-stable complexes with both caspases. By site-directed mutagenesis of bovSERPINA3-3, we identified Asp<sup>371</sup> as the potential P1 residue for caspases. The ability of other members of this family to inhibit trypsin and caspases was analysed and discussed.**

#### Structured summary:

MINT-7234656: CASP8 (uniprotkb:Q14790) and SERPINA3-1 (uniprotkb:Q9TTE1) bind (MI:0407) by biochemical (MI:0401)

MINT-7234634: SERPINA3-3 (uniprotkb:Q3ZEJ6) and CASP3 (uniprotkb:P42574) bind (MI:0407) by biochemical (MI:0401)

MINT-7234663: CASP8 (uniprotkb:Q14790) and SERPINA3-3 (uniprotkb:Q3ZEJ6) bind (MI:0407) by biochemical (MI:0401)

MINT-7234625: SERPINA3-1 (uniprotkb:Q9TTE1) and CASP3 (uniprotkb:P42574) bind (MI:0407) by biochemical (MI:0401)

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Serpins, a large family of structurally related proteins, are widely distributed among eukaryotes and in some bacteria and viruses. They are involved in many highly regulated physiological processes such as blood coagulation, fibrinolysis, cell migration and inflammation [1,2] and serpin dysfunctions can have severe pathological consequences [3].

**Abbreviations:** CrmA, cytokine response modifier A; DTT, dithiothreitol; FMC, fluoromethylketone;  $k_{\text{ass}}$ , association rate constant; NHMeC, aminomethyl coum-arylamide; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PI9, protease inhibitor 9; RCL, reactive centre loop; SDS, sodium dodecyl sulfate; Z, benzylloxycarbonyl

\* Corresponding author. Fax: +33 4 73 62 42 68.

E-mail address: [ouali@clermont.inra.fr](mailto:ouali@clermont.inra.fr) (A. Ouali).

<sup>1</sup> These three authors contributed similarly to the present work.

Most are inhibitory, which employ a unique suicide mechanism for inactivation of their target proteases. In the well understood case of serine proteases, after the formation of the non-covalent Michaelis complex and the subsequent cleavage of the peptide bond, the loop will insert into the core of the protein giving rise to an additional beta-sheet and transporting in the mean time the bound enzyme with it to the distal pole of the serpin. The compressed peptidase is distorted and this distortion is responsible for its inactivation and its inability to complete the peptide bond hydrolysis [4]. However some of them are able to inactivate both serine and cysteine proteases; this property is termed cross-class inhibition. We thus can mention the inhibition of prohormone thiol protease by  $\alpha$ 1-antichymotrypsin [5,6] or of cathepsin L and papain by Endopin 2 [7] but this list is not exhaustive. To date, few serpins have been reported to inhibit caspases. The first to

be identified corresponds to the cowpox virus serpin (CrmA) able to inhibit the cytotoxic serine protease granzyme B but also a series of caspases [8,9]. Human endogenous serpin PI9, a poor inhibitor of caspases 1, 4 and 8 [10], became more efficient against caspase after mutation of its P1 residue from glutamate to aspartate and able to block Fas-mediated apoptosis [11].

Recently, we related the complete organization of the bovine SERPINA3 cluster [12]. These serpins were found to be essentially intracellular and widely distributed in bovine tissues and cells [13]. Two members of this family, bovSERPINA3-1 and bovSERPINA3-3, previously named Endopin 1A and Endopin 1B, respectively, were purified and shown to inhibit strongly elastase and trypsin but neither papain nor cathepsins B and L [13,14]. The present report demonstrates, for the first time, an anti-caspase activity of mammalian SERPINA3s. We provide evidence that bovSERPINA3-1 and bovSERPINA3-3 are able to strongly inhibit initiator caspase 8 and effector caspase 3. They form SDS-stable complexes with their target enzymes with association rate constants ranging from  $1.5 \times 10^5$  to  $2.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Attempt to identify the P1 residue, Asp<sup>37</sup> (residue 371 in the mature protein) residue in the reactive centre loop (RCL) was mutated to Ala<sup>37</sup> in bovSERPINA3-3 and the mutated form still inhibited trypsin but no longer caspase 3 or 8. This finding was comforted by preliminary analysis of the N-terminal sequence of the peptide generated from the serpin, after covalent complex formation. RCL sequences of all bovSERPINA3s' members were aligned and compared and their potential ability to inhibit caspases discussed. It was concluded that bovSERPINA3-1 and bovSERPINA3-3 might be significantly relevant in situ inhibitors of caspases and consequently of programmed cell death. Furthermore, such function might be shared by other members of this family.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Titration of enzymes and inhibitors

Enzyme and inhibitor titration was performed as previously described [14]. Specific irreversible inhibitors Z-Asp-Glu-Val-Asp-FMC and Z-Val-Glu-Leu-Asp-FMC were used for titration of caspases 3 and 8, respectively. The activity was determined by using the fluorescent substrates N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHMec and Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-NHMec, respectively [15]. Caspase concentrations are expressed as the number *N* of active sites titrated by the specific inhibitor in nM and not the amount of active enzyme molecules containing two active sites (active enzyme = *N*/2). Serpin concentrations are expressed as the number of active protein molecules in nM.

Human recombinant caspases 3 and 8 from Sigma were used throughout the present work. The commercial preparations of caspases were found to be about 80% active.

### 2.2. Association rate constants

The association rate constants characterizing capsapses 3 and 8 interaction with bovSERPINA3-1 and A3-3 were determined by the progress curve method (Ref. [16] and details provided in the Supplementary data).

### 2.3. SDS-PAGE analysis of EI complexes and protein preparations

One volume of SDS buffer (30 mM Tris-HCl buffer pH 6.8 containing 4% SDS and 1% mercaptoethanol) was added to the protein samples before heat denaturation for 5 min in a boiling water bath. Electrophoresis was performed on 12% polyacrylamide slab gels.

### 2.4. Peptide preparation and N-terminal sequence analysis

An aliquot of the enzyme/inhibitor mixture was diluted with denaturing buffer (1/1, V/V) (4% SDS, glycerol 20%, Tris 120 mM,

pH 6.8, dithiothreitol (DTT) 200 mM, bromophenol blue 0.004%), heated for 5 min before cooling in ice. Samples were loaded on a 16.5% gel and run for 6 h under a 20 mA current. The gel was transferred to an Immobilon-P<sup>SO</sup> membrane and then stained with Coomassie blue. The band was cut off and subjected to N-terminal sequencing by the Edman method using an Applied Biosystems 477A pulsed liquid sequencer (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA). Phenylthiohydantoin derivatives were identified with an on-line model 120A analyser.

### 2.5. Expression and purification of wild-type and mutant forms of recombinant bovSERPINA3-3

QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was utilized to generate mutant form of bovSERPINA3-3 that substituted Ala<sup>371</sup> for Asp<sup>37</sup> (residue Asp<sup>371</sup> in the mature protein) using 5'-GATGCTCTGGGTGGCTTTGAGAACTAC-3' and reverse 5'-GTAGTTC TCAAAGCCACCCAGAGCATC-3' primers. Wild-type (WT) and mutant forms were each expressed in *Escherichia coli* BL21-RP CodonPlus (DE3)-RP strain (Stratagene) by use of the pET19b plasmid vector (Novagen, Madison, WI). Proteins were expressed with an NH<sub>2</sub>-His tag, which allows affinity purification on a Ni<sup>2+</sup> column. Purification was performed using Ni-NTA Fast Start column (QIAGEN, Les Ulis, France) according to the manufacturer's recommendations and then dialysed.

### 2.6. Protein determination

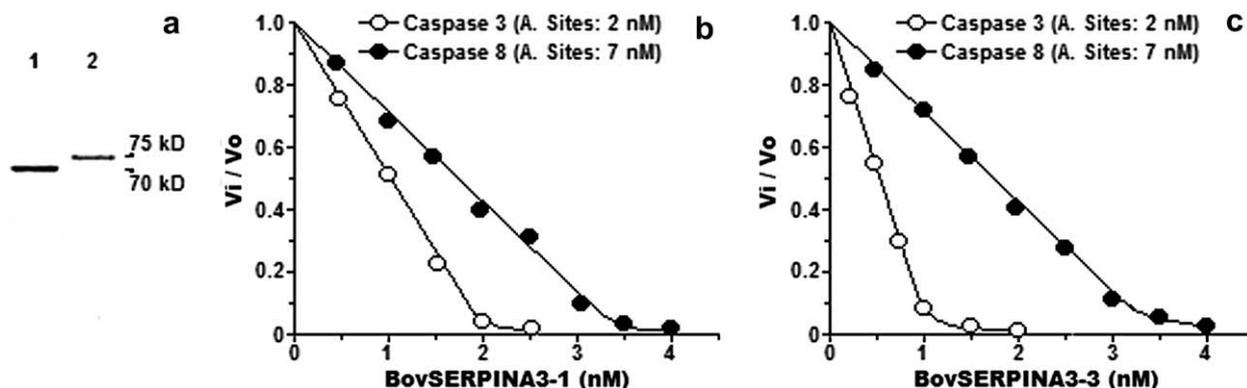
Protein concentrations were measured by using the Bradford's method (Bio-Rad protein assay) with rabbit immunoglobulin as the standard [17].

## 3. Results and discussion

BovSERPINA3-1 (GenBank: AAY22405), a 70 kDa serpin, and bovSERPINA3-3 (GenBank: AAY22406), a 75 kDa serpin, were purified from bovine skeletal muscle as previously described [14]. As assessed by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and silver staining, both serpin preparations are highly pure (Fig. 1a). Both inhibit strongly elastase and trypsin whereas no activity was detected against papain and other papain-like proteases (cathepsins B and L) [13,14]. The fact that none of the serine peptidases tested and inhibited by the bovSERPINA3s, is expressed in muscle cells led us to search for potential intracellular target enzymes including cysteine and serine proteases. Amongst the large set of proteases tested, caspases were the only one to be strongly inhibited by both serpins. Within the caspase family and because they were the most documented caspases in the field of apoptosis development [18,19], the initiator caspase 8 and the effector caspase 3 were selected to study their interaction with bovSERPINA3-1 and A3-3.

### 3.1. Stoichiometry for caspases inhibition

Amongst the macroscopic parameter defining the effectiveness of serpins inhibition of particular target protease [20], the first one is the Stoichiometry of Inhibition (SI). To assess the stoichiometry of interaction, human recombinant caspase 3 and caspase 8 were titrated with bovSERPINA3-1 and A3-3. Residual activities ( $V_i/V_0$ ) were then plotted versus the inhibitor concentration (Fig. 1b and c). Note that the enzyme concentrations indicated in the figures correspond to the number of enzyme active sites titrated with the specific synthetic inhibitor, i.e. 2 nM (equivalent to 1 nM of active enzyme) and 7 nM (equivalent to 3.5 nM of active enzyme) for



**Fig. 1.** Homogeneity of the purified bovSERPINA3-1 and A3-3 and stoichiometry of interaction with caspase 3 and 8. (a) Homogeneity of the serpin preparation as assessed by SDS-PAGE and silver staining. (b) Stoichiometry of interaction of bovSERPINA3-1 with caspase 3 (1 nM) and caspase 8 (3.5 nM). (c) Stoichiometry of interaction of bovSERPINA3-3 with caspase 3 (1 nM) and caspase 8 (3.5 nM). In b and c the concentrations indicated are the number of active sites in nM (A. Sites) as determined by titration with the corresponding specific inhibitor. The cross point of the linear part of the plot with the x-axis correspond to the amount of inhibitor needed for total inhibition of the active sites titrated (for details, see Section 3.1).

caspases 3 and 8, respectively. All I/E experimental stoichiometry ratio are depicted in Table 1.

Most target enzymes of serpins studied so far, if not all, are generally monomeric and/or have only one active site/enzyme molecule, like trypsin, chymotrypsin, elastase, cathepsin G, cathepsins B and L. Active caspases are obligate homodimers, with each monomer composed of a large (p20) and a small (p10) subunit, which are formed after the activation cleavage of the procaspase. The large subunit p20 contains the catalytic cysteine and histidine. Active caspases are therefore tetrameric structures resulting from the association of two p20–p10 heterodimers in an anti-parallel arrangement through the beta-sheet of the two p10 subunits and each active protease comprises two active sites [18].

As shown in Fig. 1b, complete inhibition of caspase 8 and caspase 3 by bovSERPINA3-1 was achieved for an inhibitor concentration of 3.5 nM ( $I/E = 3.5 \text{ nM}/7 \text{ nM} = 0.5$ ) ( $I/E \pm \text{S.D.}$  for 5 independent determinations:  $0.53 \pm 0.042$ ) and 2 nM ( $I/E = 2 \text{ nM}/2 \text{ nM} = 1$ ) ( $I/E \pm \text{S.D.}$  for 5 independent determinations:  $1.13 \pm 0.037$ ), respectively. One and two bovSERPINA3-1 molecules were therefore needed for total inhibition of active tetrameric caspases 3 and 8, respectively.

With regard to bovSERPINA3-3 (Fig. 1c), the complete inhibition of caspase 3 and caspase 8 was reached for an inhibitor concentration of 1 nM ( $I/E = 1 \text{ nM}/2 \text{ nM} = 0.5$ ) ( $I/E \pm \text{S.D.}$  for 5 independent determinations:  $0.50 \pm 0.042$ ) and 3.5 nM ( $I/E = 3.5 \text{ nM}/7 \text{ nM} = 0.5$ ) ( $I/E \pm \text{S.D.}$  for 5 independent determinations:  $0.51 \pm 0.043$ ), respectively. Hence, one bovSERPINA3-3 molecule is sufficient to inhibit totally either caspases.

To attest these findings we therefore look at the ability of these serpins to form SDS-stable complexes with caspases.

### 3.2. SDS-stable inhibitors/caspases complexes

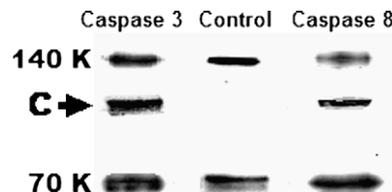
The suicide mechanism for inactivation of serpin target proteases has been verified for a large set of monomeric enzyme like trypsin, elastase and chymotrypsin [4]. Serpin inhibition of cys-

teine proteases, especially caspases, proceeds according to the same trapping mechanism than for serine proteases [21]. Upon SDS-PAGE, we could therefore expect to identify the covalent complexes resulting from the covalent trapping of caspases by bovSERPINA3s.

The bovSERPINA3/caspase complex formation was analysed by Western blotting using the RabEndo 1A polyclonal antibody. In this regard, bovSERPINA3-1 was more interesting since total inhibition of caspases 3 and 8 is achieved for an I/E ratio of 2 and 1, respectively. After preincubation of caspase 3 or 8 (5 nM) with bovSERPINA3-1 (molar ratio 1/2) at room temperature for 5 min, the substrate (100  $\mu\text{M}$ ) was added and the mixture incubated for 10 min before heat denaturation (94 °C, 4 min) of an aliquot in the presence of SDS. As shown in Fig. 2, treatment of caspases 3 and 8 by bovSERPINA3-1 leads to a SDS-stable complex of about 100–110 kDa. According to the Mr value, the complexes would comprise the cleaved inhibitor (~70 kDa) and the covalently bound caspase (~30 kDa) transported to the distal pole of the serpin.

Stoichiometry studies showed that total inhibition of caspase 3 by bovSERPINA3-1 needs the binding of two serpin molecules, one molecule per active site. The mechanism leading to a complex of 100–110 kDa (cleaved serpin + heterodimeric moiety of caspase 3) is probably similar to that reported for CrmA [9]. According to these authors, enzyme trapping by the serpin induced a dissociation of the tetrameric active caspase 3 to its two heterodimeric moieties, possibly through an alteration of the p10–p10 interface which stabilized the tetrameric complex.

For bovSERPINA3-1 interaction with caspase 8, binding of one molecule of inhibitor to one of the two active sites of the protease is sufficient for total inactivation. The mechanism by which the



**Fig. 2.** SDS-stable complexes of caspases 3 and 8 treated with bovSERPINA3-1. In vitro complex formation of caspases incubated with bovSERPINA3-1 (E/I ratio: 1/2) was revealed by Western blot with the mEndo-Ab (dilution 1/500) [13]. Note the presence of the serpin dimer (140 kDa), the monomer (70 kDa) and a complex (C) of about 100–110 kDa in lanes “caspase 3” and “caspase 8”. In lane “control”, the purified bovSERPINA3-1 was run alone.

**Table 1**  
Stoichiometry (SI) for caspases inhibition by bovSERPINA3-1 and bovSERPINA3-3. The values indicate the number of inhibitor molecule needed for inactivation of one enzyme active site. Each value is the mean  $\pm$  S.D. for five independent determinations.

	bovSERPINA3-1	bovSERPINA3-3
Caspase 3	$1.130 \pm 0.037$	$0.500 \pm 0.042$
Caspase 8	$0.530 \pm 0.042$	$0.510 \pm 0.043$

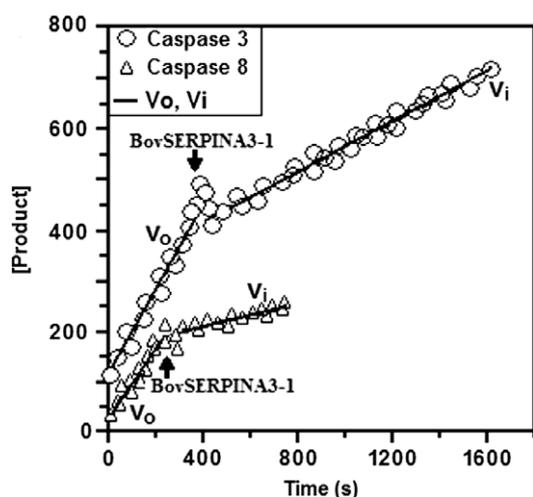
second site becomes unable to bind small substrates molecules is however unclear. Two possible reasons can be put forward: (a) the second active site is compressed to the core serpin and inaccessible or (b) an important distortion of the second site resulting from the global distortion of the tetrameric enzyme renders it unable to bind substrates. The 100–110 kDa complex observed upon SDS–PAGE results probably from the dissociation of the tetrameric caspase into its moieties during the heat denaturation process in the presence of SDS.

Interestingly, a similar  $E/I$  inhibition ratio was noted for bovSERPINA3-3 interaction with both caspase 3 and 8, suggesting a similar mechanism with the final detection of a 100–110 kDa complex upon SDS–PAGE. It is however evident that the behavior of the caspase tetrameric structure upon interaction with bovSERPINA3s might differ from that reported for CrmA and calls for further clarification and detailed investigations.

### 3.3. Association rate constants

Besides the SI, another important parameter is the association rate constant ( $k_{\text{ass}}$ ) characterizing the inhibition of caspases 3 and 8 by bovSERPINA3-1 and A3-3 which was determined by the progress curve method. The rate of substrate hydrolysis in the absence ( $V_o$ ) and in the presence ( $V_i$ ) of inhibitor was monitored continuously (Fig. 3). Values of  $V_i$  and  $V_o$  were used for the determination of the equilibrium constant  $K_i$  [16]. On the other hand and as illustrated in detail with an example in the Supplementary data, the fluorescence values obtained in the presence of inhibitor were then used to calculate  $\ln([P]_{(t+dt)} - [P]_t)$  and the results plotted versus time. From this plot, we deduced  $k_{\text{obs}}$  values (slope value) for each inhibitor concentration tested. The plot of  $k_{\text{obs}}$  versus inhibitor concentrations gave a straight line from which  $k_{\text{ass}}$  can be derived from the slope which is equal to  $k_{\text{ass}}/(1 + S/K_m)$  [16]. For caspase 8, we always take care that the incubation length was lower than 1000 s since after 1200 s the enzyme hydrolytic activity tends to decrease.

According to the  $k_{\text{ass}}$  values depicted in Table 2 and ranging between  $1.55 \times 10^5$  and  $2.72 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , bovSERPINA3-1 and A3-



**Fig. 3.** Progress curve analysis of the inhibition of caspases 3 and 8 by bovSERPINA3-1. Enzymes were added to assay buffer, containing 100  $\mu\text{M}$  substrates, to a final concentration of 1 and 3.5 nM for caspases 3 and 8, respectively. After about 400 s for caspase 3 and 200 s for caspase 8 which is less stable, bovSERPINA3-1 (5  $\mu\text{L}$ ) was added and product formation was followed as a function of time. The total volume of the reaction mixture was 500  $\mu\text{L}$ . Abbreviations used: RF, relative fluorescence corresponding to the amount of product released;  $V_o$ , rate of substrate hydrolysis in the absence of inhibitor;  $V_i$ , rate of substrate hydrolysis in the presence of inhibitor; arrows indicate the time at which the inhibitor was added.

**Table 2**

Association rate constants for the inhibition of caspases 3 and 8 by bovSERPINA3-1 and A3-3. Each value is the mean  $\pm$  S.D. for five independent determinations. Details of the method are given in the Supplementary data.

	$k_{\text{ass}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	
	Caspase 3	Caspase 8
Muscular bovSERPINA3-1	$(4.23 \pm 3.0) \times 10^5$	$(1.40 \pm 2.0) \times 10^6$
Muscular bovSERPINA3-3	$(1.55 \pm 1.7) \times 10^5$	$(2.72 \pm 1.9) \times 10^6$

3 are, undoubtedly, strong inhibitors of caspases 3 and 8. The biological significance of these *in vitro* findings calls however for further *in situ* investigations.

### 3.4. Potential scissile bonds within the bovSERPINA3s RCL

The length of the RCL, directly related to the inhibition mechanism, is essential for the serpin to efficiently inhibit their target protease. Although there are few documented exceptions, the length up to the scissile bond was almost always 17 residues which reduced extensively the potential P1 residue identity for inhibition of their target protease [4]. According to the RCL sequences of bovSERPINA3-1 and A3-3 aligned in Fig. 4a, it has been established that trypsin cleaved the serpin after Arg<sup>16</sup> residue [6].

With regard to caspases 3 and 8, the question arising is what are their P1 target residues? The term caspase is an acronym of cysteinyl-aspartate-cleaving protease in reference with their strict cleavage specificity after Asp residues. Within the carboxy-terminal RCL sequences of bovSERPINA3-1 and A3-3 (Fig. 4a), there is only one Asp residue located at position 37 from the beginning of the loop. To fulfill the above rule, the scissile bond would be located around the 17th residue. In that case, it should be accepted that caspases can cleave after other residues than Asp, a property that has never been demonstrated.

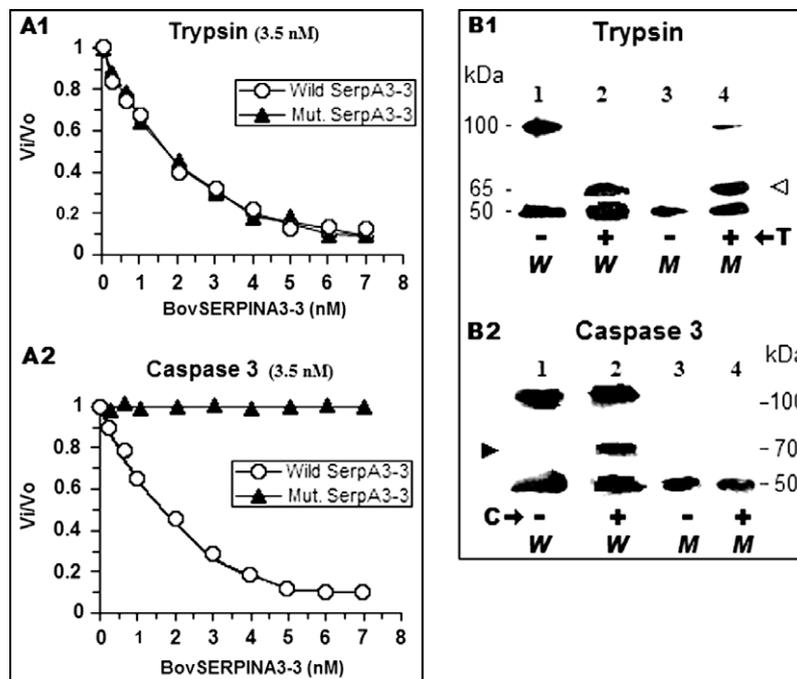
Preliminary analysis of the N-terminal sequence of the C-terminal peptide generated after the acyl-enzyme formation provided N-terminal sequences for that peptide suggesting that the scissile bond is Asp<sup>37</sup>-Thr<sup>38</sup> (N-terminal peptide sequences for both caspases: TQSIIFL...). To test this assumption, Asp<sup>37</sup> residue of recombinant bovSERPINA3-3 was substituted to Ala<sup>37</sup> by site-directed mutagenesis and the activity of both mutated (M-D37/A37) and wild-type (WT) proteins was tested against both trypsin and caspase 3. According to Fig. 5A1, trypsin is similarly inhibited by the recombinant WT and the M-D37/A37 bovSERPINA3-3. As expected, both WT (Fig. 5B1, lane 2) and M-D37/A37 bovSERPINA3-3 (Fig. 5B1, lane 4) formed a SDS-stable complex with trypsin. In addition, the association rates with trypsin are similar for both recombinant WT and mutated bovSERPINA3-3 (Table 3). Moreover these association rate constants are comparable to that obtained for the purified muscular bovSERPINA3-3 (Table 3).

By contrast, no inhibition of caspase 3 was observed with the recombinant M-D37/A37 bovSERPINA3-3 as compared to the wild-type protein (Fig. 5A2). It is worthy to note that the association rate of the recombinant WT bovSERPINA3-3 ( $9.04 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) is similar to the value obtained with the purified serpin ( $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Moreover, while the WT bovSERPINA3-3 formed a SDS-stable complex with caspase 3 (Fig. 5B2, lane 2), the mutated form which lost its ability to inhibit caspase 3 was also unable to form a SDS-stable complex with this protease (Fig. 5B2, lane 4). Taken together, these results strongly suggested that Asp<sup>37</sup> is the P1 residue targeted by caspases 3 and 8.

The present findings are in total contradiction with the RCL length invariance of serpins established with various monomeric targeted serine proteases. Caspases are cysteine proteases and whether the rule can be different for serpin interaction with cysteine proteases is questionable. From what we actually know,

	10	20	30	40	50
<b>a</b>					
bovSERPINA3-1	EEGTEGAAAT	GISMERTILR	IIVRVNRPFLL	IAIVLKDTQS	IIFLKGVTNP SEA
bovSERPINA3-3	EEGTEGAAAT	GIGIERTFLLR	IIVRVNRPFLL	IADVLDITQS	IIFLKGVTNP SEA
<b>b</b>					
bovSERPINA3-2	EEGTEGVAAT	GIGIERTFLLR	IIVRVNRPFLL	IADVLDITQS	IIFLKGVTNP SEA
bovSERPINA3-4	EEGTEGAAAT	GIGIERTFLLR	IIVRVNRPFLL	IADVLDITQS	IIFLKGVTNP SEA
bovSERPINA3-5	EEGTEGAAAT	GIGIERTFLLR	IIVRVNRPFLL	IADVLDITQS	IIFLKGVTNP SEA
bovSERPINA3-6	EEGTEGAAAT	GIGIERTFLLR	IIVRVNRPFLL	IADVLDITQS	IIFLKGVTNP SEA
<b>c</b>					
bovSERPINA3-7	EEGTEGAAVT	AVVMATSSLL	HTLTVSFNRP	FLLSIFCKET	QSIIFLKGVT NPKEA
bovSERPINA3-8	EEGTEGAAAT	GKVGITSIN	NHIPLSFNRP	FLIAIVLKIT	QSIIFLKGVT NPSQA

**Fig. 4.** Alignment of RCL sequences of members of the bovSERPINA3s family. (a) RCL sequence of bovSERPINA3-1 and A3-3 used throughout this study. (b) RCL sequence of the other endopin 1 related bovSERPINA3s. (c) RCL sequence of the endopin 2 related bovSERPINA3-7 and A3-8. Residue in white bold on black background indicate P1 residues for trypsin (Arg<sup>16</sup>) and putative P1 residue for caspases 3 and 8 (Asp<sup>37</sup> for A3-1 to A3-6; Glu<sup>39</sup> and Asp<sup>39</sup> for A3-7 and A3-8).



**Fig. 5.** (A) Capacities of recombinant WT and Asp<sup>37</sup>/Ala<sup>37</sup> bovSERPINA3-3 mutant to inhibit trypsin (A1) and caspase 3 (A2). (B) BovSERPINA3-3 complexes with trypsin (B1) and caspase 3 (B2). (B1) Western blot analysis of a mixture of trypsin (T) incubated with either WT bovSERPINA3-3 [W (lane 2) + T] and Asp<sup>37</sup>/Ala<sup>37</sup> mutated bovSERPINA3-3 [M (lane 4) + T] (inhibitor/protease ratio: 10/1) as compared to the control samples [W (lane 1) or M (lane 3) – T] where the enzyme was omitted. Both Wild and mutated isoforms exhibited a complex with trypsin (open arrow head). (B2) Western blot analysis of a mixture of human caspase 3 (C) incubated with either WT bovSERPINA3-3 [W (lane 2) + C] and Asp<sup>37</sup>/Ala<sup>37</sup> mutated bovSERPINA3-3 [M (lane 4) + C] (inhibitor/protease ratio: 10/1) as compared to the control samples [W (lane 1) or M (lane 3) – C] where the enzyme was omitted. Whereas a SDS-stable complex of caspase 3 with the wild serpin (lane 2) was observed, no complex was detected with the mutated serpin (lane 4) which lost its ability to inhibit caspase 3 (A2). All westerns were revealed with mEndo-Ab antibody. *Abbreviations used:* WT, wild-type bovSERPINA3-3; Asp<sup>37</sup>/Ala<sup>37</sup> mutated bovSERPINA3-3; W, wild serpin; M, mutated serpin; T, trypsin; C, caspase 3.

**Table 3**

Association rate constants of recombinant wild-type (WT) and Asp<sup>37</sup>/Ala<sup>37</sup> mutated bovSERPINA3-3 with trypsin and human recombinant caspase 3. Comparison with association rate obtained with the bovSERPINA3-3 purified from bovine muscle (muscular bovSERPINA3-3).

	$k_{ass} (M^{-1} s^{-1})$	
	Trypsin	Caspase 3
Muscular bovSERPINA3-3	$0.67 \times 10^6$	$1.55 \times 10^5$
Recombinant WT bovSERPINA3-3	$1.87 \times 10^6$	$9.04 \times 10^5$
Recombinant Asp <sup>37</sup> /Ala <sup>37</sup> bovSERPINA3-3	$0.78 \times 10^6$	No inhibition

caspases are not able to cleave peptide bonds after other residues than Asp. Hence, no other cleavage site can be found in the RCL sequences of bovSERPINA3-1 and A3-3 suggesting that the cleaved bond is Asp<sup>37</sup>-Thr<sup>38</sup>. However, clarification of this unusual finding

calls for more detailed investigations and, hopefully, for future X-ray analysis of the tertiary structure of the free serpin and of the complex with caspases.

### 3.5. RCL similarities of bovSERPINA3s

According to recent findings, bovSERPINA3-1 and A3-3 are members of a family comprising at least eight genes located within the same cluster at bovine chromosome 21q24 and encoding closely related serpins [12]. Hopping to identify other members of bovSERPINA3 family potentially able to inhibit trypsin and/or caspases, the C-terminal RCL sequences of the all members of this family were aligned and compared (Fig. 4a–c).

From the comparative analysis of the mature proteins sequences, two subgroups can be distinguished within the bovSERPINA3s family, on the basis of their homology with endopins 1 and

2. The first one comprising bovSERPINA3-1 to A3-6 showed highest homology with endopin 1-like serpins whereas the second encompassing bovSERPINA3-7 and A3-8 exhibited a greater homology with Endopin 2-like serpins (Endopins 2A/2B/2C) [6,22,23]. Within their RCL sequences, bovSERPINA3-1 to A3-6 exhibited an Arg residue at position 16 and an Asp residue at position 37 (Fig. 4a and b). All these serpins would therefore inhibit caspases and trypsin. The two last members of this cluster, bovSERPINA3-7 and bovSERPINA3-8, very divergent in the C-terminal sequences, have no Arg residue in the region of concern and will not inhibit trypsin, an assumption agreeing well with the conclusion of Hwang and collaborators [22] emphasizing that Endopin 2, corresponding to bovSERPINA3-7, did not inhibit trypsin.

In bovSERPINA3-8 and A-3-7, an Asp residue and a Glu residue, respectively, were noticed at position 39 (Fig. 4c). While we could expect that bovSERPINA3-8 might be able to inactivate efficiently caspases (Asp at position 39) but not trypsin, bovSERPINA3-7 will probably be unable to inhibit caspases and, if some inhibition could be detected, the inhibitory activity will be no more efficient than PI9 a serpin exhibiting a Glu residue at P1 position and considered as a poor inhibitor of caspases as compared to the cowpox CrmA which has an Asp residue at the P1 position [10].

In conclusion, the present work identified two serpins able to inhibit strongly initiator and effector caspases and to form SDS-stable complexes with both groups of caspases, a feature never observed with CrmA [9]. The mechanisms involved might be different from those reported for CrmA but have in common the trapping of the enzyme by the serpins. These serpins are widely distributed in mammalian tissue and cells and belong to a family presenting a surprising degree of compensation and redundancy which can be compared to that often emphasized concerning the caspase family [18]. This will obviously complicate the assessment of their respective biological role in living tissues and cells. Another question arising is the biological significance of the existence of two subgroups within the bovSERPINA3 family comparable to the two major subgroups of caspases, i.e. the inflammatory and the apoptotic subfamilies. Such assumption is supported by the fact that members of the second subgroup, i.e. bovSERPINA3-7 and A3-8, are unable to inhibit trypsin but are strong inhibitor of elastase [23], a protease playing a central role in inflammatory processes [24].

Besides highly specialized and restricted functions in living cells [25], for this group of SERPINA3-like, future investigations must be preferably focused on a more general role in processes common to all mammalian tissues and cells, and, in this context, apoptosis and inflammatory processes are probably the first to be considered.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2009.07.055.

## References

- [1] Potempa, J., Korzus, E. and Travis, J. (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 269, 15957–15960.
- [2] Patterson, S.D. (1991) Mammalian  $\alpha$ 1-antichymotrypsins: comparative biochemistry and genetics of the major plasma serpin. *Comp. Biochem. Physiol. B. – Comp. Biochem.* 100, 439–454.
- [3] Davies, M.J. and Lomas, D.A. (2008) The molecular aetiology of the serpinopathies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1273–1286.
- [4] Gettins, P.G.W. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* 102, 4751–4803.
- [5] Hook, V.Y.H., Purviance, R.T., Azaryan, A.V., Hubbard, G. and Krieger, T.J. (1993) Purification and characterization of alpha 1-antichymotrypsin-like protease inhibitor that regulates prohormone thiol protease involved in enkephalin precursor processing. *J. Biol. Chem.* 268, 20570–20577.
- [6] Hwang, S.-R., Steineckert, B., Yasothornsrikul, S., Sei, C.A., Toneff, T., Rattan, J. and Hook, V.Y.H. (1999) Molecular cloning of endopin 1, a novel serpin localized to neurosecretory vesicles of chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 274, 34164–34173.
- [7] Hwang, S.-R., Garza, C.Z., Wegrzyn, J.L. and Hook, V.Y.H. (2005) Demonstration of GTG as an alternative initiation codon for the serpin endopin 2B-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 837–844.
- [8] Stennicke, H.R., Ryan, C.A. and Salvesen, G.S. (2002) Reprival from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem. Sci.* 27, 94–101.
- [9] Dobo, J., Swanson, R., Salvesen, G.S., Olson, S.T. and Gettins, P.G.W. (2006) Cytokine response modifier A inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *J. Biol. Chem.* 281, 38781–38790.
- [10] Annand, R.R., Dahlen, J.R., Sprecher, C.A., de Deu, P., Foster, D.C., Mankovich, J.A., Talanian, R.V., Kisiel, W. and Giegel, D. (1999) Caspase-1 (interleukin-1beta-converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochem. J.* 342, 655–665.
- [11] Bird, C.H., Sutton, V.R., Sun, J., Hirst, C.E., Novak, A., Kumar, S., Trapani, J.A. and Bird, P.I. (1998) Selective regulation of apoptosis: The cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol. Cell Biol.* 18, 6387–6398.
- [12] Pélissier, P., Delourme, D., Germot, A., Blanchet, X., Becila, S., Maftah, A., Leveziel, H., Ouali, A. and Brémaud, L. (2008) An original *SERPINA3* gene cluster: Elucidation of genomic organization and gene expression in the *Bos taurus* 21q24 region. *BMC genomics* 9, 151–165.
- [13] Tassy, C., Herrera-Mendez, C.H., Sentandreu, M.A., Aubry, L., Brémaud, L., Pélissier, P., Delourme, D., Brillard, M., Gauthier, F., Levéziel, H. and Ouali, A. (2005) Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin which strongly inhibits elastase: purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. *Biochem. J.* 388, 273–280.
- [14] Herrera-Mendez, C.H., Brémaud, L., Coulis, G., Pélissier, P., Sentandreu, M.A., Aubry, L., Delourme, D., Chambon, C., Maftah, A., Levéziel, H. and Ouali, A. (2006) Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. *FEBS Lett.* 580, 3477–3484.
- [15] Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (1999) Caspases: preparation and characterization. *Methods* 17, 313–319.
- [16] Komiyama, T.S., Ray, C.A., Pickup, D.J., Howard, A.D., Thornberry, N.A., Peterson, E.P. and Salvesen, G. (1994) Inhibition of interleukin-1P converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA: an example of cross-class inhibition. *J. Biol. Chem.* 269, 19331–19337.
- [17] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [18] Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G.S. (2004) The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem. J.* 384, 201–232.
- [19] Taylor, R.C., Cullen, S.P. and Martin, S.J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–241.
- [20] Schechter, N.M. and Plotnick, M.I. (2004) Measurement of the kinetic parameters mediating protease-serpin inhibition. *Methods* 32, 159–168.
- [21] Swanson, R., Raghavendra, M.P., Zhang, W., Froelich, C., Gettins, P.G. and Olson, S.T. (2007) Serine and cysteine proteases are translocated to similar extents upon formation of covalent complexes with serpins. Fluorescence perturbation and fluorescence resonance energy transfer mapping of the protease binding site in CrmA complexes with granzyme B and caspase-1. *J. Biol. Chem.* 282, 2305–2313.
- [22] Hwang, S.-R., Steineckert, B., Toneff, T., Bunday, R., Logvinova, A.V., Goldsmith, P. and Hook, V.Y.H. (2002) The novel serpin endopin 2 demonstrates cross-class inhibition of papain and elastase: localization of endopin 2 to regulated secretory vesicles of neuroendocrine chromaffin cells. *Biochemistry* 41, 10397–10405.
- [23] Hwang, S.-R., Stoka, V., Turk, V. and Hook, V. (2006) Resistance of cathepsin L compared to elastase to proteolysis when complexed with the serpin endopin 2C, and recovery of cathepsin L activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1238–1243.
- [24] Mania-Pramanik, J., Potdar, S.S., Vadigoppula, A. and Sawant, S. (2004) Elastase: a predictive marker of inflammation and/or infection. *J. Clin. Lab. Anal.* 18, 153–158.
- [25] Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J. and Hwang, S.R. (2008) Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 393–423.