

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université MENTOURI – Constantine –
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES
TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
I.N.A.T.A.A.

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

Discipline : Sciences Alimentaires

Présenté par :

BOUDJELLAL ABDELGHANI

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de doctorat d'Etat

Titre

A la recherche de marqueurs biologiques de la qualité de la viande : caractérisation de la maturation et enquête auprès des professionnels

Soutenue le 16 Décembre 2007 devant le jury composé de :

Président :	BENASRI Mourad	- SNV – Université Mentouri
Rapporteur :	AIT AMAR Hamid	- USTHB Alger
Examineurs :	AGLI Abdelnacer	- INATAA – Université Mentouri
	DAMEZ Jean Louis	- INRA de Theix Clermont-Ferrand
	OUALI Ahmed	- INRA de Theix Clermont-Ferrand
	ZIDOUNE Mohamed Nasreddine	- INATAA – Université Mentouri

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1. Le muscle strié

-1. LA FIBRE MUSCULAIRE.....	07
-1.1. Les différents types de fibres musculaires	08
-1.2. La relation entre le type de fibre musculaire et la qualité de la viande.....	10
-2. LE SARCOLEMME.....	12
-3. LE SARCOPLASME.....	13
-4. LES MYOFIBRILLES.....	13
-5. LES PROTEINES MUSCULAIRES	15
-5.1. Les protéines sarcoplasmiques.....	15
-5.2. Les protéines myofibrillaires.....	15
-5.2.1. Protéines contractiles	15
-5.2.2. Protéines régulatrices principales	17
-5.2.3. Protéines du cytosquelette.....	20
-6. LE TISSU CONJONCTIF	26
-6.1. Le collagène.	27
-6.2. L'élastine	29
-6.3. Les Protéoglycanes	29

2. Transformation du muscle en viande.....31

2-1. SCHEMA GENERAL	31
2-2. LA SAIGNEE.....	31
2-3. INSTALLATION DE LA RIGIDITE CADAVERIQUE.....	32
2-3.1. Description du phénomène	32

3. Mécanismes impliqués dans le processus de maturation.....33

3.1. TENSION ET RACCOURCISSEMENT	34
3.2. EVOLUTION DE L'OSMOLARITE	35
3.3. MODIFICATION DE L'ESPACE INTRAMYOFIBRILLAIRE	35
3.4. MODIFICATION DE L'ESPACE EXTRACELLULAIRE.....	35
3.5. EVOLUTION DU POUVOIR DE RETENTION D'EAU.....	36
3.6. LA MATURATION	36
3.6.1. Modifications physiques	36
3.6.2. Transformations biochimiques.....	37
3.6.3. Modifications structurales.....	38
3.6.3.1. Evolution des protéines	38

4- Attendrissement de la viande et mécanismes impliqués dans le processus de maturation.....42

4-1. MECANISMES PHYSICO-CHIMIQUES	43
4-1.1. La température	43
4-1.2. Le pH	43
4-1.3. La pression osmotique	45
4-2. MECANISMES ENZYMATIQUES.....	46
5- Protéases dans le contexte de la viande.....	46
5-1. GENERALITES SUR LES PROTEASES.....	47
5-2. LES EXOPROTEASES ET LES ENDOPROTEASES SUSCEPTIBLES D'INTERVENIR DANS L'ATTENDRISSAGE.....	48
5-2.1. Les exoprotéases (peptidases)	48
5-2.2. Les endoprotéases (protéinases)	50
5-2.2.1. Les protéinases à sérine (EC 3.4.21)	51
5-2.2. 2. Les protéinases qui ne sont pas à sérine.....	54
5-2.3. Le protéasome.....	63
5-2.4. Cas particulier des caspases (protéases à cystéine de l'apoptose)	64
6- Les Inhibiteurs endogènes des protéases et la science de la viande.....	75
6-1. GENERALITES SUR LES INHIBITEURS.....	76
6-2. INHIBITEURS DE PROTEASES A SERINE (SERPINES)	77
6-3. AUTRES INHIBITEURS DE PROTEASES	82
6-3.1. La Calpastatine	82
6-3. 2. Les inhibiteurs de protéases à cystéine	84
6-3.3. Les inhibiteurs de métalloprotéases et de protéases acides	85

MATERIEL ET METHODES

1- INTRODUCTION.....	87
2- PRINCIPES DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	87
3- MATERIEL BIOLOGIQUE	88
3- 1. BOVIN.....	88
3- 1. 1. CARACTERISTIQUES DES ANIMAUX.....	88
3- 1. 2. PLAN EXPERIMENTAL	89
3- 1. 3. METHODES PHYSICO-CHIMIQUE.....	89
3- 1. 4. MESURES MECANIQUES.....	91
3- 2. OVINS.....	92
3- 2. 1. CARACTERISTIQUES DES ANIMAUX	92

3- 2. 2. PLAN EXPERIMENTAL	93
3- 2. 3. METHODES PHYSICO-CHIMIQUE.....	94
3- 2. 4. MESURES MECANIQUES (Estimation de la dureté par le pénétromètre).....	99
3- 2. 5. APPRECIATION DE LA TENDRETE PAR ANALYSE SENSORIELLE.....	100
4- ANALYSE DES DONNEES.....	101

RESULTATS ET DISCUSSION

Préambule.....	105
CHAPITRE I	
Développement d'une méthode physique d'estimation de la tendreté de la viande d'agneau	106
CHAPITRE II	
Paramètres physicochimiques et qualité de la viande bovine.....	117
<u>1. Evolution des paramètres physicochimiques</u>	
1.1. Le pH.....	
1.1.1. Profil de chute du pH et qualité de la viande bovine	118
1.1.2. Analyse de profils de chute de pH en relation avec la tendreté ultime de la viande.....	118
1.1.3. Profil de chute de pH dans différents muscles d'agneau	143
<u>2. La pression osmotique.....</u>	144
CHAPITRE III	
Caractérisation de la maturation de la viande d'agneau.....	146
CHAPITRE IV	
Maturation des viandes: Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes.....	160
CHAPITRE V	
Forces et faiblesses de la filière viande en Algérie. Résultats préliminaires d'une enquête qui a porté sur plus de 500 professionnels.....	184
<u>1. Filière viande</u>	185
<i>1.1. FACTEUR HYGIENIQUE</i>	185

1.1.1. Etapes nécessitant une surveillance	185
1.1.1.1. Transport et stabulation.....	185
1.1.1.2. Abattage.....	185
1.1.2. Microbiologie de la viande.....	186
1.1.2.1. Origine des contaminations.....	187
1.1.2.2. Espèces microbiennes rencontrées dans la viande.....	187
1.1.2.3. Altérations dues aux microorganismes.....	188
1.1.2.4. Contaminations par les germes pathogènes.....	188
1.2. Facteur satisfaction du consommateur : la couleur.....	189
<u>2. Enquête</u>	190
2.1. ANALYSES DES REPONSES.....	190
2.1.1. Endroit d’approvisionnement.....	191
2.1.2. Critères d’achat des animaux.....	192
2.1.3. Distance entre le lieu d’abattage et le lieu d’approvisionnement.....	192
2.1.4. Transport des animaux.....	192
2.1.5. Stabulation.....	192
2.1.6. Inspection <i>ante mortem</i>	193
2.1.7. Abattage à l’abattoir ou non.....	193
2.1.8. Inspection <i>post mortem</i>	194
2.1.9. Douche des carcasses.....	194
2.1.10. Transport des carcasses.....	195
2.1.11. Estampillage.....	195
2.1.12. Ressuyage.....	195
2.1.13. Qualités organoleptiques de la viande.....	196
2.1.14. Attendrissage de la viande.....	196
2.1.15. Age des bouchers.....	197
2.1.16. Apprentissage du métier.....	197
2.1.17. Etat de propreté de la boucherie.....	198
2.1.18. Etat de propreté du personnel.....	199
2.1.19. Equipement en froid des boucheries.....	199
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	200
Références bibliographiques	201

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du muscle strié

Figure 2 : La fibre musculaire

Figure 3 : Structure d'une myofibrille et d'un sarcomère

Figure 4: Protéines du cytosquelette (d'après Carlson et Thornell, 2001)

Figure 5 Organisation des costamères (d'après Thornell et Price, 1991)

Figure 6 Le collagène (d'après Passerieux *et al.*, 2006)

Figure 7 Etapes successives de la transformation du muscle en viande

Figure 8 : Dégradation du tissu conjonctif (d'après Nishimura *et al.*, 1996)

Figure 9 : Schéma d'évolution de la dureté du muscle pendant la phase de conservation à l'état réfrigéré (d'après Ouali, 1990)

Figure 10 : 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)

Figure 11 Structure schématique des différentes calpaïnes exprimées dans le muscle squelettique et leur inhibiteur spécifique la calpastatine (d'après Sentandreu *et al.*, 2002)

Figure 12 : Représentation schématique de la cellule de compression avec un échantillon de viande dans la configuration longitudinale (d'après Lepetit et Buffière, 1995)

Figure 16: Profil d'évolution postmortem, de la dureté du muscle *Rectus femoris* d'agneau estimée par pénétrométrie. Chaque point est la moyenne (\pm écart type) pour 10 animaux différents

Figure 17 : Evolution *post mortem* du pH des muscles *longissimus (L) triceps brachii caput longum (TB) et supraspinatus (SS)* de bovin conservé à l'état réfrigéré (OUALI 1990). Le premier point expérimental correspond au temps 2h postmortem.

Figure 18: Profil d'évolution du pH des muscles *longissimus (L) triceps brachii caput longum (TB) et supraspinatus (SS)* de bovin incluant la valeur physiologique initiale. L'insert présente le profil pour les 8 premières heures postmortem et met plus en évidence les plateaux

Figure 13. Courbe moyenne d'étalonnage

Figure 14. Spécimen de formulaire de réponse pour le test de notation

Figure 15. Détermination de la valeur finale, la vitesse et l'amplitude d'évolution des paramètres

Figure 19: Profil d'évolution du pH dans le muscle *longissimus (L)* de bovin. Les animaux, tous de race charolaise; étaient des mâles de 19 mois (M_Ch_19M-1 et -2) et d'une femelle de 54 mois (F_Ch_54M)

Figure 20: Proportion d'animaux (n=153) présentant ou non une discontinuité du profil de chute de pH estimé par mesure des différences entre deux valeurs consécutives. .

Figure 21 : Profil de chute du pH de cinq muscles différents d'agneau incluant les muscles *Semimembranosus (SM)*, *Biceps femoris (BF)*, *Rectus femoris (RF)*, *Longissimus lombarum (Ll)* and *Longissimus thoracis (Lt)*.

Figure 22: Evolution symétrique du pH et de la pression osmotique dans le muscle *Longissimus* de bovin

Figure 23: Dureté ultime du muscle *Longissimus* de bovin présentant 1 ou 2 plateaux dans le profil d'évolution de la pression osmotique. Les valeurs indiquées sont les moyennes (\pm SD) pour 23 (1 plateau) et 21 (2 plateaux) animaux.

Figure 24 : Distribution des sujets selon l'endroit d'approvisionnements en animaux (N=838)

Figure 25 : Distribution des sujets selon les critères d'achat des animaux

Figure 26 Répartition des sujets selon qu'ils pratiquent la stabulation ou non

Figure 27 inspection *an mortem*

Figure 28 Lieu d'abattage (N = 816)

Figure 29 Inspection post mortem (N = 816)

Figure 30 Pourcentage de bouchers qui douchent les carcasses (N = 816)

Figure 31 Observation de l'estampillage (N = 816)

Figure 32 critères d'appréciation de la qualité organoleptique de la viande (N=607)

Figure 33 Connaissance du terme : attendrissage (N = 381)

Figure 34 Répartition des bouchers par tranche d'âge

Figure 35 Apprentissage du métier (N = 814)

Figure 36 Etat de propreté de la boucherie (N = 814)

Figure 37 Etat de propreté du personnel (n = 716)

Figure 38 Equipement en froid des boucheries (N = 650)

Listes des tableaux

Tableau 1 : Evolution du cheptel de 1970 à 1999 en Algérie (millions de têtes)

(ONS et ministère de l'agriculture, 1999)

Tableau 2 : Composition chimique du muscle squelettique adulte, en pourcentage du poids frais (LAWRIE 1975)

Tableau 3 : Caractéristiques des types de fibres (+, bas; ++, moyen; +++, haut).

(Adaptation de Lefaucheur et Gérard, 2000)

Tableau 4 : Répartition des animaux par âge, race et sexe

Tableau 5. Caractéristiques des animaux

Tableau 7. Conductivité des blancs (N =70)

Tableau 6. Paramètres des différentes fonctions d'étalonnages, (N = 10)

Introduction

La valeur affective des viandes est très grande et l'engouement éprouvé pour elles, par l'homme est biologiquement justifié. En effet, la consommation des viandes procure un sentiment de bien être qui se traduit par une sensation agréable de chaleur, de vigueur, de bonne humeur et de vitalité. Les impressions émotionnelles apportées par les viandes sont dues à leur multiples actions sur les effecteurs qui déclenchent et qui règlent le bon développement de la digestion (stimulation de l'appétit, des sécrétions digestives et des glandes endocrines).

Ce sont certainement ces motivations qui ont d'abord motivé l'homme à chasser, puis l'ont intuitivement poussé à domestiquer les animaux et à instituer les élevages.

Staron définit la viande comme étant : « la chaire des animaux dont on a coutume de se nourrir. Dans ce vocabulaire on inclut la chaire des mammifères, des oiseaux et quelque fois des poissons »

Les animaux producteurs de viande sont ceux de boucherie, les animaux de basse-cour et les gibiers. La viande est un aliment de grande valeur nutritionnelle par sa richesse en protéines (de 20 à 30 % selon les types de viandes) et surtout par le fait qu'elle apporte des acides aminés essentiels, ceux que l'organisme humain est incapable de synthétiser. La viande rouge est également une source importante de fer et de vitamines du groupe B, notamment la vitamine B12 antianémique.

La consommation de viande est soumise à un certain nombre de tabous et interdits culturels et religieux. Ainsi, la consommation du porc est prohibée dans l'islam et le judaïsme. Des règles d'abattage existent pour ces deux religions, halal pour la première et cacheroute pour la seconde. Le bœuf est sacré chez les Hindous et, à ce titre, non consommé. L'hippophagie a été interdite par l'église catholique pendant des siècles et aujourd'hui encore, la consommation de viande de cheval est controversée mais dans tous les cas peu consommée.

Si dans les pays dits industrialisés, la production est devenue suffisante et couvre largement les besoins, ce n'est pas encore le cas pour les pays en voie de développement. Les premiers sont aujourd'hui plus exigeants en termes de qualité des viandes qui, pour la plupart, ne sont pas maîtrisés mais tous ont valorisés au mieux leurs productions (races à viande pour les bovins, races rustiques pour les ovins, etc.). Pour les pays en voie de développement, on en

est à augmenter la production pour répondre à la demande des consommateurs. Toutefois et compte tenu de la mondialisation, les races de valeur tendent à être expropriées et réutilisées par d'autres pays sans aucun avantage pour le pays producteur qui disposait de ces races. On assiste, donc, à une fuite passive de ces richesses. Pour ces pays comme l'Algérie, il leur faudra non seulement augmenter la production et sauvegarder les races, mais également améliorer la qualité des viandes, le terme qualité recouvrant ici toute la chaîne de production, de l'éleveur au consommateur.

Parmi les qualités organoleptiques de la viande, la tendreté reste la qualité la plus recherchée par le consommateur. Lorsque la viande est dure, on n'est pas enclin à apprécier ni sa jutosité ni sa saveur. Pour atteindre cet objectif, il faudra mettre en place tous les outils nécessaires à l'appréciation des qualités de la viande (couleur, jutosité, saveur, qualités microbiologiques, etc.). Il est bien sûr évident que la première des qualités à mettre en place est la qualité hygiénique qui, aujourd'hui, souffre principalement de l'absence d'une chaîne de froid fiable entre l'abatteur et le consommateur.

Concernant la tendreté de la viande, le principal problème rencontré dépend de sa grande variabilité. En effet, cette qualité est bien évidemment influencée par certains facteurs tels que la génétique, l'alimentation et le mode d'élevage, mais aussi par des facteurs musculaires encore très mal connus qui font que, même chez des animaux élevés dans les mêmes conditions (même alimentation, même âge, même race, mêmes conditions de croissance etc), on assiste à une variabilité individuelle de la qualité qui reste aujourd'hui encore inexplicée. Ce fait explique que de nombreuses recherches sur les marqueurs biologiques de la tendreté de la viande sont menées un peu partout dans le monde, et cela nous concerne aussi. Dans ce cadre nous devons mettre en place des groupes de travail en mesure de participer à l'acquisition et au développement de nouvelles connaissances dans ce domaine.

La couleur de la viande, peu prise en compte à ce jour dans les pays en voie de développement, deviendra essentielle dès lors que la viande sera distribuée dans les supermarchés comme c'est aujourd'hui la tendance. Il faudra alors que ces pays disposent des technologies développées dans les pays industrialisés et être capables de les mettre en œuvre. La couleur de la viande dépend de l'état d'oxydation du pigment, la myoglobine. Une myoglobine oxygénée ou non oxygénée donne respectivement une couleur rouge vif ou rouge sombre. Par contre, la myoglobine oxydée est à l'origine de la couleur brune rejetée par le

consommateur. Il s'agit donc d'un processus d'oxydation contre lequel il est possible de lutter en protégeant la viande contre l'oxygène par emballage sous vide ou par addition de capteurs d'oxygène dans les emballages transparents. Toutes ces technologies existent en Europe et sont actuellement mises en œuvre par certains distributeurs.

La synthèse bibliographique en rapport avec cette thèse, a pour but de présenter la situation de la production et la consommation de la viande dans le monde et en Algérie.

Une partie de cette étude sera consacrée au muscle strié, constituant principal de la viande, en nous penchant particulièrement sur les deux composants musculaires responsables de la tendreté de la viande : la structure contractile et la structure conjonctive.

Les différentes étapes de la transformation du muscle en viande seront abordées, à travers l'évolution de la tendreté de la viande, le processus d'attendrissage résultant de la déstructuration de la structure contractile, le tissu conjonctif ne subissant que très peu de modifications. Le taux et la qualité (degré de cross-linking) de collagène, principal constituant du tissu conjonctif, va permettre la distinction entre viande à rôtir ou à frire et viandes à bouillir. Dans ce dernier cas, la cuisson en atmosphère humide va transformer le collagène en gélatine, composé n'offrant plus de résistance mécanique.

Les mécanismes impliqués dans le processus d'attendrissage seront abordés en même temps que les différents facteurs responsables de la variabilité de la tendreté.

Enfin, seront abordées les méthodes de mesure de la tendreté de la viande.

Cette présentation bibliographique sera suivie d'un descriptif des méthodes utilisées pour la réalisation de cette étude puis par la présentation des résultats obtenus.

Approche économique

Jusqu'aux années 80, la viande de bœuf représentait la principale dépense alimentaire des ménages européens. La production mondiale des viandes a connu une augmentation très importante de 1955 à 1980. Elle est passée de 52 millions de tonnes à 140 millions de tonnes (Boumghar, 2000). Or, en 1996 la psychose de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), la maladie de « la vache folle » a eu des conséquences directes sur les marchés et les différentes filières du secteur des produits carnés. En 1999, la production mondiale de viande bovine a été évaluée à 58.7 millions de tonnes (Boumghar, 2000). La production mondiale ovine a été de 1010.8 millions de tête en 1997 (Dondonet, 1997).

En Algérie, la part de la production animale, dont l'indice global est de 51%, a progressé au rythme annuel de 4.59% durant la décennie 1986-1995. Ceci démontre les efforts fournis par l'Algérie pour accroître sa production de viande, notamment celles des viandes issues d'animaux à cycle court et plus précisément le poulet de chair. L'effectif du cheptel en Algérie est estimé à environ 24 millions de têtes (Tableau 1) dont 78% d'ovins (Abbas, 2000).

Tableau 1. Evolution du cheptel de 1970 à 1999 en Algérie (millions de têtes)
(ONS et ministère de l'agriculture, 1999)

Années	Espèces animales						Nb têtes
	Bovins	Ovins	Caprins	Chevaux	Autres équidés	Camelins	
1970	885	7.786	2.581	143	527	184	12.106
1975	1.002	9.773	2.269	154	624	155	13.977
1980	1.363	13.739	2.749	172	699	152	18.874
1985	1.416	15.660	2.688	91	486	133	20.474
1990	1.393	17.697	2.472	81	399	122	22.164
1995	1.267	17.302	2.780	62	305	126	21.842
1999	1.650	18.800	3.600	nd	nd	nd	24.050

* nd : non dénombré

Une enquête a été réalisée en 1999 par des étudiants de l'INATAA dans le but de connaître le circuit de commercialisation des viandes dans trois grandes villes de l'est algérien (Constantine, Jijel et Mila). Celle-ci a porté sur un échantillon de 150 sujets dont 32 sont des vendeurs à l'étal et 118 sont des boucheries, correspondant respectivement à 21.33% et 70.66% d'individus.

Les résultats de l'enquête montrent que la viande bovine et les abats sont les plus vendus (23.51 et 22.3%, respectivement) et à un degré moindre la viande ovine et les volailles (10.61 et 17.61%, respectivement) ; par contre, les quantités de viande de lapins et de cheval sont quasi négligeables (1.63 et 0.81%, respectivement), la viande caprine étant absente du marché.

La partie de la carcasse la plus demandée par le consommateur est la cuisse (38.52%) et à un degré moindre les côtes (25.75%). Par contre, la demande des rumstecks et du cou est négligeable (1.84 et 1.25%, respectivement).

La synthèse bibliographique suivante a pour objectif de cerner le processus de la maturation des viandes bovine et ovine.

1 - Le muscle strié

Les viandes se caractérisent par une grande hétérogénéité et leur composition est variable. Les deux composants principaux du muscle sont l'eau (75% du poids frais) et les protéines (18.5%). La quantité de lipides est variable (1.5 à 13.0%), avec une moyenne de 3%. Les glucides et leurs métabolites, les substances azotées non protéiques et les sels minéraux sont, pour leur part, présents à des proportions beaucoup plus faibles (de l'ordre de 1%) (Ashgar et Pearson, 1980).

La qualité organoleptique de la viande dépend de ces composants (Tableau 2). En effet, l'eau est à l'origine de la jutosité de la viande. L'eau et les sucres interviennent dans la saveur. La saveur de la viande provient des sucres et des lipides musculaires. La couleur de la viande est due principalement aux protéines solubles, en particulier la myoglobine.

La tendreté de la viande découle directement des protéines musculaires insolubles à faible force ionique. Elles sont réparties en 3 catégories : les protéines du stroma (16%), les protéines sarcoplasmiques (28%) et les protéines myofibrillaires (56%) (Ashgar et Pearson, 1980).

Tableau 2. Composition chimique du muscle squelettique adulte, en pourcentage du poids frais (LAWRIE 1975)

Eau	75.0
Protéines	19.0
• Myofibrilles	10.5
- Myosine	6.5
- Actine	2.5
- Tropomyosine	1.5
• Sarcoplasme	5.5
• Tissu conjonctif	2.05
• Organites	0.95
Lipides	2.5
Glucides	1.2
- Acide lactique	0.90
- Glucose 6 phosphate	0.15
- Glycogène	0.15
Substances solubles non protéiques	2.3
- Substances azotées	1.65
- Substances inorganiques	0.65
- Vitamines	Traces

Le muscle est l'organe ou le tissu qui permet, sous l'influence d'une stimulation, aux organismes de se mouvoir et de prendre des positions adaptées au mode de locomotion. Il est capable de contractions permettant les mouvements d'un organisme animal (Kinoshita, 1973).

On distingue généralement trois types de muscles :

- **Les muscles striés** (volontaire ou squelettique) qui représentent 30 à 40% du poids du corps d'un animal vivant (Lawrie, 1998). Ils assurent les mouvements du corps grâce à leur insertion sur les os.
- Les **muscles lisses**, qui sont responsables du mouvement de nombreux organes comme les artères, les veines, l'utérus, etc.
- Le **muscle cardiaque**, muscle strié en fonctionnement permanent pour assurer la circulation du sang et l'apport continu des nutriments et de l'oxygène aux tissus (Pearson, 1989).

Le muscle strié (Figure 1, Tableau 3) est constitué par la juxtaposition de cellules multinucléées, de forme allongée et dénommées communément : fibres musculaires. Dans le muscle, elles s'associent en faisceaux (Figure 2) définis par un premier niveau de tissu conjonctif ou périnysium, chaque fibre étant entourée par l'endomysium. Ces deux réseaux permettent une circulation des nerfs et des vaisseaux sanguins jusqu'à chacune des fibres musculaires. L'ensemble du tissu est recouvert d'une trame conjonctive externe ou épimysium. La principale protéine constitutive de ce tissu conjonctif est le collagène (Walls, 1960).

Tableau 3 : Caractéristiques des types de fibres (+, bas; ++, moyen; +++, haut).

(Adaptation de Lefaucheur et Gérard, 2000)

Type de fibre	Type I ou Rouge lente ou BR	Type IIB ou rouge rapide ou α R	Type IIA ou blanche rapide ou α W
Vitesse contraction	Lente	Rapide	Rapide
Couleur	Rouge	Rouge	Blanche
Type métabolique	Oxydative	Oxydo-glycolytique	Glycolytique
Type d'activité métabolique	Aérobie	Mixte	Anaérobie
Energie de stockage	Lipides	Lipides et Glucides	Glucides
Capacité oxydative (densité capillaire, densité mitochondriale, myoglobine)	+++	+++	+
Activité myosine-ATPase	+	++	+++
Capacité glycolytique	+	+++	+++
Capacité tampon	+	+++	+++
Résistance à la fatigue	+++	++	+
Production de force	+	++	+++
Strie Z (largeur)	+++	++	+
Diamètre	+	+++	+++

1-1. LA FIBRE MUSCULAIRE

La fibre ou cellule musculaire striée est l'unité structurale essentielle de tous les muscles squelettiques. Elle a une forme allongée pouvant mesurer jusqu'à 34 cm. De section plus ou moins circulaire de 10 à 100 μ m de diamètre (Kinoshita, 1973). C'est pour ces caractéristiques que le terme fibre musculaire est généralement utilisée pour désigner cette

cellule (Figure 2). La fibre musculaire est plurinucléée et une grande majorité de l'espace intracellulaire est occupé par les myofibrilles.

1-1.1. Les différents types de fibres musculaires

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 permettent 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.

Les fibres musculaires peuvent être classées selon leur couleur, leurs propriétés métaboliques ou leurs propriétés contractiles (Klont, 1998). Beecher et al. (1965) ont classé les fibres musculaires en rouges et blanches sur la base de leur coloration. Les fibres rouges sont trouvées dans les muscles qui sont utilisés pour une activité de soutènement du corps et les fibres blanches sont associées par les activités puissantes qui peuvent être réalisées pendant un temps court. Cette différence est liée au fait que tous les muscles sont composés par une proportion variable de fibres rouges et de fibres blanches. Engel (1962), sur la base d'une coloration histochimique de myosine ATPase pré-incubée à pH 9.4, a distingué deux types de fibres musculaires (types I, à contraction lente et II à contraction rapide). Karlsson (1999) a rapporté que l'activité phosphorylase et l'ATPase myofibrillaire sont basses mais qu'il existe un contenu élevé en enzymes mitochondriales dans les fibres de type I ; c'est le contraire pour les fibres de type II. Brooke et Kaiser (1970) ont classé les fibres selon leur activité ATPase après traitement des fibres à différents pH sur la base de l'activité ATPase myofibrillaire résiduelle: fibres I (rouge lente), IIA (rouge rapide) et IIB (blanc rapide). A l'évidence, il existe une relation linéaire entre l'activité ATPase myofibrillaire et les propriétés mécaniques des fibres, particulièrement sur la vitesse de la contraction (Burke et al., 1973 ; Garnett et al., 1978).

Les fibres musculaires peuvent être analysées sur leur capacité oxydative par la coloration de la NADH-tétrazolium réductase (NADH-Tr) ou de la succinate dehydrogénase (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 : α R (ATPase acide-stable, oxydative), β R (ATPase acide- faible et oxydative) et α 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 α R, β R et α W. Il existe une grande ressemblance entre les fibres α R, β R, α 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 de types I, IIA et IIB expriment respectivement les isoformes MHC-1, MHC-IIA et MHC-IIB (Schiaffino, 1989). La vitesse de contraction d'une fibre est dépendante des isoformes de myosine exprimées (Schiaffino et al., 1988).

La capacité oxydative des fibres musculaires a une relation inversée avec le diamètre de la fibre. Les fibres de type I sont plus petites, les fibres de type IIB ont un diamètre le plus grand et les fibres de type IIA ont un diamètre intermédiaire (Cassens et Cooper, 1971). De la même manière Essen-Gustavsson et al. (1992) ont mis en évidence que les fibres de type I et IIA ont plus de myoglobine et de lipides que les fibres de type IIB. Le tableau 3 présente les différentes caractéristiques des types de fibres.

Le muscle strié peut être classé en différents types qui découlent directement de la proportion des différents types de fibres qui les constituent. Il existe, en plus des trois types de muscles extrêmes (muscles de type I, IIA et IIB), tous les types de muscles intermédiaires. Chez le bovin, les muscles de type I peuvent être représentés par le *Masseter* ou le *Supraspinatus*, les muscles de type IIA par le *Longissimus dorsi* ou le *Psoas major* et les muscles de type IIB par le *Tensor fasciae* ou le *Gluteus medius*. Les muscles *Rectus abdominis* et *Triceps brachii* peuvent être considérés comme des muscles intermédiaires entre les muscles de type I et les muscles de type IIA (Zamora, 1997).

L'identification des isoformes de myosine et leur capacité à se côtoyer dans une même fibre a fait dire à Pette et Staron (1990) que le typage des fibres est un continuum entre les 2 extrêmes que sont le type I et le type IIB.

1-1.2. La relation entre le type de fibre musculaire et la qualité de la viande

La variation du type de fibre dans les muscles est importante quand on voudra étudier la composition du type de fibre et la qualité de la viande, mais à l'intérieur et entre les animaux cette composition dépend de sa localisation dans le corps, de l'âge, du poids et de la race (Cassens et Cooper, 1971). Les caractéristiques biochimiques individuelles des types de fibres (Tableau 3) peuvent aider à prédire la signification du type de fibre musculaire dans les qualités de la viande.

a). La capacité de rétention de l'eau

La vitesse et l'amplitude de la chute du pH *post mortem* sont des paramètres importants pour la qualité de la viande (Monin, 1988). Ils vont avoir une influence importante sur la capacité de rétention de l'eau de la viande et sur la dénaturation des protéines. La vitesse de la chute du pH *post mortem* est reliée à la fluctuation de Ca^{++} dans le réticulum sarcoplasmique, l'activité Acto-Myosin-ATPase (AM-ATPase), le pouvoir tampon du muscle et la température du muscle. L'amplitude de la chute du pH *post mortem* est déterminée par la conversion du glycogène en acide lactique et dépend de la teneur en glycogène avant abattage, les fibres glycolytiques des types IIA et IIB ayant une concentration plus haute en glycogène que les fibres de type I.

La glycolyse et la vitesse d'installation de la *rigor mortis* sont plus rapides dans les fibres blanches que dans les fibres rouges. Selon Monin et Ouali (1992), la variation des conditions de température due à la localisation du muscle dans la carcasse a un rôle important sur cette relation. Le pH ultime dépend du type de muscle et du taux de glycogène initial dans le muscle. Dans la mesure où le taux de glycogène est plus élevé dans les muscles de type IIA ou IIB que dans les muscles de type I, le pH ultime sera plus bas dans les premiers que dans les seconds (Fernandez et Tornberg, 1991; Monin et Ouali, 1992 ; Maltin *et al.*, 1997; Larzul *et al.*, 1997).

b). La couleur

La couleur est la qualité qui va influencer le consommateur au moment de sa décision d'achat ou de rejet. La teneur en myoglobine, pigment responsable de la couleur rouge de la viande bovine, est augmentée avec l'accroissement de la proportion de fibres rouges, fibres oxydatives nécessitant un apport en oxygène plus important (Henckel *et al.*, 1997). Renner (1984) a montré que la stabilité de la couleur est inversement reliée au métabolisme oxydatif chez les bovins, c'est-à-dire qu'une augmentation de fibres glycolytiques aura un effet positif sur la stabilité de la couleur des viandes bovines.

c). La qualité comestible

Valin et al. (1982) ont montré qu'il existe une relation positive entre la proportion de fibres de type I et la jutosité et la flaveur de la viande d'agneau.

La teneur en graisse intramusculaire est un facteur qui influence la flaveur de la viande. Cette qualité est définie par la quantité de produits d'oxydation formés à partir des lipides, oxydation principalement de nature radicalaire. Les lipides sont principalement accumulés dans les fibres oxydatives de type I et IIA (Essen-Gustavsson *et al.*, 1994). Une relation positive a été trouvée entre la quantité de fibres α W et le pourcentage de graisse dans la viande de bovin (Seideman *et al.*, 1986). Henckel *et al.* (1997) ont trouvé que la teneur en graisse intramusculaire était reliée avec la fréquence de fibres de type IIB ; ces auteurs notent que les relations entre les caractéristiques histologiques et la qualité sensorielle de la viande de porc sont controversées. Néanmoins il existe une relation positive entre la teneur en graisse intramusculaire et la flaveur de la viande (Camon et al., 1995). Il existe une corrélation entre la composition du type de fibre et la teneur en phospholipides (Alasnier *et al.*, 1996). Les fibres oxydatives contiennent plus de phospholipides que les fibres glycolytiques. Les phospholipides, plus susceptibles aux processus l'oxydation que les autres, sont les déterminants de la flaveur de la viande cuite (Meynier et Gandener, 1994).

d). La tendreté

Le type de muscle a une influence importante sur la maturation de la viande (Dransfield *et al.*, 1980-1981). Essen-Gustavsson et Fjelkner-Mudig (1985) ont montré que l'attendrissage est relié au profil métabolique du muscle. Les muscles riches en fibres de type IIB mûrissent 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 à contraction rapide que dans les muscles rouges à 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 faible et une teneur en calpaïnes la plus grande, c'est-à-dire que l'expression de ces protéases est dépendante du type de muscle (Ouali, 1990b).

Une augmentation de fibres glycolytiques peut avoir un effet positif sur l'attendrissage de la viande de bovin puisque il y aura une augmentation de la vitesse de maturation *post mortem* (Seideman *et al.*, 1986). Le diamètre de la fibre glycolytique de contraction rapide

contribue significativement à la variation de la tendreté de la viande mesurée instrumentalement (Maltin *et al.*, 1997).

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).

Ces résultats, apparemment concordants permettant de dire que les muscles de type II présentent une vitesse de maturation plus élevée que celle des muscles de type I, sont toutefois à prendre avec précaution dans la mesure où peu d'études incluent dans leur série de véritables muscles de type I, qui sont en nombre limité chez le bovin et généralement de petite taille. Ouali *et al.* (1995) ont ainsi montré que les muscles *Supraspinatus* et *Diaphragma pédialis* (Onglet), tous les deux composés en majorité de fibres de type I, étaient aussi tendre que les muscles de type II (muscles *Longissimus* et *Semimembranosus*) après une durée de conservation identique. Ceci est en accord avec ce qui se fait dans la pratique, puisque l'onglet est un morceau très recherché par nombre de consommateurs pour sa tendreté, sa flaveur et sa jutosité.

1-2. LE SARCOLEMME

Bowman 1840 (cité par Bennett, 1960) a décrit une fine membrane qui couvre la fibre musculaire et qu'il a dénommé *sarcolemme* (Figure 2); cet auteur a été le premier à démontrer le caractère semi-perméable du sarcolemme.

Le sarcolemme a été étudié en microscopie électronique par Jones et Barrer en 1948 (cités par Bennet, 1960). Le sarcolemme (0,1 μm d'épaisseur) a été identifié comme une fine membrane au-dessous du tissu connectif (endomysium) qui couvre la fibre musculaire. Le sarcolemme des fibres musculaires de certains poissons et des amphibiens est plus épais que le sarcolemme des mammifères (Schafer, 1912, cité par Walls, 1960).

Palka (1999) l'a défini comme une structure continue qui parcourt la fibre musculaire et contribue à l'intégrité mécanique du muscle. La force qui est transmise par les myofibrilles traverse le sarcolemme en direction de la matrice extracellulaire, pour cette raison le sarcolemme est exposé à un stress mécanique et il a besoin d'être fort structurellement.

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).

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 (Figure 2), 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 (sarcosomes), des acides gras et de la myoglobine (Pollack, 1990).

1-4. LES MYOFIBRILLES

Chaque fibre musculaire est constituée de petites unités fonctionnelles parallèles au grand axe de la fibre : *les fibrilles*. Ces fibrilles, encore appelées *myofibrilles* (Figure 3) ont un diamètre d'environ 1-2 μm 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 les 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 3).

La portion de myofibrille comprise entre deux lignes Z successives est appelée **sarcomère**. Mesurant environ 2 μm 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 μm . Lorsque le muscle se contracte, les bandes I se raccourcissent alors que les bandes A gardent la même longueur quel que soit le degré de contraction du muscle. Lorsque le muscle est contracté, le sarcomère mesure environ 1,5 μm .

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 3). 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 apparaît constituée 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 télomère, est en fait une couche de protéines en forme de pièce de monnaie on sont ancrés les filaments fins et qui unit 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).

1-5. LES PROTEINES MUSCULAIRES

1-5.1. 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).

1-5.2. 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.

1-5.2.1. Protéines contractiles

- La myosine

La myosine (Figure 3) a été découverte et nommée par Kühne en 1859 (Kühne, 1859 cité par Hayashi, 1973).

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 qu'il s'agisse 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. 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.

Par protéolyse ménagée, on obtient des fragments caractéristiques et porteurs d'une des fonctions de la protéine. La trypsine coupe la myosine dans une zone située vers le milieu du bâtonnet et on obtient ainsi deux fragments de tailles inégales les *méromyosines* ; l'une est la méromyosine légère ou LMM (de l'anglais, light meromyosin, PM 130 kDa), l'autre la méromyosine lourde ou HMM (heavy meromyosin, PM 340 kDa). La HMM peut également être scindée par la papaïne en sous fragments S-1 (têtes de la myosine) et S-2 de poids moléculaires respectifs 110 kDa et 60 kDa.

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.

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).

- *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 a été isolée pour la première fois du muscle par Straub en 1942 et a été nommée actine par Szent-Györgyi (Straub, 1942 cité par Laki, 1971).

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* (Figure 3).

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. Les myofilaments fins sont formés par l'association de cette double hélice et de deux protéines régulatrices (Poirier *et al.*, 1999).

1-5.2.2. Protéines régulatrices principales

- **Protéines appartenant au filament épais**

- ***La protéine H***

Cette protéine a été identifiée par Starr et Offer (1971). La protéine H représente environ 0,18% des protéines myofibrillaires totales, elle a un PM de 74 kDa et comprend une simple chaîne polypeptidique. C'est une protéine qui est localisée sur la surface des filaments épais. Starr et Offer (1983) suggèrent quatre fonctions pour cette protéine : 1) elle peut servir comme enzyme, 2) elle contrôle le mouvement des liaisons de la molécule de myosine, 3) elle sert de stabilisateur mécanique pour la liaison des filaments épais voisins et 4) elle peut jouer un rôle dans l'assemblage des filaments épais.

- ***La protéine C***

La protéine C a été purifiée pour la première fois par Starr et Offer (1971). Protéine de poids moléculaire 121 kDa (2% de protéines myofibrillaires totales), elle comprend une seule chaîne polypeptidique en forme d'ellipse de 35 nm de long. Il existe 37 molécules de protéine C pour chaque molécule de myosine et il y a 43 nm de distance entre chacune d'elles. La protéine C est responsable de l'interaction entre les queues de différentes molécules de myosine pour l'assemblage des filaments épais et il est possible que la protéine C agisse comme un mécanisme de régulation sur l'interaction et le mouvement des liaisons pendant la contraction (Gregorio *et al.*, 1999).

- ***La myomesine***

Protéine de la ligne M qui a été découverte en 1981 par Eppenberger *et al.*, elle a été isolée pour la première fois par Masaki et Takaiti en 1974. C'est une protéine de 185 kDa (0,005% de protéines myofibrillaires totales) qui est un composant majeur de l'assemblage et du maintien de la structure de la bande A (Steiner *et al.*, 1999). La myomesine est une protéine spécifique du muscle squelettique et joue un rôle important dans l'assemblage des myofibrilles dans les fibres du muscle strié parce car elle intervient sur la liaison des filaments épais adjacents au niveau de la bande M (Auerbach *et al.*, 1999).

- ***La protéine M***

C'est une protéine de 165 kDa (0,15% de protéines myofibrillaires totales). Elle est un composant fonctionnel de la ligne M et participe à l'alignement et à l'orientation des

filaments épais dans les myofibrilles. Cette protéine peut aider au maintien de l'intégrité du filament épais pendant la contraction (Agarkova *et al.*, 2003).

- ***La M-crétine kinase***

C'est une protéine de 84 kDa. Sa structure est composée de 2 sous unités d'un poids moléculaire de 42 kDa. Il a été démontré que la créatine kinase joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique du muscle. Cette protéine absorbée sur la bande M, participe à la régénération de l'ATP nécessaire à la contraction (Hornemann *et al.*, 2003).

- ***La skelemine***

C'est une protéine de 195 kDa qui attache les myofibrilles aux filaments intermédiaires et les myofibrilles adjacentes entre elles (Steiner *et al.*, 1999). Elle est associée à de nombreuses autres protéines pour former les filaments cytosquelettiques transversaux au niveau de la bande Z.

• ***Protéines appartenant au filament fin***

- ***La tropomyosine***

C'est la seconde plus importante protéine du filament fin (7% des protéines myofibrillaires totales). La tropomyosine (Figure 3) a été identifiée et isolée pour la première fois par Bailey (1948). C'est une protéine fibreuse de 66 kDa et de 400 Å de long. Elle est composée d'une sous unité α et d'une sous unité β de 284 acides aminés chacune, qui s'organisent en structure hélicoïdale. Elle s'associe en polymères selon un enchaînement tête-queue, et se positionne le long du filament d'actine dans le sillon de l'hélice. Son interaction avec l'actine suit une stœchiométrie de sept monomères d'actine pour une tropomyosine (Stone et Smille, 1978).

Des expériences ont montré que la tropomyosine, lors du cycle contraction-relaxation du muscle, avait une certaine mobilité sur le filament d'actine. Ceci a permis de définir deux états, selon l'état d'activation ou d'inhibition de l'ATPase dû à la troponine C. Le mouvement induit par la fixation du calcium aurait pour conséquence d'affecter l'interaction entre l'actine et la tête de myosine, dans le sens d'une libération des sites de l'actine nécessaires à l'activation de l'activité ATPase de la myosine (S-1). Différents modèles ont été proposés sur ce sujet, le modèle le plus connu est le *modèle du blocage stérique*, celui la tropomyosine (Tm) empêchant physiquement le contact acto-myosine. La liaison du calcium à la troponine

C aurait pour conséquence d'induire un changement conformationnel de la Tm à la surface du filament rendant à nouveau accessible les sites de fixations de la myosine (S-1) sur l'actine (Bodwell, 1971).

- **Les troponines**

La troponine (Tn) est un complexe protéique constitutif des myofibrilles (Figure 3). Le complexe des troponines se compose de trois protéines : les troponines I, C et T. Ce complexe régule la contraction musculaire par l'interaction de l'actine et de la tropomyosine dans le muscle strié squelettique et cardiaque. Les trois sous unités ont des rôles différents. La **troponine C** (TnC) a une masse moléculaire de 18 kDa. Elle fixe le calcium grâce à quatre sites de fixation, ce qui induit un changement de conformation de la troponine I (TnI) sous une forme étirée. Elle module l'action de la TnI avec laquelle elle se complexe. Ainsi quand la concentration calcique augmente, ce sont les changements de conformation subis par TnC qui, transmis au complexe des troponines-tropomyosine, sont finalement responsables de la levée de l'inhibition de l'activité ATPase de l'actomyosine. La **troponine T** (TnT) a une masse moléculaire de 37 kDa. Elle est constituée de 298 acides aminés. Elle est liée à la tropomyosine alors que la TnI, régulatrice, est fixée au repos à l'actine et inhibe la fixation de l'actine et de la myosine. La fixation du calcium entraîne un changement de conformation de la tropomyosine et de la troponine, permettant la fixation de la tête de la myosine sur l'actine. La **troponine I** (TnI) a une masse moléculaire de 24 kDa. Elle est formée de 210 acides aminés. Elle existe sous trois isoformes : des isoformes du muscle squelettique lent et rapide et l'isoforme cardiaque. Elle fait partie du complexe régulateur qui règle l'interaction du complexe actine-myosine. Elle inhibe l'hydrolyse de l'ATP par l'acto-myosine. Elle interagit avec l'actine et, en présence de tropomyosine la stoechiométrie est de une TnI pour sept monomères d'actine. Elle se fixe aussi à la TnC et la TnT. C'est une protéine myofibrillaire non globulaire mais linéaire avec cinq hélices α adoptant en solution une structure allongée (Gaillard, 2002).

- **La tropomoduline**

La tropomoduline a été découverte par Robson en 1995 au niveau du filament fin. Cette protéine est liée à la tropomyosine et est localisée aux extrémités libres des filaments fins.

1-5.2.3. Protéines du cytosquelette

Les protéines du cytosquelette (Figure 4) ont un rôle de maintien de l'intégrité et de l'organisation sarcomérique. Elles constituent un réseau de filaments transversaux et de filaments longitudinaux. Certaines font partie intégrante du disque Z alors que d'autres se situent à sa périphérie (Zamora, 1997).

- **Les protéines du disque Z**

La strie Z (ou ligne Z ou disque Z) est une structure de très forte densité, qui a pour principale fonction de « cloisonner » la myofibrille, d'ancrer et de relier les filaments fins de deux sarcomères adjacents. Elle correspond aussi à un lieu d'ancrages intermyofibrillaires puisque les filaments intermédiaires (desmine, synemine...) lui sont associés. De plus, c'est par l'intermédiaire de la strie Z que se fait la jonction entre les myofibrilles et la membrane plasmique au niveau des costamères. Ainsi, le disque Z joue un rôle très important d'ossature dans l'architecture myofibrillaire.

La ligne Z est essentiellement formée de filaments Z qui en assurent l'ossature par une matrice amorphe. Ces filaments sont composés d'une protéine homodimérique dont chaque sous unité a une masse d'environ 100 kDa, qui se nomme α -actinine. Cette protéine dont l'interaction avec l'actine est connue, semblerait lier à la fois les filaments fins d'un même sarcomère mais aussi ceux des sarcomères adjacents au sein de la ligne Z (Tonomura, 1973)

- ***L' α -actinine***

L' α -actinine principale protéine de la ligne Z où elle lie, entre autres, les filaments d'actine, constitue environ 2% des protéines myofibrillaires totales. La structure dimérique a une masse moléculaire de 201 kDa. L' α -actinine découverte en 1964 par Ebashi *et al.*, est présente dans les cellules musculaires et non musculaires. Elle fait partie d'une grande famille de molécules qui sont les protéines d'ancrages et de pontages de l'actine.

Elle est organisée en homodimères, avec des monomères de 94 à 103 kDa, selon l'isoforme. Les sous unités ont une orientation antiparallèle. Chaque sous unité a un domaine de liaison à l'actine dans sa région N-terminale. Un dimère d' α -actinine peut donc lier deux filaments d'actine, ce qui explique sa capacité à former des réseaux de microfilaments (Davey *et al.*, 1979).

L' α -actinine joue *in vivo* un rôle important dans l'intégrité du sarcomère et l'organisation du disque Z.

- ***La β -actinine***

Dans le filament fin, elle serait localisée au niveau de la jonction des bandes A et I de la myofibrille à l'état relaxé.

Il s'agit d'une protéine globulaire dont le poids moléculaire est de 60 kDa. Elle présente la propriété de réduire la dimension des polymères de G-actine et d'empêcher la réassociation de fragments de F-actine obtenus mécaniquement (Maruyama, 1971).

- ***La zeugmatine***

Cette protéine a été considérée comme faisant partie de la ligne Z la première fois par Maher *et al.* en 1984 qui l'ont nommée zeugmatine. La zeugmatine a une masse moléculaire de 500 kDa divisée en deux bandes qui sont présentes en quantité égale.

Les anticorps monoclonaux à la zeugmatine ont montré que cette protéine est impliquée dans l'organisation myofibrillaire.

Maher *et al.* (1985) ont proposé que cette protéine puisse lier les filaments d'actine directement aux lignes Z du muscle squelettique.

La susceptibilité de la zeugmatine à la rupture dans le muscle *post mortem* peut indiquer un rôle de cette protéine sur la tendreté de la viande. Cette rupture peut être entre les lignes Z et les filaments I. D'un autre côté la rupture prématurée de la zeugmatine peut signifier que cette rupture n'a pas d'effet sur la tendreté de la viande pendant la maturation (Maher *et al.*, 1985).

• ***Les filaments longitudinaux***

Lors d'un étirement très important des fibres musculaires, le sarcomère peut s'allonger jusqu'à ce que les filaments fins et épais ne se chevauchent plus. Pourtant, lorsque l'on arrête la pression extérieure, le muscle se rétracte et reprend sa longueur initiale. Aussi, un tel phénomène laisse envisager la présence de systèmes de « ressorts » (filaments longitudinaux) permettant aux structures contractiles de retrouver leur état initial. Dans cet état d'extension très importante, l'examen en microscopie électronique, révèle la présence d'une structure filamenteuse auquel on a donné le nom de troisième filament (Locker et Leet, 1975).

D'autre part, une analyse en gel dénaturant à faible pourcentage d'acrylamide, d'extraits totaux de myofibrilles (Ethinger *et al.*, 1976) a montré la présence d'un doublet de protéines de poids moléculaire voisin de 2 à 3 MDa correspondant à une protéine appelée *titine* et d'une troisième bande de 800 kDa correspondant à une protéine nommée *nebuline*.

Les filaments longitudinaux sont constitués essentiellement de deux longues protéines : la titine et la nebuline.

- *La titine*

La titine (ou connectine) est une protéine d'environ trois millions de Daltons qui a été nommée par Wang *et al.* en 1979. Elle représente à ce jour la plus longue chaîne polypeptidique connue dans le monde cellulaire et correspond à près de 10% de la masse totale des protéines contractiles.

Malgré sa grande taille, sa mise en évidence au sein du sarcomère fût très tardive, et ce pour deux raisons qui sont : le faible diamètre des filaments qu'elle constitue (< 5 nm) qui ne permettait pas sa détection en microscopie électronique au milieu des protéines contractiles, et sa grande taille l'empêchant de pénétrer dans des gels électrophorèse d'acrylamide de concentrations classiques.

Cette molécule part de la strie Z, s'étend tout au long de la bande I, mais aussi de la bande A, pour finir dans la ligne M (Maruyama *et al.*, 1985). La titine s'étend de manière parallèle aux filaments fins et épais sur la longueur d'un demi sarcomère, et une seule molécule couvre une distance de près de un μm .

Récemment, il a été montré que les extrémités N-terminales (environ 80 kDa) des filaments de titine de polarité opposée appartenant à des sarcomères adjacents se chevauchent dans la ligne Z (Gregorio *et al.*, 1998). La partie C-terminale de la molécule se trouve au centre de la bande A au niveau d'une structure dense, qui est la ligne M. Ce fragment de titine d'environ 200 kDa traverserait entièrement la ligne M et se chevaucherait avec les extrémités C-terminales des molécules de titine de l'autre demi sarcomère. La titine, forme un réseau continu tout au long de la myofibrille et elle joue un rôle essentiel.

Effectivement, son fort pouvoir d'élasticité, sa longue taille et ses multiples contacts contribuent au maintien de l'alignement des filaments contractiles et permettent le retour du sarcomère à son état initial après contraction ou étirement de la myofibrille.

La titine pourrait avoir une forte contribution pour l'assemblage des différents constituants sarcomériques. Elle participe au maintien de la myosine dans la partie médiane du sarcomère en assurant une attache élastique entre les filaments épais et la strie Z (Pierobon-Bormioli *et al.*, 1992). Elle servirait alors « d'empreinte » ou de « guide » pour l'agencement des autres protéines myofibrillaires (Kawamura *et al.*, 1995).

King *et al.* (1981) ont démontré que la titine est dégradée pendant la cuisson de la viande à 55°C pendant que l'actine et la myosine ne sont pas affectées à cette température. La rupture de la titine a été plus grande pendant la cuisson à 60°C durant 40 minutes que pendant la cuisson pendant 3 semaines à 20°C. Ceci peut suggérer que la protéolyse de la titine

pendant le stockage à 2°C n'est pas responsable de la tendreté de la viande pendant la maturation.

- ***La nebuline***

Après une extraction saline des myofibrilles, qui conduit à la disparition des filaments épais, les filaments fins restent bien organisés et accrochés aux disques Z. Ceci suggère que d'autres éléments structuraux régulent la stabilité des filaments fins. Une autre protéine découverte récemment, la nebuline, est supposée assumer ce rôle stabilisateur (Papa, 1997).

La nebuline a été identifiée pour la première fois par Wang *et al.* en 1979.

C'est une protéine de masse moléculaire comprise entre 600 et 900 kDa qui représente 3 à 4% des protéines myofibrillaires (Kruger *et al.*, 1991).

La nebuline favorise la nucléation de l'actine, et pourrait donc protéger le filament fin de la dépolymérisation ou d'éventuelles fragmentations (Chen *et al.*, 1993). La nebuline a un rôle important pour la stabilisation du filament d'actine ainsi que pour la régulation de sa longueur.

Robson *et al.* (1991) ont observé que la nebuline est dégradée rapidement dans le muscle *post mortem*. Du fait que la nebuline disparaît au premier jour *post mortem* on peut penser que cette protéine n'a pas d'effet sur la tendreté de la viande pendant la maturation mais cette théorie doit être démontrée.

• **Les filaments transversaux**

Selon Maruyama (1985), une des caractéristiques remarquables de l'organisation de la cellule musculaire, réside dans la disposition strictement parallèle des différents systèmes de filaments myofibrillaires et, dans l'alignement des myofibrilles entre elles. Deux structures transversales supportent le maintien de l'agencement intra et extra sarcomérique :

- les lignes Z ou stries Z, qui cloisonnent l'espace sarcomérique et assurent l'ancrage des filaments fins et élastiques.

- le réseau de filaments transverses qui relie les myofibrilles adjacentes entre elles et à la membrane sarcolemmique. Ces ***filaments intermédiaires***, constitués de différentes protéines (desmine, synemine...) forment des liaisons entre les disques Z, et entre les bandes M des myofibrilles voisines. De plus, il existe également des jonctions entre la membrane sarcolemmique et les myofibrilles au niveau d'invaginations du sarcolemme, appelés ***costamères***. Ces dernières par l'intermédiaire de certains éléments du cytosquelette peuvent être reliées aux lignes Z.

a) Les filaments intermédiaires

C'est le troisième réseau du cytosquelette. La propriété la plus marquante de ces filaments intermédiaires est leur insolubilité.

Les filaments intermédiaires disposés transversalement par rapport à la fibre relient les disques Z des myofibrilles contiguës et s'associent à la membrane plasmique aux deux extrémités en parallèle, on les trouve au niveau de la strie Z et de la bande M. Ils pourraient également se lier aux organelles cellulaires (les tubules T, les mitochondries) pour les maintenir en place (Papa, 1997).

Dans le muscle strié, ils sont constitués de trois types de protéines majeures : la *desmine*, la *synemine* et la *vimentine*.

- **La desmine**

Cette protéine a été isolée pour la première fois par Lazarides et Hubbard en 1976. Elle a une masse moléculaire de 55 kDa. Lazarides et Hubbard (1976) ont donné le nom de desmine à cette protéine. Elle représente 0,18% des protéines du muscle squelettique. L'immunodétection l'a localisé dans les lignes Z. Elle est la protéine majeure des filaments transversaux du cytosquelette (Robson *et al.*, 1984).

- **La synemine**

Cette protéine a été isolée et nommée synemine par Granger et Lazarides en 1980, avec la desmine et la vimentine, elle constitue la troisième protéine des filaments intermédiaires.

La synemine possède une masse moléculaire de 230 kDa et elle existe dans un ratio molaire avec la desmine de 1:2. Elle est localisée dans la ligne Z. Cette protéine assurerait la liaison de la desmine avec les stries Z.

Sa fonction est liée aux de la desmine et de la vimentine, lesquelles entourent chaque myofibrille à la ligne Z ; cet arrangement maintient l'organisation transversal des sarcomères (côte à côte) des myofibrilles aux lignes Z.

- **La vimentine**

La vimentine a été localisée en association avec la synemine et la desmine. Franke *et al.* (1978) ont proposé le nom de vimentine à cette protéine qui a une masse moléculaire de 57 kDa. La vimentine est localisée au niveau de la ligne Z de la cellule musculaire. En association avec les deux autres, cette protéine assure l'organisation spatiale transversale des myofibrilles (Granger et Lazarides, 1980).

b) Les costamères

Craig *et al.*, 1983, cités par Papa, 1997, ont observé, pour la première fois, des structures filamenteuses qui lient les myofibrilles au sarcolemme. Ces structures sont appelées costamères (Figure 5) ; c'est un autre niveau de structure cytosquelettique. Normalement, les costamères sont positionnés en registre avec le disque Z et relient la myofibrille à la membrane. Ces liaisons sarcolemme-disque Z serviraient à transmettre les tensions dynamiques aux substrats extracellulaires et surtout, à établir une continuité transverse solidarissant les myofibrilles et la matrice collagénique via la membrane cytoplasmique. Une telle continuité est indispensable du fait du raccourcissement du sarcomère lors du processus contractile. La principale protéine de ce complexe est la vinculine. D'autres composants du costamère sont la filamine, la dystrophine et la spectrine.

- **La vinculine**

Cette protéine a été isolée et nommée la première fois par Geiger en 1979. La vinculine a une masse moléculaire de 130 kDa. La fonction de cette protéine est la liaison structurale de l'actine au sarcolemme. Kosteliansky et Gneushev (1983) ont proposé que la vinculine lie les myofibrilles au sarcolemme.

- **La filamine**

La filamine a été isolée par Wang et Singer en 1975. Bechtel (1979) a démontré que cette protéine est une composante de la ligne Z dans le muscle squelettique et elle représente au moins 1% des protéines myofibrillaires. Il s'agit d'un oligomère asymétrique constitué de deux sous unités de 240 kDa (Wang et Singer, 1975). L'immunodétection a localisé la filamine dans la ligne Z mais son rôle structural n'est pas clair. Bechtel (1979) a suggéré que cette protéine a un rôle dans l'assemblage du système acto-myosine. Sa fonction peut être de lier les filaments d'actine entre eux ou lier d'autre structure dans la ligne Z.

- **La dystrophine**

La dystrophine est une protéine de 427 kDa. Des études immunocytochimiques ont montré que cette protéine est localisée de façon continue sous le sarcolemme, et est particulièrement concentrée autour des jonctions myotendineuses. Elle constitue un élément majeur du réseau subsarcolemmique où elle représente 5% des protéines. La dystrophine du muscle squelettique est fortement liée par sa partie C-terminale à certaines protéines glycosylées du sarcolemme et d'autre part, aux protéines du cytosquelette en particulier

l'actine, par sa partie N-terminale. Les sites d'ancrage éventuels du domaine central sont très peu connus. Une des fonctions du complexe dystrophine-glycoprotéines est de lier le cytosquelette à la matrice extracellulaire. La perte des liaisons dans ce complexe peut causer des myopathies graves, semblables à celles observées lorsque la dystrophine est elle-même absente ou tronquée. Cela signifie que la partie liée au sarcolemme et au complexe glycosylé et assurant de ce fait la continuité des liaisons transverses, est essentielle au maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité du tissu musculaire (Ervasti et Campbell, 1991).

Dans le muscle squelettique la dystrophine paraît être nécessaire à un flux normal de calcium et à la régulation du niveau calcique intracellulaire. Cette protéine semble impliquée dans le processus qui protège la membrane plasmique du stress mécanique que constituent les cycles répétés contraction-relaxation du muscle (Maruyama, 1971).

- ***La spectrine***

C'est une protéine sous-membranaire de 240-280 kDa, liant l'actine, apparentée à l' α -actinine et à la dystrophine. Elle est présente dans les cellules musculaires et non musculaires. Dans le muscle strié elle a été colocalisée avec les disques Z. Il a été proposé que la spectrine dirige et oriente les tubules T autour de la strie Z. Elle servirait de lien entre la bande Z et la membrane sarcolemmique (Wang et Wright, 1988).

1-6. LE TISSU CONJONCTIF

Le tissu conjonctif est une matrice extracellulaire composée de collagène, d'élastine et de protéoglycanes. Le tissu conjonctif assure au muscle une grande résistance mécanique. Il est le tissu de soutien du système musculaire et intervient au niveau de la transmission des forces de la contraction myofibrillaire vers le squelette par l'intermédiaire des tendons. Il représente 0,4 à 3% de la masse musculaire et environ 10% des protéines musculaires totales.

Les principales fonctions de ce tissu sont d'assurer la cohésion du muscle et son adhésion aux autres tissus, de maintenir la lubrification des surfaces entre les fibres et les faisceaux musculaires, d'accommoder le muscle aux déformations qui lui sont imposées. Il permet l'alignement des fibres musculaires, des nerfs et des veines et d'assurer la transmission de la force développée à l'ensemble du muscle.

Le sarcolemme entourant la fibre musculaire est relié au tissu conjonctif par l'intermédiaire d'une fine spirale de réticuline. Cet ensemble constitue l'endomysium qui entoure chaque fibre musculaire. Les fibres sont regroupées en faisceaux plus ou moins

importants par le périmysium. Le muscle entier est lui-même enveloppé par l'épimysium qui assure la liaison avec le collagène des tendons servant aux insertions du muscle.

Ces trois structures ne sont pas indépendantes et forment un continuum visible. L'épimysium, solidarissant le muscle au squelette, est éliminé au cours du parage, il n'intervient donc pas dans la structure de la viande. L'endomysium et le périmysium permettent d'assembler plusieurs fibres musculaires pour former des faisceaux. Le périmysium détermine l'aspect macroscopique et la texture de la viande, alors que l'endomysium n'a qu'un rôle secondaire. Il existe une relation complexe entre l'organisation du tissu conjonctif et la tendreté de la viande (Harkness, 1979).

1-6.1. Le collagène

Le collagène (Figure 6) constitue 20 à 25% des protéines totales chez les mammifères et généralement 2% de la masse musculaire. Il représente respectivement 25, 80 et 35% du poids sec de l'épimysium, du périmysium et de l'endomysium. Le collagène est une protéine de 280 kDa. Il se présente sous la forme d'une triple hélice de 280 nm de long et 1,4 nm de diamètre. C'est une protéine fibreuse comprenant une séquence acide aminée composée d'une unité tripeptidique qui se répète. Cette séquence est du type Gly-X-Y, où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé. Dans la composition du collagène, trois acides aminés prennent une part assez importante : glycine pour 35%, proline pour 7 à 9% et hydroxyproline pour 12 à 14% (selon les types de collagène) (Glanville et Kuhn, 1979).

Le collagène représente 70 à 80% des protéines du tissu conjonctif. Elle est l'une des rares protéines à contenir une forte proportion d'hydroxyproline. Les séquences «Glycine-Proline-Y» et «Glycine-X-Hydroxyproline» sont présentes dans les mêmes proportions et représentent environ 21% des séquences totales. Le collagène ne contient pas de tryptophane et peu de cystéine mais contient un autre acide aminé atypique : l'hydroxylysine (Fraser *et al.*, 1979)

Le collagène a pour élément de base la molécule de tropocollagène. Cette dernière est formée de trois chaînes polypeptidiques hélicoïdales de type α qui forment une triple hélice stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Il y a enroulement de multiples brins hélicoïdaux en une «super hélice» que l'on peut comparer, par analogie, à l'enroulement des ficelles d'un cordage. L'enroulement se fait en sens opposé à celui de l'enroulement des hélices polypeptidiques individuelles, conformation qui permet le tassement le plus serré possible de multiples chaînes polypeptidiques. Cet assemblage en longueur donne des fibrilles de diamètres variables selon la nature du collagène. Entre les fibres et les fibrilles, des

liaisons, de nombre et de nature variables peuvent se former. C'est justement le nombre et la nature de ces liaisons qui permettent de définir le degré de réticulation du collagène et donc de déterminer la dureté de la viande.

Plus le degré de réticulation sera important, plus les fibres et fibrilles seront solidement ancrées les unes aux autres, plus la viande sera dure. Les structures tridimensionnelles du collagène, au sein du tissu conjonctif (épi, péri et endomysium), ne sont pas toutes identiques : pour l'endomysium, le collagène forme un feutrage dense de fibrilles ; pour le péri-mysium, un feutrage lâche permet la cohésion entre les fibres musculaires ; pour l'épi-mysium, un entrecroisement de fibres de collagène ondulées forme une enveloppe continue autour des fibres musculaires (Bailey, 1972).

Il existe un polymorphisme génétique du collagène avec au moins 11 types de collagènes différents. Les collagènes de type I, II et III se présentent sous forme de fibres. Le collagène de type I (80 à 160 nm de diamètre) est contenu dans toutes les structures conjonctives (épi-mysium surtout, mais aussi péri-mysium et endomysium) dans la peau, les os, et les tendons. Le collagène de type II (< 80 nm de diamètre) est principalement retrouvé dans les tissus cartilagineux. Les fibres de collagène de type III sont souvent associées à des tissus élastiques ; elles sont majoritairement présentes dans le péri-mysium et souvent associées aux fibres de collagène de type I et elles participeraient à l'élaboration de la texture de la viande. Le collagène de type IV forme un réseau sans fibres ; il est présent dans les membranes basales et il est trouvé dans l'endomysium autour de chaque myofibre. Le collagène de type V encore mal connu, serait également un collagène de type fibreux. D'autres types de collagène (VI et VII) se présentent sous forme filamenteuse ou microfibrillaire (Light et Champion, 1984).

Les altérations *post mortem* du collagène sont très discrètes. Il est dit que le collagène contribue par sa teneur, sa variabilité phénotypique et sa stabilité thermique à déterminer le comportement de la viande au cours de sa cuisson. La quantité et les propriétés du collagène sont responsables de la dureté de base de la viande et influencent la valeur commerciale et le mode de cuisson (viande à bouillir ou à griller) de chaque muscle. La classification bouchère des morceaux de viande et leur mode de cuisson dépendent directement de leur teneur en collagène : les muscles les plus riches en collagène ont tendance à fournir une viande plus dure nécessitant un temps et une température de cuisson plus importants. En effet, dans ce cas, les quartiers avant, contenant une à quatre fois plus de collagène que les quartiers arrière, formeront les viandes à bouillir. Ce traitement thermique en milieu humide permet de

transformer le collagène en gélatine et améliore ainsi la tendreté des muscles inutilisables sous forme de grillades (Bailey, 1988).

1-6.2. L'élastine

L'élastine est une protéine fibreuse du tissu conjonctif qui confère des propriétés d'extensibilité et de rétraction élastique aux tissus. L'élastine existe en grandes quantités dans les tissus, notamment ceux qui requièrent ces propriétés physiques, tels les poumons, les grosses artères et quelques ligaments élastiques. L'élastine représente en général moins de 10% de la masse du tissu conjonctif. Cependant, sa teneur dépend du muscle considéré et plus précisément de la fonction du muscle (Got, 1997).

L'élastine est synthétisée sous forme d'un monomère soluble de 70 kDa, la tropoélastine. Quelques unes des prolines de la tropoélastine sont hydroxylées en hydroxyproline par une prolyl hydroxylase, alors qu'il n'y a pas d'hydroxylysine, ni d'hydroxylysine glycosylée. Contrairement au collagène, la tropoélastine n'est pas synthétisée sous forme d'un précurseur avec des peptides d'extension. De plus, l'élastine ne contient pas de séquences répétitives Gly-X-Y, ni de parties glucidiques et sa structure n'est pas sous forme de triple hélice. La glycine représente environ un tiers des acides aminés de l'élastine, la proline 10-13 et 40% d'autres acides aminés. Les fibres d'élastine sont très élastiques et se trouvent sous tension dans le tissu conjonctif d'un muscle au repos et peuvent s'étirer pour atteindre plusieurs fois leur longueur et retourner rapidement à leur dimension et leur forme d'origine lorsque la tension est relâchée. L'élastine est constituée de deux types de fibres : des fibres épaisses (5 à 10 µm de diamètre) orientées parallèlement aux cellules musculaires et des fibres fines (1 à 2 µm de diamètre) qui suivent l'alignement des fibres de collagène du périmysium et de l'endomysium (Stryer, 1981).

L'élastine mature contient de nombreuses interconnexions, ce qui la rend très insoluble et par conséquent, difficile à analyser. Cette protéine joue un rôle moindre au niveau de la tendreté de la viande mais tout de même présent dans le tissu conjonctif. Elle est très stable à la chaleur. Son effet sur la texture de la viande cuite dépend de sa teneur dans le périmysium, teneur généralement assez faible. Elle contribuerait à l'augmentation de la cohésion des myofibrilles (Bailey et Light, 1989).

1-6.3. Les Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des macromolécules composées de polysaccharides appelés glycosaminoglycanes (GAG) ; les chaînes de GAG sont formées de liaisons covalentes de trois ou quatre monosaccharides.

Certains protéoglycanes ont été caractérisés, comme le syndécane, le bétaglycane, la serglycine, l'agrécan, le versicane, la décorine, le biglycane et la fibromoduline. Ils diffèrent quant à leur distribution tissulaire, la nature du noyau protéique, des glycosaminoglycanes attachés et leur fonction. Les protéoglycanes sont des molécules hydrophiles ayant un turnover de 300 à 800 jours.

La quantité de glucides dans un protéoglycane est habituellement beaucoup plus importante que celle contenue dans une glycoprotéine ; elle peut représenter jusqu'à 95% de son poids. Le poids moléculaire des protéoglycanes varie de 50 à 106 kDa. Ils permettent la liaison entre les fibres de collagène (Pearson et Young, 1989).

Les GAG (kératane sulfate et sulfate de chondroïtine principalement), qui constituent les protéoglycanes, sont branchés autour d'une protéine axiale. Ils sont attachés à une molécule d'acide hyaluronique en forme de longue ficelle. Les GAG possèdent des groupements négatifs : en raison de la présence de ces charges négatives qui attirent à l'intérieur du cartilage des ions positifs tels que le sodium et le calcium, le cartilage est avide d'eau. Toutefois, l'armature de fibres de collagène rend le tissu cartilagineux inextensible et limite l'entrée de l'eau dans le cartilage. Ainsi, lors de la mise en charge d'une articulation, la pression intratissulaire s'élève au niveau du cartilage puis l'eau quitte la région comprimée, provoquant une élévation de la concentration en protéoglycanes, ce qui attire de nouvelles molécules d'eau : ainsi, les charges reçues sont amorties et réparties. Plus la concentration en protéoglycanes s'élève plus le tissu résiste à la compression. Quant à la résistance à la traction, elle est essentiellement le fait des fibres de collagène (Harper, 2000).

Les protéoglycanes assurent plusieurs fonctions : ils agissent comme composants structuraux de la matrice extracellulaire ; ils présentent des interactions spécifiques avec le collagène, l'élastine, la fibronectine, la laminine et d'autres protéines de la matrice extracellulaire ; ils contribuent à la turgescence caractéristique de divers tissus ; ils servent de tamis dans la matrice extracellulaire, ils agissent comme anticoagulant (héparine), ils sont des

composants des membranes plasmiques où ils peuvent agir comme récepteurs et participer à l'adhésion cellulaire et aux interactions entre cellules voisines (Harper, 2000).

2 - Transformation du muscle en viande

2-1. SCHEMA GENERAL

Dès la mort de l'animal, la structure myofibrillaire des muscles subit de profondes modifications qui dépendent en grande partie des caractéristiques enzymatiques et physicochimiques des fibres. La viande qui est composée de tissu musculaire et de tissus conjonctifs et adipeux, est le produit de ces modifications.

Il existe trois grandes phases dans la transformation du muscle en viande (Figure 7)

La première phase, qui dure 20 à 30 minutes chez les bovins, correspond à l'état pantelant et elle correspond à la durée de survie du système nerveux.

La seconde phase correspond à l'état rigide ou *rigor mortis*. Le muscle en *pré rigor* est extensible et peut être allongé de façon réversible car il reste de l'ATP dans le muscle (Bendall, 1973). Quand le niveau d'ATP chute en dessous de 0,1 $\mu\text{moles/g}$, les filaments de myosine forment des ponts avec les filaments d'actine qui les chevauchent et le muscle ne peut plus être étiré. Pendant cette phase, le tissu musculaire perd de son élasticité.

La troisième phase correspond à l'état mûré. Pendant cette phase, le muscle peut à nouveau être étiré mais l'étirement n'est plus réversible. La dureté diminue de 80% après 10 jours de stockage à 4°C. Elle atteint, alors, une valeur finale moyenne de 4 N/cm^2 chez les bovins (Ouali, 1990a). La maturation reste fonction de l'ATP et du pH. En effet, la maturation des fibres commence dès que tout l'ATP est épuisé, celle du muscle dès que le pH ultime est atteint (Devine et al., 1993).

La vitesse et l'intensité de la maturation varient considérablement suivant les espèces et les muscles et conditionnent finalement les qualités organoleptiques de la viande et en particulier la tendreté (Got, 1997).

2-2. LA SAIGNEE

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 cette opération. Toutefois, dans le muscle, le sang résiduel ne dépasse pas 5 à 10%.

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. La privation d'oxygène diminue considérablement son pouvoir d'oxydation et seuls les mécanismes anaérobies continuent de fonctionner : il en résulte un ensemble de modifications du métabolisme avec des répercussions sur la structure même du tissu (Monin, 1988).

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 subis par l'animal dans les minutes qui précèdent la saignée (Warris, 1978).

2-3. INSTALLATION DE LA RIGIDITE CADAVERIQUE

2-3.1. Description du phénomène

Au moment de l'abattage, le pH du muscle varie entre 6,9 et 7,2 en fonction de son état physiologique. Malgré la mort de l'animal consécutive à la saignée, les mécanismes de maintien de l'homéostasie continuent de fonctionner dans la cellule pendant un certain temps. Toutefois, l'arrêt de la circulation sanguine supprime l'apport d'oxygène et de substrats énergétiques exogènes (glucose, acides aminés, et acides gras). Les seules réactions qui persistent suivent des voies anaérobies, essentiellement la glycolyse. Le principal substrat énergétique est le glycogène. La phosphocréatine, présente en moindre quantité (quelques µg/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 première 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 car la glycolyse est une voie de synthèse peu performante. 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).

En fait, ce phénomène se déroule par étapes. (1) *Une période de latence* <état pantelant> (20 à 30 minutes dans le cas du bovin) durant laquelle l'extensibilité du muscle reste constante, à la valeur qu'elle présentait au moment de l'abattage ; la durée de cette phase varie largement selon le niveau des réserves énergétiques du muscle, elle peut être pratiquement nulle chez des animaux épuisés, pour lesquels l'absence de réserves s'oppose à la resynthèse de l'ATP, (2) *Une période d'installation* qui voit la décroissance rapide des réserves énergétiques (phosphocréatine, ATP, glycogène) ; l'annulation progressive de l'extensibilité et l'acidification (pH ultime compris entre 5,3 et 6,0) ; durée très variable en fonction du type de muscle et de l'espèce animale (quelques heures <6-10h voire moins> chez le porc contre 24h ou plus chez le bovin), (3) *Rigor installée* au cours de laquelle le muscle est parfaitement inextensible (Ouali, 1990a).

En fait, dans le muscle *post mortem* après l'établissement de la *rigor mortis*, il peut rester de l'ATP résiduel mais le pH est alors trop bas pour permettre l'activité de l'ATPase des têtes de myosine, c'est pourquoi l'actomyosine n'est pas dissociée.

3 - Mécanismes impliqués dans le processus de maturation

L'installation de la rigidité cadavérique (ou *rigor mortis*) est directement perceptible sur la carcasse : la musculature devient progressivement raide et inextensible dans les heures qui suivent la mort de l'animal.

3.1. TENSION ET RACCOURCISSEMENT

Immédiatement après l'abattage, les interactions entre les filaments d'actine et de myosine sont inhibées par la troponine et la tropomyosine. Cette inhibition est levée en présence d'une concentration en Ca^{++} supérieur à 10^{-6} M. Or, la concentration de Ca^{++} augmente fortement dans l'espace myofibrillaire du fait de l'inhibition de la pompe à calcium, localisée dans la membrane du réticulum sarcoplasmique, par la diminution du taux d'ATP et baisse du pH (Marsh *et al.*, 1974). Les sites de liaisons de la myosine sur les filaments d'actine sont alors libres : la contraction musculaire est rendue possible. Les filaments d'actine glissent le long des filaments de myosine, ce qui entraîne un raccourcissement de la longueur des sarcomères (Cassens *et al.*, 1963). Lors du glissement, de l'ATP est utilisé et transformé en ADP. Tant qu'il reste suffisamment d'ATP dans le muscle, celui-ci reste élastique (Follett *et al.*, 1974) puisque la séparation de la liaison actine-myosine nécessite de l'ATP.

L'amplitude du raccourcissement est très variable. La température est le principal facteur affectant le raccourcissement. Lorsque l'ATP est disponible en quantité suffisante, les températures basses ($< 10^{\circ}\text{C}$) induisent une contracture appelée *contracture au froid* (Locker et Hagyard, 1963). Lorsque la température appliquée au cours de l'installation de la *rigor mortis* augmente au delà de 20°C , l'intensité de la contracture augmente (Locker et Hagyard, 1963). L'augmentation de la diffusion de calcium dans le sarcoplasme, ainsi que l'activation des réactions biochimiques accompagnant l'installation de la *rigor mortis*, expliquent l'effet des températures élevées sur l'amplitude du raccourcissement (Bendall, 1973). L'amplitude de la contracture *post mortem* peut être estimée en mesurant la longueur des sarcomères.

Lorsque le taux d'ATP n'est plus que de l'ordre de $0,1 \mu\text{mol/g}$ de tissu frais, les liaisons actine-myosine ne peuvent plus se défaire : le muscle entre en *rigor mortis*. En fait, l'installation de la *rigor mortis* est une contracture très lente et irréversible ; après l'installation de la *rigor*, toute contraction est rendue impossible. Toutes les fibres d'un même muscle n'entrent pas en *rigor* en même temps, si bien que l'installation de la *rigor mortis* dans le muscle s'effectue depuis des valeurs d'ATP de $1 \mu\text{mol/g}$ à 20°C pour un pH de 5,9, jusqu'à des valeurs inférieures à $0,1 \mu\text{mol/g}$ pour un pH de 5,5 (Hamm, 1982). La durée de l'installation de la *rigor mortis* dépend du stock initial de phosphocréatine et de glycogène, mais également de la température à laquelle le muscle est conservé.

3.2. Evolution de l'osmolarité

Au cours de l'installation de la rigidité cadavérique, Ouali (1991) a trouvé que la pression osmotique croît jusqu'à atteindre une valeur de 0,553 osmoles pour le muscle *Longissimus* en *rigor*, ce qui correspond chez le bovin à des valeurs de force ionique comprises entre 0,2 et 0,3 M, presque deux fois supérieures à la valeur physiologique. L'augmentation de la pression osmotique est due à la formation de métabolites et à la libération dans le cytoplasme d'ions inorganiques libres initialement concentrés dans les organites tels que le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries. La chute du pH observée au cours de l'installation de la *rigor mortis* en parallèle à l'augmentation de la pression osmotique (Ouali, 1992). En effet, le pH ultime du muscle (5,3-6,0) étant proche du point isoélectrique des protéines (5,0), la charge globale des protéines décroît et leur capacité à lier les ions diminue. Ceci entraîne une libération dans le cytoplasme des ions qui sont normalement complexés aux protéines ; ceci est particulièrement vrai pour les ions très liés aux protéines tels que le Mg^{++} et le Ca^{++} . De plus, la perte de l'intégrité cellulaire avec la rupture des membranes qui intervient au cours de l'établissement de la *rigor mortis* entraîne une libération d'ions dans le cytosol (Bonnet *et al.*, 1992).

L'osmolarité peut être estimée directement sur le tissu musculaire entier, en mesurant les points de congélation ou décongélation de l'eau intramusculaire, ou par mesure à partir du jus extrait par centrifugation ou compression de la viande (Bonnet *et al.*, 1992).

3.3. Modification de l'espace intramyofibrillaire

Des changements s'opèrent dans le réseau myofibrillaire. Chez le porc, une diminution de l'espace intramyofibrillaire a été observée par microscopie électronique en fonction du temps *post mortem* : le diamètre des myofibrilles diminue et la densité des filaments épais augmente (Dutson *et al.*, 1974). Des résultats similaires ont été trouvés par diffraction aux rayons X chez le bovin (Offer et Knight, 1988). Troy et Tarrant (1987) montrent que pendant les trois premières heures après l'abattage, la diminution de l'espace entre les filaments est très rapide alors qu'ensuite elle est plus lente jusqu'à 24 heures *post mortem*.

3.4. Modification de l'espace extracellulaire

Les espaces entre les cellules sont également modifiés lors de l'entrée en *rigor*. Chez la souris, après incubation des muscles dans une solution d'insuline, l'espace extracellulaire augmente 1 heure *post mortem* et, à 4 heures *post mortem*, une fois la *rigor mortis* installée il

est égal à 136% de la valeur de l'espace extracellulaire juste après l'abattage (Heffron et Hegarty, 1974). Des résultats similaires ont été trouvés chez le bovin en utilisant la même technique (Currie et Wolfe, 1980) et chez le porc à partir de coupes musculaires (Penny, 1977). De plus, ces espaces augmentent d'autant plus que le pH chute rapidement après la mort (Bendall et Swatland, 1988).

3.5. Evolution du pouvoir de rétention d'eau

Après l'abattage, le pouvoir de rétention d'eau du muscle, c'est-à-dire sa capacité à retenir l'eau, diminue considérablement. Les protéines myofibrillaires perdent leur affinité avec l'eau lorsque le pH diminue et approche du point isoélectrique des protéines (Heffron et Hegarty, 1974 ; Offer et Knight, 1988). La fixation des filaments d'actine et de myosine entraîne une réduction du volume myofibrillaire et une diminution du pouvoir de rétention d'eau dans les premières heures suivant l'abattage (Hamm et van Hoof, 1974). Le muscle perd alors de l'eau. L'exsudation spontanée ou « drip » de la viande de porc est proportionnelle au degré de contraction du muscle lors de l'entrée en *rigor* (Offer, 1983).

La capacité de rétention d'eau peut être estimée de différentes manières : par compression, centrifugation, ultracentrifugation, gravité, capillarité ou résonance magnétique nucléaire (Trout, 1988).

3.6. La maturation

Il est traditionnellement admis que la maturation constituait la période d'évolution *post mortem* apparaissant après l'établissement de la *rigor mortis*, encore que la plupart des événements hydrolytiques qui s'y déroulent, débutent dans les premiers moments suivant le sacrifice (Joseph et Connolly, 1977). 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).

3.6.1. Modifications physiques

Sur le plan morphologique, une certaine modification va se produire. 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 sans pour autant que les bandes I s'agrandissent et que les zones H visibles lorsque le muscle est en état de relaxation ne soient détectées.

La vitesse et l'importance des altérations perceptibles au niveau des stries Z sont fonction des espèces mais aussi du type métabolique des fibres musculaires (Cook et Wright, 1966). Les fibres de type blanc montrent un degré d'altération des stries Z en cours de maturation plus élevé que les fibres rouges (Abbott *et al.*, 1977). La détérioration de la strie Z se produit semble-t-il surtout en début de maturation et ne paraît pas reliée à l'augmentation de la fragilité de la structure myofibrillaire mise en évidence par des ruptures de myofilaments à l'assemblage strie Z bande I (Gann et Merkel, 1978).

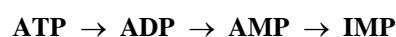
Au niveau de la bande I, on remarque parfois, après une durée de stockage proportionnellement longue une rupture de la myofibrille à ce niveau, rupture qui semble se produire au niveau d'une structure transversale appelée Ligne N₂ qui se situe dans la bande I (Ouali, 1990b).

3.6.2. Transformations biochimiques

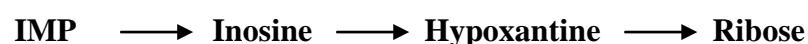
Comme on l'a signalé auparavant, la *rigor mortis* survient quand le niveau de l'ATP dans le muscle chute à 1,0 mM/g. L'ATP n'est pas seulement une source d'énergie puissante nécessaire à la contraction musculaire chez l'animal vivant mais elle agit également comme agent plastifiant en assurant la dissociation du complexe actine-myosine et donc la relaxation musculaire.

La cinétique de l'hydrolyse de l'ATP, a défini les modalités d'installation de la *rigor*. A cette hydrolyse correspond l'apparition d'IMP (l'inosine monophosphate), par désamination de l'AMP (l'adénosine monophosphate).

L'IMP serait le produit final de la chaîne de réaction :



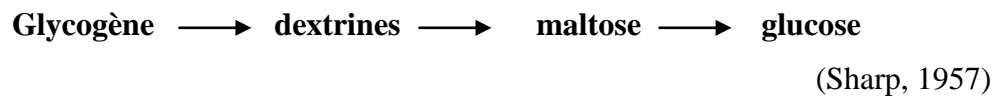
L'IMP n'est pas le terme ultime de dégradation des nucléotides ; il est lui-même déphosphorylé, il apparaît de l'inosine qui, progressivement, se scinde en hypoxantine et en ribose libre :



L'accumulation d'hypoxantine est un bon indice de l'état de maturation (Howard *et al.*, 1960).

Le catabolisme des nucléotides s'accompagne donc d'une libération de NH_3 et de phosphore inorganique libéré provient aussi des sucres phosphorylés, intermédiaires de la glycolyse.

Le catabolisme de glycogène se poursuit bien après l'arrêt de la glycolyse, sans doute sous l'action combinée d'amylase, d'amylo 1,6 glycosidase et de maltase selon une chaîne de réaction du type :



Ce processus hydrolytique s'installerait dès les premiers instants suivant la mort, mais son rendement est d'environ dix fois plus faible que la première étape de la glycolyse ; par contre, il se maintient tant qu'il reste du glycogène. Une balance du catabolisme du glycogène fait apparaître que *post mortem* la somme du glycogène, des sucres réducteurs et d'acide lactique est constante, donc que le glycogène est dégradé en glucose et acide lactique d'une manière approximativement stœchiométrique (Bodwell *et al.*, 1965 ; Valin et Charpenter, 1969).

3.6.3. Modifications structurales

3.6.3.1. Evolution des protéines

La disparition des réserves énergétiques du muscle et l'acidification du milieu placent les différentes fractions protéiques dans des conditions favorables à leur dénaturation. La dénaturation des protéines peut se traduire par des changements de conformation provoquant des démasquages de groupe, des modifications de propriétés de solubilité et une augmentation de la sensibilité aux enzymes protéolytiques.

Protéines sarcoplasmiques

Si globalement on registre une évolution marquée des propriétés de solubilité des protéines musculaires en cours de maturation, la majeure partie de ces variations est imputable aux protéines myofibrillaires. La composition de cette fraction ne subit pas de changements pendant le stockage *post mortem* à des températures de 5°C ou moins (Ouali, 1976). Cependant compte tenu des valeurs atteintes par le pH ultime lors de l'installation de la

rigor mortis, les protéines sarcoplasmiques peuvent influencer considérablement sur la solubilité globale et sur celle des protéines myofibrillaires. Les protéines sarcoplasmiques sont très sensibles au couple pH-température lors de l'installation de la *rigor mortis*. Pour des températures élevées associées à des pH bas on constate une forte dénaturation de ces protéines qui précipitent sur la structure myofibrillaire dont elles diminuent la solubilité. Une température élevée lors de la glycolyse *post mortem* entraîne des précipitations importantes qui affectent surtout la fraction des globulines et de la créatine phosphokinase (Scopes, 1964).

Brown et Dolev (1963) ont observé que pendant la conservation à l'état congelé, la myoglobine, pigment de la viande, subit une dénaturation progressive en cours de maturation qui se traduit par une augmentation significative de sa vitesse d'autoxydation.

La dénaturation plus ou moins accentuée subie par ces fractions protéiques *post mortem* devrait constituer un facteur favorable au développement d'une activité protéolytique à leur niveau.

Exprimés en termes ultimes de dégradation des protéines en acides aminés libres, tous les résultats concordent pour conclure à un faible niveau d'activité protéolytique en cours de maturation (Davey et Gilbert, 1966). Dans le cas de muscle de bovin en 15 jours de maturation à 4°C on n'enregistre qu'une tendance à l'augmentation de la teneur en azote aminé libre (Valin *et al.*, 1975).

La faible activité protéolytique observée s'explique vraisemblablement par les caractéristiques des systèmes hydrolytiques mis en jeu dans ces transformations.

Protéines myofibrillaires

Des modifications affectent la structure myofibrillaire en cours de maturation, peuvent être résumées globalement par à :

- un affaiblissement des interactions protéines-protéines accompagné d'une évolution des propriétés de solubilité du système ;
- la fragilisation progressive de l'image des stries Z plutôt que sa destruction allant de pair avec l'exclusion de l' α -actinine de la structure myofibrillaire (Taylor *et al.*, 1995) ;
- une attaque protéolytique d'un composé du filament fin, la troponine T, avec l'apparition d'un fragment de 30 kDa (MacBride et Parrish, 1977). La disparition de la troponine T intervient peut être dans l'attendrissage car elle fait partie intégrante du filament fin et sa dégradation *post mortem* peut entraîner une diminution des interactions actine-myosine (Uytterhaegen *et al.*, 1992). Pour d'autres, elle est un indice de la protéolyse mais elle n'est pas responsable de l'attendrissage car elle n'apparaît pas dans tous les muscles

(Greaser et Fritz, 1995). Ouali *et al.* (1983) ont mis en évidence que chez le bœuf, l'apparition du fragment de 30 kDa est concomitante avec la disparition de la troponine T mais pas chez le lapin. Il a été démontré que le fragment de 30 kDa apparaissant lors du stockage à 4°C est bien un produit de la dégradation de la troponine T ; cependant d'autres produits de dégradation provenant d'autres protéines myofibrillaires peuvent également migrer au niveau de cette bande (Negishi *et al.*, 1996).

Il résulterait de l'ensemble de ces modifications une fragilisation progressive de la structure myofibrillaire, contemporaine de l'augmentation de la tendreté en cours de maturation.

La myosine et l'actine sont également dégradées *post mortem* lors du stockage à 4°C, la myosine libérant des fragments S1 et l'actine conduisant à l'apparition de fragments peptidiques migrant au voisinage de la tropomyosine (Greaser et Fritz, 1995).

Protéines régulatrices

Pour certains, les propriétés et les structures de la troponine et de la tropomyosine ne seraient pas modifiées au cours de la maturation de la viande. Les altérations affecteraient seulement leur mode de liaison à l'intérieur de la structure myofibrillaire. D'autres considèrent que ces protéines subissent une dénaturation suffisante pour les empêcher d'assurer leur fonction de régulation (Ouali, 1976).

Protéines du cytosquelette

La dégradation des filaments intermédiaires et des costamères se produisent rapidement après la mort de l'animal.

La nebuline est dégradée complètement en 48 h à 4°C (Taylor *et al.*, 1995) et cette dégradation est responsable de l'augmentation de l'extractibilité de l' α -actinine *post mortem*.

La titine T1 est dégradée *post mortem* en titine T2 plus un fragment de 1200 kDa (Matsura *et al.*, 1991).

Huff-Lonergan *et al.* (1996) ont mis en évidence que la desmine est dégradée *post mortem* en un polypeptide de 38 kDa. Elle intervient certainement dans l'attendrissage de la viande puisque sa dégradation est concomitante avec celle de la troponine T (Hwan et Bandman, 1989). Robson *et al.* (1984) ont montré que sa dégradation serait responsable de la réduction de l'alignement des sarcomères des myofibrilles adjacentes qui se produit *post mortem*.

Pendant les premières heures *post mortem* la vinculine est dégradée, produisant un fragment de 90 kDa, ainsi que la dystrophine est dégradée particulièrement entre 24 h et 72 h *post mortem* (Taylor *et al.*, 1995).

La filamine est dégradée et sa dégradation interviendrait dans l'attendrissage en écartant les liens qui fixent les myofibrilles dans leur position latérale et en fragilisant les liens qui connectent les myofibrilles au sarcolemme (Taylor *et al.*, 1995 ; Uytterhaegen *et al.*, 1994).

L' α -actinine n'est pas dégradée au cours de la conservation à 4°C (Goll *et al.*, 1991).

Protéines du tissu conjonctif

L'étude de l'évolution *post mortem* du collagène, composé majeur du tissu conjonctif, n'a jamais révélé de transformations comparables par leur ampleur à celles qui affectent la structure myofibrillaire.

La maturation peut introduire des modifications discrètes dans la structure du collagène, modifications qui ne se révèlent que lorsque l'on étudie la solubilité hydrothermique de ce composé à des températures supérieures à 50°C. Ce point semble confirmé par les résultats de Kruggel et Field (1971) et de Pfeiffer *et al.* (1972), ces derniers mettant en évidence une légère dépolymérisation du collagène intramusculaire lors d'une conservation de 3 semaines. Cette dégradation est responsable de la fragilisation du tissu conjonctif (Figure 8) et participerait à l'attendrissage de la viande (Nishimura *et al.*, 1995, 1996). Les systèmes hydrolytiques lysosomaux sont peut être responsables de ces transformations dont l'ampleur limitée ne résulterait simplement que du faible relargage *post mortem* de ces enzymes hydrolytiques.

Cependant, la tendreté observée dans le muscle *Longissimus lumborum* de porc n'était pas corrélée avec la quantité de collagène totale ou à la nature des liaisons intermoléculaires de ce dernier (Avery *et al.*, 1996).

D'une façon générale la structure du collagène et les propriétés mécaniques du tissu conjonctif ne sont guère affectés lors de la maturation de la viande.

4. Attendrissement de la viande et mécanismes impliqués dans le processus de maturation

Après l'abattage de l'animal, la carcasse subit des modifications contribuant en particulier à son attendrissement, 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 attendrissement du muscle (Figure 9).

Le processus d'attendrissement pour la viande n'est pas encore totalement compris et fait l'objet de nombreuses controverses. Le taux d'attendrissement varie entre les différentes espèces de mammifères avec 80% d'attendrissement réalisé en environ cinq jours après la mort de l'animal pour le porc, et deux 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'attendrissement est très rapide, totalement accompli en 48 heures (Pette et Staron, 1990).

La tendreté ultime de la viande résulte de la nature et de l'ampleur des dégradations qui affectent *post mortem*, le collagène et les myofibrilles. Le collagène ne subit pas de transformations importantes durant la maturation et sa concentration ainsi que son degré de réticulation vont définir la dureté basale de la viande permettant la distinction entre viandes à bouillir et viandes à griller. Le développement de la tendreté est donc la conséquence des transformations affectant la structure contractile et ses composants (Ouali, 1990a).

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

4-1. MECANISMES PHYSICO-CHIMIQUES

4.1.1. 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 de valeurs de +6 à +8°C pendant le stockage 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 *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 premières 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).

4.1.2. 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. 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, elle est minimale à 17°C, puis elle augmente quand la température augmente mais aussi quand la température diminue. Les muscles dont le pH a chuté très lentement, sont généralement 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, s'abaisse 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 était enregistrée pour des valeurs de pH variant de 5,7 à 6,0.

Plusieurs travaux suggèrent que la relation négative entre la tendreté et le pH ultime, lorsque ce dernier varie de 5,7 à 6,0, pourrait être due à une augmentation corrélative du degré de contraction des myofibrilles. Cette hypothèse est appuyée par la corrélation négative entre le pH ultime et la longueur des sarcomères (Bouton *et al.*, 1973 ; Purchas, 1990 ; Guignot *et al.*, 1992). L'augmentation de la tendreté enregistrée lorsque le pH ultime augmente au-delà de pH 6,0, a été attribuée à une amélioration conjointe de la capacité de rétention d'eau de la viande (Purchas, 1990). La relation curvilinéaire entre le pH ultime et la tendreté pourrait également refléter des différences dans l'intensité de la protéolyse au cours de la maturation.

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 Ca^{++} et 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).

4.1.3. 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 10) 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 métabolite 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.

4-2. *MECANISMES 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.

5. Protéases dans le contexte de la viande

La transformation du muscle en viande repose très largement sur des mécanismes biochimiques qui après la mort des animaux, modifient plus ou moins profondément la composition et la structure du muscle.

L'installation de la rigidité cadavérique (*rigor mortis*) dans les instants qui suivent l'abattage correspond, sur un plan physique, à la perte des propriétés d'élasticité du tissu musculaire et elle est accompagnée dans tous les cas d'un durcissement de la viande et en général d'une baisse du pH musculaire. Par la suite, au cours de la phase dite de maturation la tendreté de la viande s'accroît progressivement. Cet attendrissement correspond essentiellement à des modifications induites au niveau des protéines musculaires de structure, protéines contractiles et du cytosquelette, par des systèmes protéolytiques endogènes (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.

5-1. GENERALITES SUR LES PROTEASES

L'hydrolyse des protéines ou polypeptides est une réaction qui implique la dégradation de liaisons peptidiques, sous l'action des protéases, et qui mène à la libération de fragments plus ou moins longs appelés peptides. Barrett (1994) a classifié les changements structuraux associés à l'hydrolyse d'une protéine : a) l'augmentation du nombre de groupements ionisables (NH_3^+ et COO^-), ce qui augmente l'hydrophilicité et la charge nette ; b) la diminution du poids moléculaire des chaînes peptidiques, ce qui augmente leur digestibilité et contribue à réduire leur potentiel allergène ; c) l'exposition des sites hydrophobes autrement enfouis dans la structure protéique, ce qui peut diminuer la solubilité des peptides. Le degré d'hydrolyse de la protéine et la spécificité de l'enzyme pour son substrat sont les deux principaux facteurs qui influencent les caractéristiques finales d'un hydrolysate protéique.

Les protéases sont des enzymes spécialisés 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, incluant 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. Les *endoprotéases* (protéinases) hydrolysent les protéines au niveau de sites internes spécifiques (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).

5-2. LES EXOPROTEASES ET LES ENDOPROTEASES SUSCEPTIBLES D'INTERVENIR DANS L'ATTENDRISSAGE

5-2.1. Les exoprotéases (peptidases)

Les exoprotéases hydrolysent les chaînes peptidiques en libérant des acides aminés ou des dipeptides à partir de leurs extrémités N- ou C-terminales.

Toutes les exoprotéases n'agissent en règle générale que sur des polypeptides de petite taille. C'est pourquoi on leur donne parfois le nom de peptidases vrais, par opposition aux endoprotéases (encore appelées protéinases) qui agissent sur les chaînes plus longues.

Ashgar et Bhatti (1987) ont classé les peptidases sur la base de leur spécificité d'action, spécificité liée à la fois au substrat, au site d'action (extrémité N- ou C-terminale) et à la nature des produits libérés (acides aminés ou dipeptides). Les peptidases ont ainsi été divisées en carboxypeptidases, aminopeptidases, dipeptidases et dipeptidyl-peptidases.

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.

a). Les carboxypeptidases (EC 3.4.17)

Ces enzymes exigent la présence d'une charge négative au voisinage de la liaison peptidique scindée. Elles s'attaquent donc à l'*extrémité carboxylique terminale* (C-terminale) du polypeptide. On en distingue deux types principaux, A et B, et un certain nombre de variétés à spécificité plus étroite.

Dans le muscle sont présentes : A) **carboxypeptidase A** « cathepsine A » (EC 3.4.17.1). C'est une enzyme fonctionnant avec Zn^{++} et résultant de l'activation de la procarboxypeptidase A sous l'action de la trypsine. Elle assure la libération de tous les amino-acides à l'extrémité C-terminale, à l'exception de l'arginine, de la lysine (amino-acides basiques) et de la proline (ou de l'hydroxyproline). Son poids moléculaire est de 100 kDa, son pH optimum est de 5,5 et elle est localisée dans les lysosomes. Elle est facilement extraite du pancréas. L'activité de la carboxypeptidase A semble maximale lorsque le résidu amino-acyl C-terminale est la phénylalanine ; elle est stable à la chaleur et aux pH alcalins dans le

muscle. L'activité de cette enzyme est également plus importante dans les muscles rouges que dans les muscles blancs. B) **carboxypeptidase B** « cathepsine B » (EC 3.4.17.2). C'est encore une métalloprotéine à Zn^{++} . Elle résulte de l'activation de la procarboxypeptidase B sous l'action hydrolysant de la trypsine. Elle est présente dans le muscle cardiaque et dans le muscle strié. Elle libère essentiellement les résidus C-terminaux de L-lysine et de L-arginine, d'où son nom de protaminase ou de peptidyl-L-lysine (arginine) hydrolase. Son poids moléculaire est de 47 kDa, son pH optimum est de 5,5-6,0 et elle est localisée dans les lysosomes. On la prépare à partir du pancréas de porc ou de bovin (Barret, 1977 ; Valin, 1985 ; Goll *et al.*, 1989 ; Harper, 2000).

b). Les aminopeptidases (EC 3.4.11)

Ces enzymes exigent la présence d'une charge positive au voisinage de la liaison peptidique scindée. Elles s'attaquent donc à l'extrémité aminée terminale (N-terminale) du polypeptide.

Il en existe 2 sortes dans le muscle : A) **leucine-aminopeptidase** « α -amino-acyl-peptide hydrolase cytosolique » (EC 3.4.11.1) qui est inactive aux pH inférieurs à 7,0, son poids moléculaire est de 150 kDa. C'est une métallo-protéine à Zn^{++} . Extraite du rein, sa spécificité est très large. Les techniques immunohistochimiques permettent de la situer dans la région du sarcolemme. Elle agit pratiquement au niveau de tous les résidus amino-acyl N-terminaux, sauf les L-lysyl et L-arginyl. Elle possède aussi une activité estérasique. Elle est activée par les métaux lourds (Goll *et al.*, 1989, Harper, 2000). B) **arylamidases** « cathepsines III » (EC 3.4.11.12). L'activité arylamidase est plus élevée dans le muscle rouge que dans le muscle blanc des animaux de la même espèce. Ces enzymes sont au nombre de 3 (neutre « 257 kDa », acide, basique « 105 kDa »), dont les pH optimal d'activité sont différents. Elles ont un très large spectre d'activité, incluant pratiquement tous les résidus amino-acyl N-terminaux, y compris les L-lysyl et L-arginyl et elles sont localisées dans le cytosol (Barrett, 1977, Valin, 1985).

c). Les dipeptidases (EC 3.4.13)

Ces enzymes exigent à la fois la présence d'une charge positive et d'une charge négative au voisinage immédiat de la liaison peptidique scindée.

Elles clivent les dipeptides en 2 acides aminés libres, leur localisation cellulaire est cytosolique. Quatre ont été recensées dans le muscle : A) **prolyl-dipeptidase** « prolinase » (EC 3.4.13.8), qui nécessite une proline ou une hydroxyproline N-terminales. Dans le muscle, son

pH optimum est de 8,0 ; elle est activée par Mn^{++} ; son poids moléculaire est de 300 kDa. B) *glycyl-leucine-dipeptidase* (EC 3.4.13.11). Son pH optimum est voisin de 8,0. Elle est activée par les ions Zn^{++} dans le muscle de rat et par Mn^{++} et Ca^{++} dans le muscle de lapin. C) *proline- dipeptidase* « prolidase » (EC 3.4.13.9), qui nécessite une proline C-terminale. Elle a un poids moléculaire de 108 kDa. C'est une imidopeptidase très largement distribuée dont le pH optimal est compris entre 7,5-8,2. D) *glycyl-glycine-dipeptidase* (EC 3.4.13.11) que l'on trouve dans les muscles lisse, strié et cardiaque a un pH optimal qui est compris entre 7 et 7,6 (Barrett, 1977 ; Valin, 1985 ; Goll *et al.*, 1989 ; Harper, 2000).

d). Les dipeptidylpeptidases (EC 3.4.14)

C'est une classe de transition entre les exoprotéases et les endoprotéases. Ce sont généralement des dipeptidylpeptide hydrolases qui libèrent un dipeptide à l'extrémité N-terminal à partir d'un polypeptide.

Elles sont au nombre de 4 dans le muscle : A) *dipeptidylaminopeptidase I* « cathepsine C » (EC 3.4.14.1) qui a été partiellement purifiée à partir de muscle strié. Dans le muscle la localisation de l'enzyme est lysosomale avec un poids moléculaire de 200 kDa et son pH optimum est de 5,0-6,0. L'activité de cette enzyme est plus élevée dans les muscles rouges que dans les muscles blancs. B) *dipeptidylaminopeptidase II* (EC 3.4.14.2) qui a un poids moléculaire de 130 kDa avec un pH optimum de 4,5-5,5. Cette enzyme est également d'origine lysosomale et catalyse la libération de dipeptides à partir des extrémités libres N-terminales Lys ou Arg qui ont une pénultième résidu prolyl. Cette enzyme a une activité faible dans le muscle mais l'activité croît dans le cas de dystrophie. C) *dipeptidylaminopeptidase III* (EC 3.4.14.4). Cette enzyme est cytosolique avec un poids moléculaire de 80 kDa. Elle libère des dipeptides à partir des extrémités N-terminales libres a pH 7-8. D) *dipeptidylaminopeptidase IV* (EC 3.4.14.5). Cette enzyme est lysosomale avec un poids moléculaire de 250 kDa. Elle catalyse la libération de dipeptides à partir des extrémités N-terminales libres quand le second résidu est un résidu prolyl. L'activité dans le muscle est faible (Barrett, 1977 ; Valin, 1985 ; Goll *et al.*, 1989 ; Harper, 2000).

5-2.2. Les endoprotéases (protéinases)

Les protéinases hydrolysent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des chaînes polypeptidiques, loin des extrémités. Leur spécificité de substrat est étroite et dépend de la présence d'acides caractéristiques.

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 classifier 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, sont présentes dans le tissu musculaire, c'est-à-dire fibres musculaires et cellules mononuclées identifiées dans ce tissu (fibroblastes, mastocytes, cellules satellites, leucocytes...) des protéinases appartenant aux quatre groupes de cette classification (Valin, 1985 ; Sentandreu *et al.*, 2002).

5-2.2. 1. Protéinases à sérine (EC 3.4.21)

Généralités

C'est une des familles d'enzymes la mieux caractérisée et étudiée actuellement. Les sérine protéinases sont retrouvées chez les virus, les bactéries et les eucaryotes. Elles ont une activité maximale à pH légèrement alcalin (8-9) (Bird et Carter, 1980). Ces enzymes participent à de nombreux processus physiologiques dont les plus connus sont la digestion, la coagulation sanguine, la fertilisation et l'activation du complément dans la réponse immunitaire (Reid *et al.*, 1986 ; Goldberger *et al.*, 1987 ; Baba *et al.*, 1989 ; Davie *et al.*, 1991 ; Twining, 1994). Or, un déséquilibre de la balance physiologique des niveaux élevés de protéinases ou d'inhibiteurs est à l'origine de plusieurs troubles pathologiques, par exemple l'emphysème (Watorek *et al.*, 1988), la métastase tumorale (Huber et Bode, 1978), et l'arthrite (Froelich *et al.*, 1993).

Cette grande famille comporte 22 familles reconnues, à ce jour, et six clans regroupent plusieurs familles ensembles, basées sur la ressemblance de leurs structures. Jusqu'à maintenant, Rawlings et Barrett (1994b) ont envisagé qu'il existerait au moins quatre origines d'évolution séparées, et peut-être beaucoup plus, des sérines protéinases provenant chacun d'une enzyme ancestrale. Seulement les structures tridimensionnelles de quatre clans de protéinases à sérine sont connues actuellement : chymotrypsine, subtilisine, carboxypeptidase et *Escherichia* D-Ala-D-Ala peptidase.

Parmi les protéinases à sérine on trouve la chymotrypsine (EC 3.4.21.1), la trypsine (EC 3.4.21.4), l'élastase (EC 3.4.21.36), la thrombine (EC 3.4.21.5), la plasmine (EC

3.4.21.7), la kallikréine (EC 3.4.21.35) et la subtilisine (EC 3.4.21.14). Les 3 premières font partie de la même famille (analogie assez forte de séquences) (Rawlings et Barrett, 1994b).

La caractérisation des structures tridimensionnelles de plusieurs sérine protéinases, y compris les complexes avec un substrat ou un inhibiteur, fut établie grâce à la cristallographie par rayons X, depuis la première détermination de la structure cristallisée de la chymotrypsine (Matthews *et al.*, 1967). Ces études cristallographiques importantes ont permis de comprendre les mécanismes de catalyse protéolytique, la spécificité pour le substrat, l'inhibition et l'activation ainsi que la description de la variation évolutive de la famille chymotrypsine (Neurath, 1984). Diverses caractéristiques structurelles sont communes à toutes les enzymes de cette famille. Toutes sont constituées de deux domaines homologues organisés en tonneau β à six feuillets. Puisque les membres de cette famille sont intrinsèquement des protéines sécrétées, les molécules sont initialement synthétisées comme une chaîne polypeptidique unique avec un peptide signal (préproenzyme) permettant d'atteindre la voie de sécrétion. Suite au passage à travers la membrane du réticulum endoplasmique, la majorité des enzymes sont sécrétées sous forme inactive (proenzyme ou zymogène) et subissent une maturation protéolytique sélective en N-terminal pour l'activation du zymogène en enzyme active. Cependant, la conversion du zymogène inactif de certaines enzymes sous la forme active exige une ou plusieurs excisions peptidiques internes, soit intramoléculaire (activité autocatalytique) soit intermoléculaire, comme la thrombine (Doyle et Haley, 1993) et la chymotrypsine (Appel, 1986).

L'unité catalytique, une chaîne polypeptidique d'environ 220 acides aminés, forme presque invariablement le domaine C-terminal. Le clivage protéolytique au N-terminal du domaine catalytique de la proenzyme dans la famille chymotrypsine génère une nouvelle extrémité N-terminal avec un acide aminé contenant une chaîne latérale hydrophobe. Le nouveau groupe N-terminal forme un pont salin avec Asp¹⁹⁴, qui amène à l'assemblage du site catalytique fonctionnel (Neurath, 1984). Les larges segments non catalytiques insérés entre le peptide signal et le domaine du zymogène (le domaine C-terminal) contiennent souvent une ou plusieurs copies de divers domaines avec des structures différentes. Ces grandes régions non catalytiques apparaissent surtout chez les protéinases du système fibrinolytique (e.g. plasmine) et de la coagulation sanguine (e.g. thrombine), et sont essentielles pour la spécificité biologique et la régulation de la cascade protéolytique des deux systèmes (Patthy, 1985). Par contre, ces modules régulateurs ne sont pas présents chez les protéinases digestives (e.g. chymotrypsine).

Plusieurs des membres de la famille chymotrypsine possèdent des ponts disulfures intradomaines qui aident à garder la molécule intacte et à maintenir la conformation des éléments du site actif. Parmi ces liens disulfures, trois ont été conservés tout au long de l'évolution : C42-C58, C168-C182, C191-C220 (Varallyay *et al.*, 1997). De plus, il a été montré que le pont disulfure C191-C220 est nécessaire pour l'activité maximale de la trypsine et de la chymotrypsine (Varallyay *et al.*, 1997). Malgré la variation de spécificité, les enzymes de cette famille utilisent le même mécanisme de catalyse protéolytique, qui implique un triade conservé des résidus catalytiques : Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ et Asp¹⁰². Ces trois résidus forment le système de relais des charges qui concourt à augmenter beaucoup le caractère nucléophile de la Ser¹⁹⁵ et à promouvoir son attaque nucléophile sur le lien peptidique pour son hydrolyse. De plus, ces acides aminés qui composent l'essentiel de la machinerie catalytique de sérine protéinases de type chymotrypsine sont hautement conservés et invariables dans leurs positions spatiales (Perona et Craik, 1997). Les résidus catalytiques sont distribués entre les deux domaines de l'enzyme : le domaine N-terminal contient His et Asp de la triade catalytique, alors que le domaine C-terminal comprend la Ser de la triade catalytique, la cavité oxyanionique et la spécificité des sites de liaisons des enzymes pour leur substrat. Quoique le mécanisme catalytique soit identique à tous les membres de la famille, la spécificité pour le substrat varie d'une enzyme à l'autre. Cette divergence de spécificité est essentiellement déterminée par plusieurs caractéristiques structurales du site de liaison de l'enzyme. Ces déterminants structuraux et fonctionnels qui sont responsables de la diversité de spécificité pour le substrat résident dans la différence du site S1 (site de fixation du substrat) et des boucles de surface de l'enzyme (Perona et Craik, 1997).

Les sérine protéinases hydrolysent le lien peptidique des substrats en deux étapes : 1) après la formation du complexe enzyme-substrat (ES), le groupement carbonyle du lien scissile P1 est attaqué par la triade (Ser, His, Asp) formant un intermédiaire oxyanionique. Cet état transitoire est stabilisé par la formation des liens hydrogène avec le résidu sérine. Ensuite, un proton est donné par l'histidine, et le fragment P1' se dissocie ; et 2) le fragment P1 est libéré de l'enzyme suivant l'addition d'une molécule d'eau, laquelle remplace le site actif libéré par la dissociation du premier fragment ; le transfert d'un proton additionnel mène à la libération du deuxième fragment (Appel, 1986 ; Krem *et al.*, 1999).

Les sérine protéinases et la tendreté de la viande

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). D'ailleurs

l'utilisation, *in vivo*, du composé '40/80' qui cause la dégranulation des mastocytes provoque la disparition de l'activité protéolytique observable à pH alcalin dans le muscle (Libby et Goldberg, 1990). 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 par les scientifiques de la viande 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'attendrissage de la viande. Cependant, tandis que quelques 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'attendrissage de la viande (e.g. *la teneur en inhibiteurs des sérines protéinases, la vitesse de chute de l'activité μ -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).

5-2.2. 2. Les protéinases qui ne sont pas à sérine

a) Les cystéine protéinases (EC 3.4.22)

Généralités

Les cystéine protéinases sont largement représentées tant dans le monde animal que végétal ainsi que chez les bactéries et les virus où elles sont impliquées dans de nombreux processus protéolytiques intra et extracellulaires. On distingue actuellement au minimum

vingt six familles distinctes de protéinases à cystéine (Barrett, 1998), dont la plus connue est sans doute celle de la papaine (EC 3.4.22.2).

Le site catalytique de ces enzymes comprend un résidu cystéine (constituant le groupement nucléophile) étroitement associé à un résidu histidine ce qui produit une structure dont le pK est voisin de 4 au lieu de 8 pour un groupe thiol typique. Par analogie avec les sérine protéinases on doit appeler ces enzymes cystéine protéinases plutôt que thiol protéinases (Valin, 1985).

Chez les mammifères l'enzyme la mieux connue de ce groupe est la cathepsine B (EC 3.4.22.1) de localisation lysosomale (Barrett, 1998). Par ailleurs deux cystéine protéinases calcium dépendantes non lysosomales ont été découvertes et purifiées à partir du muscle strié. Ces enzymes paraissent très largement responsables de la protéolyse à pH neutre dans le muscle.

➤ ***Les protéinases à cystéine cytoplasmiques calcium dépendantes (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. La présence de polypeptides possédant des similitudes avec l'activité calpaïne est retrouvée dans tous les types d'organismes incluant, les animaux, les plantes, les champignons ou les bactéries. Cela suggère fortement que les protéinases de type calpaïne aient des fonctions ubiquitaires essentielles à la vie.

Cette large famille est impliquée dans un grand nombre de régulations physiologiques aussi bien que dans certaines pathologies de façon directe ou indirecte. Par exemple, une activité augmentée de la m-calpaïne et de la μ -calpaïne est depuis longtemps considérée comme responsable de désordres neurologiques aigus (attaque d'apoplexie et dommages traumatiques du cerveau) et récemment de la maladie d'Alzheimer. La mutation non fonctionnelle du gène de la calpaïne 3 a été identifiée comme étant la cause de la dystrophie musculaire de type 2A ; le gène de la calpaïne 10 serait quant à lui responsable du diabète de type 2 ; la calpaïne 9 jouerait un rôle dans les cancers gastriques (Saito *et al.*, 1993 ; Kumamoto *et al.*, 1995, 1997 ; Guttman *et al.*, 1997, 1998 ; Ono *et al.*, 1998).

Ce système est composé de différentes isoformes de protéinases et d'un inhibiteur endogène, la calpastatine.

Les calpaïnes ubiquitaires. Au sein des calpaïnes, on distingue différents isoformes : la μ -calpaïne, la m-calpaïne. Ces deux enzymes, distribuées de façon ubiquitaire dans le cytosol des cellules à travers le monde animal, résident plus précisément dans le sarcomère, dans le sarcoplasme et sont aussi associées avec le sarcolemme. Il a été mis en évidence que ce système se situait principalement dans les zones intracellulaires (Kumamoto *et al.*, 1992). La m-calpaïne et μ -calpaïne sont nommées en fonction des concentrations calciques requises pour leur activité ; elles ont besoin de 0,2 à 1 mM de calcium pour la m-calpaïne et de 3-50 μ M pour la μ -calpaïne (Dayton *et al.*, 1976 ; Ishiura *et al.*, 1978). Elles sont encore appelées respectivement calpaïne II et calpaïne I. Cette numérotation correspond à l'ordre d'élution sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions (type DEAE). La calpaïne II a un caractère plus acide (pI= 4,6) que la calpaïne I (Dayton *et al.*, 1976). A noter la purification d'une autre forme ubiquitaire, intermédiaire aux deux précédentes sur la sensibilité au calcium. Cette forme est nommée μ /m-calpaïne (Sorimachi *et al.*, 1995).

Ces protéinases ont une structure hétérodimérique composée d'une grosse et d'une petite sous-unité (Figure 11). La plus grosse sous-unité est la partie active qui porte le site actif, elle est dite catalytique et la petite sous-unité est la partie régulatrice. Le rôle de cette dernière n'est pas clairement défini, mais il pourrait être de stabiliser la sous-unité catalytique.

Plus précisément, les deux isoformes μ -calpaïne et m-calpaïne d'un grand nombre d'espèces sont des hétérodimères avec une petite sous-unité de 25-30 kDa et une grosse sous-unité de 72-82 kDa. La petite sous-unité est identique pour les deux isoformes et est codée par un simple gène. Les séquences en acides aminés de la grosse sous-unité pour la μ -calpaïne et la m-calpaïne présentent environ 50% d'homologie (Sorimachi *et al.*, 1997).

La structure des calpaïnes est partagée en 6 domaines. Les domaines I, II, III et IV constituent la grosse sous-unité et les domaines V et VI composent la petite sous-unité. Chaque domaine a un rôle précis : le domaine I comporte l'extrémité N-terminale de la sous-unité catalytique : sa fonction n'est pas clairement établie, mais comme il contient le site de clivage autolytique, il doit jouer un rôle important dans les processus d'activation des calpaïnes. Le domaine II est le domaine qui possède l'activité cystéine protéinase et peut être subdivisé en deux parties : IIa et IIb avec une zone de fixation du substrat entre les deux. Le site actif de l'enzyme est composé d'une triade d'acides aminés : Cys (105) localisé sur la zone IIa et His (262) et Asp (286) localisés sur la zone IIb. En l'absence de calcium, les acides aminés Cys (105) et His (262) sont trop éloignés pour permettre l'action de l'enzyme. Il a été suggéré que la présence de calcium induise un changement de conformation de l'enzyme qui rapproche les sous-unités IIa et IIb, autorisant alors à la triade Cys (105)-His

(262)-Asp (286) d'être fonctionnelle. Le domaine III représente le lien entre le domaine catalytique et le domaine IV de fixation du calcium. Un rôle dans la médiation du signal calcique à l'enzyme a été proposé. Il a également été suggéré que ce domaine puisse interagir avec la calpastatine, principal inhibiteur endogène de la calpaïne. Le domaine IV de la sous-unité catalytique est hautement similaire au domaine VI de la sous-unité régulatrice. Ces domaines contiennent cinq motifs de fixation du calcium. Les quatre premières structures sont similaires à celles observées dans la calmoduline et sont capables de fixer le calcium. Le cinquième motif ne réagit pas avec le calcium mais servirait de site de liaison homophile entre les domaines IV et VI. Le domaine V est une région riche en glycine et hydrophobe, ce qui laisse à penser que cette partie de l'enzyme joue un rôle important dans l'interaction de la calpaïne avec les phospholipides membranaires et l'activation de l'enzyme (Sorimachi *et al.*, 1997 ; Perrin *et al.*, 2004).

Par leur composition en domaines et leur distribution dans les différents tissus, les membres de la famille calpaïne sont classifiés actuellement en trois groupes différents : calpaïnes ubiquitaires (μ , m et μ /m calpaïnes), calpaïnes spécifiques tissulaires (calpaïne 3 ou p94, calpaïnes nCl-2, nCl-4) et calpaïnes typiques (calpaïnes 5, 6, 10...) (Sentandreu *et al.*, 2002).

Les calpaïnes et la tendreté de la viande

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 μ -calpaïne et la m-calpaïne sont trouvées dans toutes les espèces d'animaux et la μ /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 μ - 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 μ M) est suffisante pour activer la μ -calpaïne (Koochmaraie *et al.*, 1987) mais pas 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 μ -calpaïne au cours de la maturation peut être due à son autolyse (Boehm *et al.*, 1998). Toutes ces observations conduisent à suggérer que la μ -calpaïne est principalement responsable de la dégradation *post mortem* et que la m-calpaïne joue un rôle mineur (Dransfield, 1993 ; Koohmaraie, 1996 ; Veiseth et Koohmaraie, 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 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 prévu 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 avait toujours été trouvée anormalement dure.

D'autres systèmes protéolytiques doivent donc intervenir dans l'attendrissage de la viande.

➤ *Les cystéine protéinases lysosomales (cathepsines)*

Il existe une large variété d'enzymes lysosomales. Elles sont stockées dans des lysosomes, qui sont de très petits organites sphériques (microscopiques) présents dans la plupart des cellules animales. Les cathepsines ont été découvertes en 1955 par De Duve *et al.* Au début le terme cathepsine a été appliqué aux protéinases extraites de tissus animaux (foie, rate, rein...) et distinctes des enzymes (pepsine, trypsine et chymotrypsine) sécrétées par le tractus gastrointestinal des mammifères. C'est pourquoi la terminologie « cathepsine » est appliquée à des enzymes très différents. Le terme « cathepsine » indique généralement des protéinases situées dans les lysosomes et la plupart du temps actives au pH acide.

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.

Les cathepsines sont impliquées dans de nombreux et importants processus biologiques : cathepsines B, H et L sont impliquées dans le développement des cancers par la dégradation de la matrice extracellulaire ou en activant d'autres protéases (Sloane, 1990). Des résultats récents suggèrent que les cathepsines puissent contribuer à la mort de cellules « apoptose » (Pennacchio *et al.*, 1998). Un règlement insatisfaisant de leurs activités a conduit à l'apparition des maladies telles que le cancer, l'artériosclérose, la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques ou les désordres musculaires (Kirschke *et al.*, 1995).

Les enzymes lysosomales sont synthétisées par les polysomes accrochés sur la membrane du réticulum endoplasmique rugueux. Toutes les enzymes lysosomales connues à ce jour sont synthétisées sous forme de préproenzymes. Le prépropeptide est situé du côté N-terminal de l'enzyme. Le prepeptide, qui correspond à la séquence signal, est excisé dans le réticulum endoplasmique. Le propeptide est coupé ensuite plus ou moins rapidement. Cette modification post-traductionnelle du proenzyme commence dans les vésicules prélysosomales et s'achève dans le lysosome (Chan *et al.*, 1986 ; Azuma *et al.*, 1989 ; Wiederanders *et al.*, 1992). Kominami *et al.* (1992) ont montré que la forme proenzyme est stable à pH physiologique et permet aux enzymes lysosomales, qui sont souvent inactivées à pH neutre, de passer, sans être dénaturées, du réticulum endoplasmique au lysosome.

Les cathepsines et la tendreté de la viande

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 jettent 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 (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 ; Koohmaraie *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 (Koohmaraie, 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' α -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 β -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 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 système protéolytique, un effet synergique des calpaïnes et des cathepsines doit être considéré (Ouali, 1992).

b) Les protéases à acide aspartique (EC 3.4.23)

Les protéinases à aspartate active dont le processus catalytique dépend particulièrement de la réactivité des chaînes latérales de deux résidus d'acide aspartique au site actif se retrouvent chez les eucaryotes, les champignons et les rétrovirus. Cette superfamille contient seulement trois familles : la famille pepsine, la famille rétropepsine et la famille pararétrovirus (Rawlings et Barrett, 1994a). Les protéinases aspartiques eucaryotiques ont une structure de nature bilobée, d'après les données cristallographiques, dans laquelle les deux domaines (lobes), possédant chacun un résidu Asp responsable de l'activité catalytique séparé par la crevasse du site actif ont plus ou moins des particularités topologiques similaires (Kay *et al.*, 1988).

Les aspartate protéinases et la tendreté de la viande

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' α -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).

c) Les métalloprotéinases (EC 3.4.24)

Il s'agit de la classe de endoprotéases de mammifère la moins connue. Les métalloprotéinases sont difficiles à étudier puisque elles ne sont pas en général stockées dans la cellule mais synthétisées en fonction des besoins.

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, et se retrouvent chez les procaryotes et les eucaryotes. La plupart des métalloprotéinases zinc-dépendant contiennent un motif HEXXH (His-Glu-Xaa-Xaa-His), identifié par cristallographie aux

rayons X, impliqué dans la liaison de l'atome de zinc. Le motif commun HEXXH renferme deux acides aminés histidines participant comme ligand à la coordination du Zn^{++} et un acide glutamique impliqué dans le mécanisme catalytique. Il y a environ 30 familles qui forment cette superfamille, et quelques familles sont regroupées en deux clans selon la nature du troisième ligand métallique participant à la liaison de Zn^{++} (Rawlings et Barrett, 1994b).

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 métalloprotéinases et la tendreté de la viande

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 plutôt que l'existence de zymogène (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-substrat ; le type II est attaqué beaucoup plus lentement que les types I et III. L'attaque protéolytique est également fonction de l'état physique du substrat, de son grade de polymérisation. Enfin les collagénases tissulaires présentent une variabilité assez large de poids moléculaire 33 kDa à 63 kDa et de charge selon la nature du tissu dont elles ont été extraites (Valin, 1985).

Puisque le collagène ne subit pas de changements drastiques pendant le stockage de la viande aux basses températures (0-4°C), les scientifiques de la viande ont peu étudié les métalloprotéinases. Cependant, l'absence des changements du tissu connectif est basée sur des facteurs qui sont mesurés habituellement (solubilité, changements structurels macroscopiques, degré de réticulation...) mais d'autres aspects moléculaires pourraient être impliqués. Ceux-ci incluent : la désorganisation de la jonction neuromusculaire, le changement du complexe

dystrophine qui traverse la membrane sarcoplasmique liant le cytosquelette intracellulaire à la membrane intérieure, la dégradation des protéines responsables de l'organisation spatiale des fibrilles de collagène telles que la colligine (Ball *et al.*, 1997) et la décorine (Weber *et al.*, 1996). Presque toutes les protéines impliquées dans ces structures sont susceptibles à la protéolyse par métalloprotéinases.

5-2.3. 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).

Le poids moléculaire du protéasome est estimé entre 700 et 800 kDa (Tanaka *et al.*, 1986 ; Tanaka *et al.*, 1988). L'étude par microscopie électronique montre la présence d'une partie cylindrique avec une structure dimérique formée par deux disques distincts (Tanaka *et al.*, 1988). A l'intérieur se trouvent les sites actifs assurant la protéolyse. Le protéasome eucaryotique est caractérisé par trois activités principales de spécificité différente : les activités d'hydrolyse de la chymotrypsine, de la trypsine et de la peptydyl-glutamyl-peptide (Coux *et al.*, 1996). 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. 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).

Le protéasome et la tendreté de la viande

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 (Koochmaraie, 1992). Dans les conditions réelles de stockage, après la mort de l'animal, ces protéines myofibrillaires ne sont habituellement pas dégradées.

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' α -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. La calpaïne donnerait des peptides hydrolysés par la suite le protéasome (Mykles, 1989).

5-2.4. Cas particulier des caspases (protéases à cystéine de l'apoptose)

Une nouvelle famille de peptidases

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 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). La détermination de la séquence de ced-3 a permis d'identifier un analogue de son produit chez les mammifères, la protéine ICE (Interleukine-1 β Converting Enzyme) antérieurement connue pour son activité protéasique impliquée dans la maturation de l'interleukine-1 β . De plus, les mutations qui affectent l'activité de CED-3 touchent des régions homologues de ICE que l'on sait indispensables à son activité protéasique ; cela suggère qu'une activité protéasique est essentielle à la protéine CED-3 (Nicholson *et al.*, 1995).

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 cytotoxiques). 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 (Cysteiny aspartate-specific proteinase) (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 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).

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. Les sites catalytiques seulement sont actifs 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 (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 (p21^{CIP1}, p27^{KIP1}), 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-X_L) 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 trois sous-groupes. La position P2 peut être occupée par 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 (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004). On distingue :

- Classe-I : Procaspases avec un **prodomaine long** : Les *caspases 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 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 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.

Schéma général de l'apoptose

Nos cellules et 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 nécrose (*un arrêt anormal du fonctionnement d'une cellule*)

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 (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. Ce gonflement de la cellule aboutit alors à son éclatement. Les organelles vont elles aussi avoir tendance à se gorger d'eau. Les lysosomes vont notamment se rompre, 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 sérine 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).

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

Le premier rapport que les cellules meurent naturellement en développement a été publié 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 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 ; Matsura *et al.*, 2005 ; Youle et Karbowski, 2005) et ce, quelle que soit 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.

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 observables 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 intacs 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, une compaction des organites cytoplasmiques 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).

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, s'opère au cours de l'apoptose 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 ; Matsura *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 facto) (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.

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.

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 va activer un complexe intracellulaire qui va pouvoir 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 va détourner 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 va déclencher 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 va alors former 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*) : quelle que 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 tous risques 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 vont contribuer 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 (Beere, 2001, 2004, 2005 ; Arrigo *et al.*, 2002 ; Arrigo, 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).

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. Quelle que 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.

6. Inhibiteurs endogènes des protéases et la science de la viande

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).

6.1. GENERALITES SUR LES INHIBITEURS

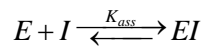
Les substances qui affectent la vitesse de réaction catalysée par l'enzyme et diminuent son efficacité durant la formation ou la rupture du complexe enzyme-substrat en se combinant avec celle-ci sont appelées inhibiteurs. Les inhibiteurs peuvent être divisés en deux groupes d'après le genre d'interaction 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 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_{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_{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 indéfiniment. Dans la catégorie des inhibiteurs irréversibles, on retrouve les inactivateurs d'enzymes ou substrats suicides (Silverman, 1995).

Les *inhibiteurs de protéases* constituent, après l'albumine et les immunoglobulines, le troisième groupe fonctionnel du plasma humain. Les antiprotéases représentent près de 10% de l'ensemble des protéines circulantes (Travis et Salvesen, 1983).

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).

6.2. INHIBITEURS DE PROTÉASES A 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). En fait, c'est à Hunt et Dayhoff que revient le mérite d'avoir identifié les premiers la similitude entre l'ovalbumine, l'antithrombine III et l' α 1-antitrypsine, et d'avoir proposé le concept de superfamille ovalbumine-antithrombine qui comprend 40 membres dont la majorité sont des glycoprotéines de 40 à 70 kDa (Hunt et Dayhoff, 1980). Les serpinines semblent ainsi avoir divergé d'un ancêtre commun il y a environ 500 millions d'années, leur évolution a été parallèle à celle des sérines protéases (Harper et Carrell, 1994). Les serpinines ont été identifiées chez les vertébrés, les invertébrés, les virus et les plantes (Potempa *et al.*, 1984).

Chez les mammifères, les serpinines 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 serpinines joue un rôle majeur dans au moins 14 fonctions physiologiques.

Les serpinines sont composées de 300 à 400 acides aminés et partagent une structure commune, composée de trois feuillets β (A, B et C), de huit à neuf hélices α (A-I), et d'une boucle appelée RCL (Reactive Center Loop) composée d'environ 17 acides aminés reliée entre le brin 5 du feuillet β A et le brin du feuillet β 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. En outre, le RCL des serpinines est flexible et mobile, et a la capacité d'adopter un nombre de conformations différentes. Cette région hypervariable avec les résidus P_1 - P'_1 de la serpinine lie le site actif de sa protéase cible et, ainsi, sa séquence détermine la spécificité de l'inhibiteur. Le résidu P_1 s'associe dans la poche de spécificité primaire de la protéase cible, et est un déterminant majeur de la spécificité de la serpinine.

Dans la plupart des cas les enzymes cibles des serpinines sont les peptidases à sérine. Cependant, plusieurs exemples ont suggéré que les serpinines 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 serpinine « squamous cell carcinoma antigen 1 » (Schick *et al.*, 1998a ; Schick *et al.*, 1998b) ; la peptidase « interleukin-1-Beta-converting » qui est actuellement caractérisée comme une peptidase à cystéine (Cerreti *et al.*, 1992) est inhibée par les serpinines proxvirus (Ray *et al.*, 1992) ; l' α 1-antichymotrypsine est

capable d'inhiber la prohormone thiol protéinase (Hook *et al.*, 1993) ; 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). Plus récemment 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 serpines d'utérus des bovins, des moutons et des porcs sont des inhibiteurs de la pepsine, une peptidase à aspartate (Mathialagan et Hansen, 1996).

Les serpines 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 serpines est le même que pour les protéinases à sérine, il existe la preuve suffisante montrant que le mécanisme d'inhibition des serpines 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).

Mécanisme d'inhibition

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 serpines participent à un complexe covalent. Ce sont des « inhibiteurs suicides » (Patston *et al.*, 1991).

Le mécanisme qui permet aux serpines d'assurer leurs fonctions d'inhibiteurs est assez particulier puisque il implique certaines modifications structurales majeures (Gettins, 2002). L'inhibition des protéases à sérine par les serpines se fait en plusieurs étapes. 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 feuille β A pour y former un brin β additionnel. Une fois la boucle RCL insérée dans la feuille β 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 ; pour revue, voir Gettins, 2002).

L'insertion de RCL à l'intérieur de la molécule à la suite de la protéolyse, accompagnée par la transformation dramatique de la structure de la serpine, est caractérisée par une transition de la protéine d'une forme stressée (S) à une forme relaxe ou stable (R) (Huntington *et al.*, 2000). La transition S-R est totalement dépendante de la région charnière du RCL (P₉-P₁₅), la séquence de cette région hautement conservée parmi toutes les serpines inhibitrices. L'insertion partielle de la région charnière dans le feuillet β A est importante pour l'activité inhibitrice de la serpine.

Toutes les serpines ne sont pas des inhibiteurs de protéases. Par exemple, l'ovalbumine, qui est une protéine du blanc d'œuf, est une serpine inactive. Certaines serpines humaines sont également inactives, comme l'angiotensinogène, un précurseur de l'angiotensine (une des hormones régulant la pression sanguine) ou la maspine, qui est un suppresseur de tumeur. La comparaison des séquences des serpines inhibitrices et non inhibitrices a permis de déterminer les résidus importants de la base de la boucle RCL pour le mécanisme d'inhibition (Gettins, 2002). L'analyse de la séquence de la boucle RCL permet de déterminer si une serpine peut être inhibitrice. Des mutations ponctuelles de la région charnière amènent une perte de l'activité inhibitrice (Holmes *et al.*, 1987 ; Hopkins *et al.*, 1993). Les résidus P₁ et P'₁ (site de coupure par la protéase cible) et les résidus adjacents P₂ et P₃ déterminent la spécificité d'une serpine. L'altération de ces résidus par mutagenèse dirigée change sa spécificité de substrat (Gettins, 2002).

Conformations alternatives et pathologies

La flexibilité du RCL et sa propension à adopter une conformation étendue de type β, ainsi que les défauts structuraux présents dans la forme active de la plupart des serpines, rendent ces protéines, et particulièrement celles affublées de mutations très vulnérables à des modifications conformationnelles anormales.

L'insertion prématurée du RCL d'une serpine dans son propre feuillet β A, sans qu'il n'y ait eu clivage, mène à la génération d'une forme « latente ». La structure d'une serpine sous forme latente est assez similaire à la structure adoptée lorsqu'elle est en complexe avec

une protéase (Whisstock *et al.*, 1998 ; Silverman *et al.*, 2001). Cependant , le RCL n'étant pas clivé, son insertion dans le feuillet β A de la serpine nécessite certains réarrangements structuraux supplémentaires, dont notamment un démantèlement partiel du feuillet β C, situé à l'autre extrémité du RCL.

L'adoption d'une conformation latente par une serpine implique une perte quasi-totale de son activité, ce qui peut être à l'origine de certaines maladies. Par exemple, la forme latente de l'antithrombine sauvage peut causer le développement d'une thrombose (Gettins, 2002).

Certains variants naturels de l' α 1-antitrypsine ont tendance à s'assembler bout à bout, par insertion du RCL d'une molécule dans le feuillet β A de la suivante, et à former ainsi de longues chaînes polymériques insolubles et inactives (Stein et Carrell, 1995 ; Sivasothy *et al.*, 2000 ; Devlin *et al.*, 2002). Dans le cas de l' α 1-antitrypsine, la polymérisation constitue une double menace pour la santé. D'une part, l'incapacité de cette protéine à assurer sa fonction biologique induit une défaillance de la protection des tissus pulmonaires qui peut, à terme, être à l'origine d'un emphysème. D'autre part, l'accumulation de polymères dans les hépatocytes du foie peut conduire au développement d'une cirrhose. Les conséquences pathologiques de la polymérisation des serpines sont nombreuses et variées : la thrombose dans le cas de l'antithrombine, l'angioedème dans le cas de l'inhibiteur-C1, la maladie pulmonaire obstructive chronique dans le cas de l' α 1-antichymotrypsine ou encore la démence dans le cas de la neuroserpine (Faber *et al.*, 1993 ; Bruce *et al.*, 1994 ; Eldering *et al.*, 1995 ; Davis *et al.*, 1999).

Les serpines et la tendreté de la viande

L'hypothèse de l'existence d'inhibiteurs de sérine protéinases dans le muscle est contestable dans la mesure où l'existence des sérines protéinases dans la cellule musculaire n'est pas encore établie. La présence de ces inhibiteurs pourrait s'expliquer soit par la présence de cellules provenant du plasma et qui contamineraient l'extrait au cours de l'extraction, soit parce qu'ils sont des inhibiteurs du protéasome, qui possède une activité sérine protéinase et dont la présence dans le muscle.

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 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 serpinés 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 sérines protéinases ont été aussi isolés dans le muscle de plusieurs poissons (Toyohara *et al.*, 1983 ; Hara et Ishihara, 1986). Récemment, 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.

Dans le tissu musculaire, plusieurs serpinés ont été décrites ; « protéase Nexin 1 », un inhibiteur de la thrombine (Festoff *et al.*, 1991 ; Verdier-Sahuque *et al.*, 1996), « plasminogen activator inhibitor » ou PAI (Fibbi *et al.*, 2001) et kallistatine (Richards *et al.*, 1997). Les cellules musculaires révèlent l' α 1-antichymotrypsine et « beta-amyloid protein précurseur » (Akaaboune *et al.*, 1995). Parmi les séries des inhibiteurs à sérine fractionnés du muscle squelettique de bovin (Ouali *et al.*, 1995 ; Rouchon, 1995 ; Tassy, 1998), deux serpinés ont été purifiées et identifiées par leurs séquences N-terminal comme antithrombine III et endopine (Tassy, 1998 ; Tassy *et al.*, 2005).

Récemment des investigations visant à identifier des marqueurs biologiques de la tendreté de la viande ont démontré que, à 6 jours *post mortem*, 70% de la variabilité de la dureté peut être expliquée par 6 variables biologiques mesurées : la teneur en inhibiteurs de sérine protéinases, l'amplitude et la vitesse de chute du pH, l'amplitude d'augmentation de l'osmolarité, la vitesse de chute de l'activité μ -calpaïne et l'activité LDH ; parmi ces paramètres mesurés et apparaissant comme le plus discriminants, 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).

6.3. AUTRES INHIBITEURS DE PROTEASES

6.3.1. 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.

Le clonage d'ADN complémentaire de la calpastatine chez diverses espèces a permis de déterminer le nombre d'acides aminés, qui est d'environ 700 (Emori *et al.*, 1987 ; Takano *et al.*, 1988 ; Asada *et al.*, 1989). La protéine peut-être divisée en 5 domaines, d'environ 140 acides aminés chacun. Dans la partie N-terminal, on note la présence d'un unique domaine L, suivi de quatre domaines similaires identifiés comme des domaines d'inhibition. Au sein de

ces domaines répétitifs, sont retrouvées trois régions hautement conservées dites A, B et C (Figure 11) (Takano *et al.*, 1988 ; Lee *et al.*, 1992).

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).

Il est clair que la calpastatine joue un rôle important dans la régulation de l'activité de la μ - et de la m-calpaïne, mais il s'avère que la régulation des calpaïnes par son inhibiteur au sein des cellules vivantes n'est pas encore pleinement comprise. Les observations suggèrent que les trois sites de fixation sont nécessaires pour qu'elle exprime son entière activité inhibitrice. De plus, il a été rapporté que les calpaïnes peuvent s'autolyser en présence d'un niveau de calpastatine inhibant totalement l'activité des calpaïnes. Toutefois, beaucoup de mécanismes sur la régulation et sur l'interaction calpaïne/calpastatine ont été élaborés sans savoir s'ils sont proches de la réalité (Goll *et al.*, 1992).

Elle comporte généralement quatre domaines semblables dont chacun montre une activité inhibitrice pour les calpaïnes et un domaine N-terminal (domaine L) de taille variable, dont la fonction n'est pas connue. Des expériences de délétions au sein de protéines recombinantes ont révélé la région B comme le centre de l'inhibition (Crawford *et al.*, 1993). Cette région paraît se lier à proximité du site actif et entre en compétition avec le substrat (Maki *et al.*, 1988). Quant aux régions A et C elles possèdent des structures en hélice alpha et seraient importantes pour initier le processus d'inhibition (Uemori *et al.*, 1990).

Il existe plusieurs isoformes de calpastatine résultant de divers événements cellulaires comprenant : l'épissage alternatif (Geesink *et al.*, 1998), des emplacements différents du début de la transcription et de la traduction (Cong *et al.*, 1998), des états différents de phosphorylation (Averna *et al.*, 2001).

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 (premier pic élué d'une colonne échangeuse d'anions) et des muscles à contraction lente (coéluée avec la m-calpaïne ou plus tard dans le gradient de sel), 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).

6.3.2. 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, 1986, 1987).

a) les *stefines* (famille 1) représentent les molécules les plus primitives et les plus simples de la super-famille. Elles sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique non glycosylée et d'environ 100 acides aminés (10-14 kDa). Elles ne possèdent pas de ponts disulfures et leur localisation est principalement intracellulaire.

b) les *cystatines* (famille 2) sont des molécules un peu plus complexes constituées d'environ 115 acides aminés (10-14 kDa). Elles renferment en général deux ponts disulfures qui forment deux boucles à proximité de l'extrémité C-terminal. Elles sont présentes dans beaucoup de fluides extracellulaires. La cystatine C et la cystatine de poulet sont les membres les plus représentatifs de cette famille.

c) les *kininogènes* (famille 3) apparaissent avec leur structure complexe comme les membres les plus évolués de la superfamille des cystatines. La chaîne lourde de ces molécules comporte trois domaines de type cystatine acquis vraisemblablement par duplication de gènes dont seulement deux sont fonctionnels. Les kininogènes sont des molécules complexes (335

acides aminés, 2 ponts disulfure, glycosylées) et multifonctionnelles qui peuvent fixer et inhiber de manière indépendante deux molécules de protéases à cystéine (Turk *et al.*, 1986).

d) les inhibiteurs glycosylés d'intermédiaire poids moléculaire contenant deux copies de la structure inhibitrice de base et de plusieurs ponts disulfure.

Rawlings et Barrett (1994a) suggèrent que ces familles dérivent d'un gène ancestral possédant deux ponts disulfure. Des phénomènes de duplication du matériel génétique et de mutation conduisant à la perte des cystatines ont lieu lors des 100 millions dernières années.

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. L'importance des cystatines dans les muscles *post mortem* et vivants est par leur identification en tant que marqueurs de la tendreté de la viande (Shackelford *et al.*, 1991 ; Barnier, 1995).

6.3.3. 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. La molécule des métalloprotéases est constituée de deux domaines, un domaine C-terminal exposant cinq boucles qui forment le site inhibiteur venant interagir avec le site actif de l'enzyme et un domaine N-terminal qui forme des liaisons de coordination avec l'atome de zinc catalytique. 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.

Préambule

Avant de présenter les résultats et pour une meilleure compréhension de la présentation de ces derniers, il convient de rappeler ici les objectifs de ce travail de recherche. Le premier objectif était la mise en place d'outils permettant l'analyse des qualités de la viande. A cet effet, il nous a été nécessaire de prendre connaissance de la méthodologie utilisée par les laboratoires d'accueil étrangers et plus particulièrement le Centre INRA de Clermont Ferrand où nous avons effectué l'esatiel de nos sjours scientifiques. Cela explique pourquoi une partie de l'étude a portée sur le bovin, modèle le plus utilisé en France, et l'agneau modèle plus facile d'accès en Algérie. Un petit laboratoire a donc été installé au sein de l'INATAA avec le matériel nécessaire à la mesure des paramètres physicochimiques traditionnels (pH, température, osmolarité, etc). Nous avons, par ailleurs, acquis très récemment un appareil d'électrophorèse qui va nous permettre d'effectuer certaines déterminations. Ne disposant pas d'osmomètre, nous avons développé une méthode de mesure de ce paramètre basée sur la détermination de la résistance à la conduction du courant par les extraits musculaires, et cette mesure a été étalonnée par rapport à un osmomètre. Enfin, s'agissant de travaux sur la tendreté de la viande, il nous fallait disposer d'une méthode instrumentale objective d'estimation de la dureté de la viande. Ceci a été réalisé à l'aide d'un pénétromètre, mesure étalonnée par rapport à un jury de dégustation. La pénétrométrie n'est utilisable que pour des muscles ayant des taux de collagène réduits comme c'est le cas chez l'agneau.

Le deuxième objectif était de mettre en place des expérimentations destinées à des applications techniques afin de mieux les maîtriser et pouvoir par la suite les utiliser de manière routinière. Nous exposerons les résultats obtenus un peu plus loin ainsi que les publications en cours et parues.

Enfin, durant nos séjours à l'INRA de Clermont Ferrand, nous avons participé à des expérimentations dont certaines ont été publiées en tant que co-auteur et je viens d'envoyer pour publication un article reprenant les résultats que obtenus à l'INRA et plus précisément à la Station de Recherche sur la viande. Nous présenterons les résultats obtenus et les ouvertures de ces travaux vers de nouvelles hypothèses sur les mécanismes enzymatiques d'attendrissage des viandes.

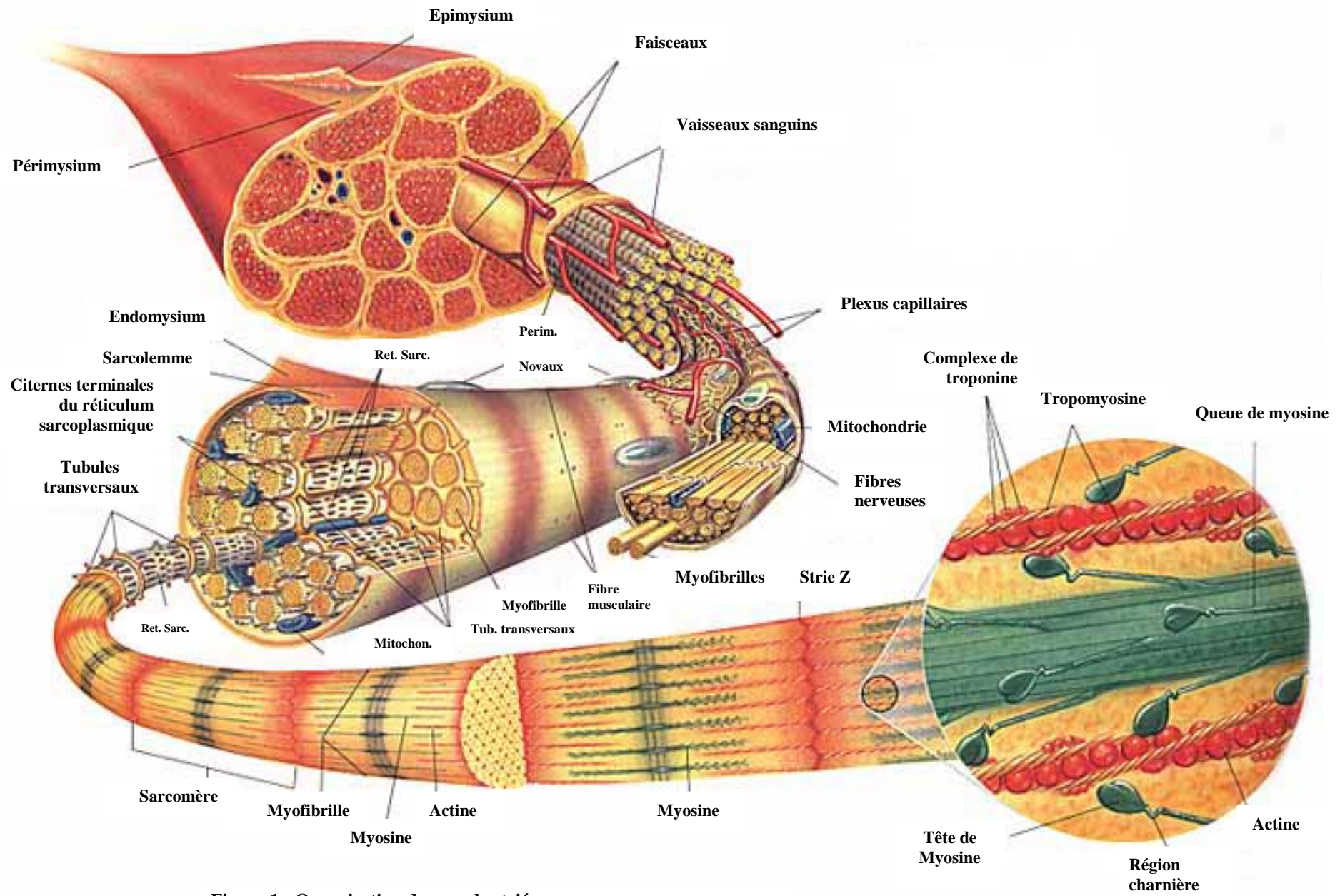


Figure 1 : Organisation du muscle strié
 Image téléchargé à partir de <http://www.emc.maricopa.edu.html>

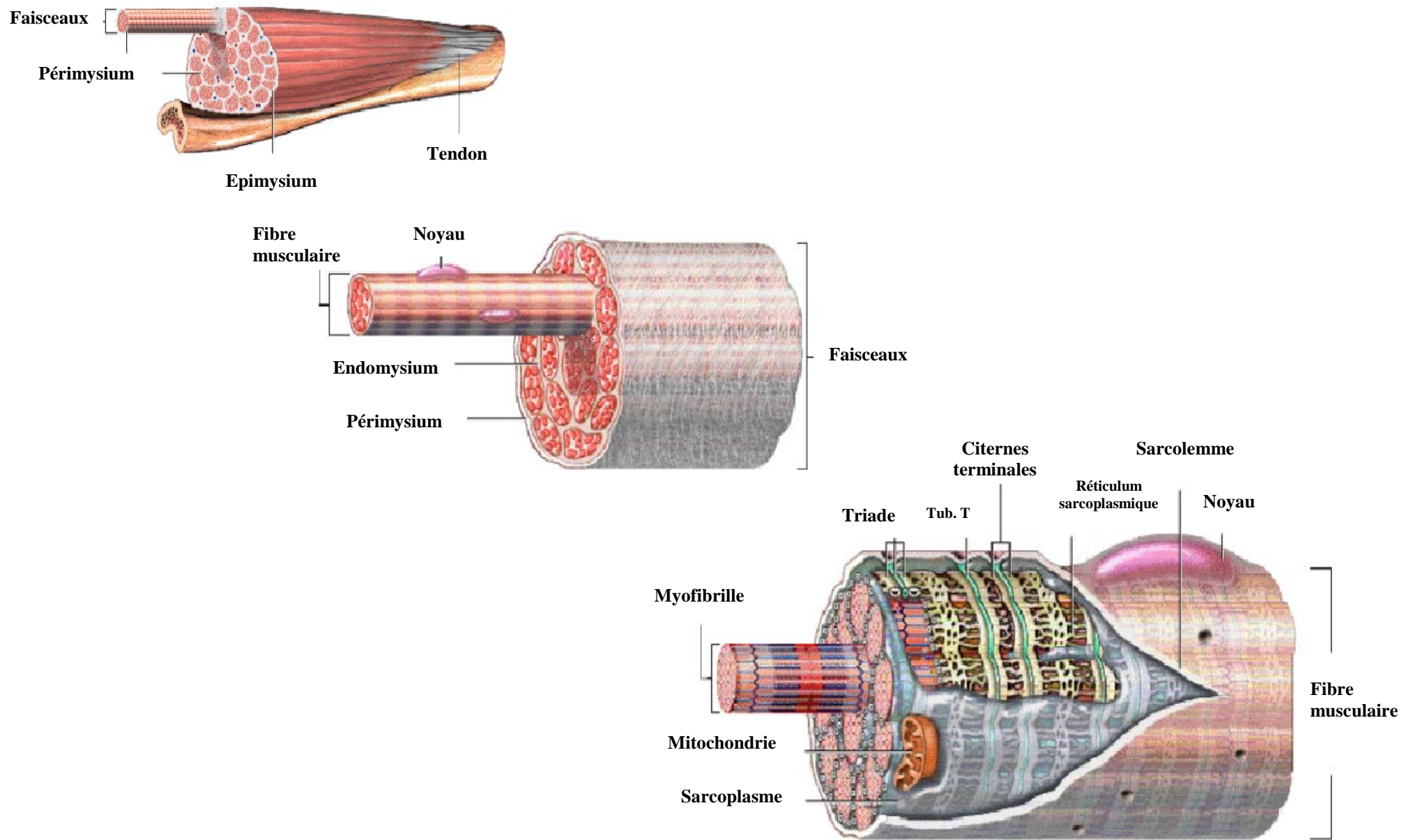


Figure 2 : La fibre musculaire
 Images téléchargées à partir de [http:// www. emc.maricopa.edu.html](http://www.emc.maricopa.edu.html)

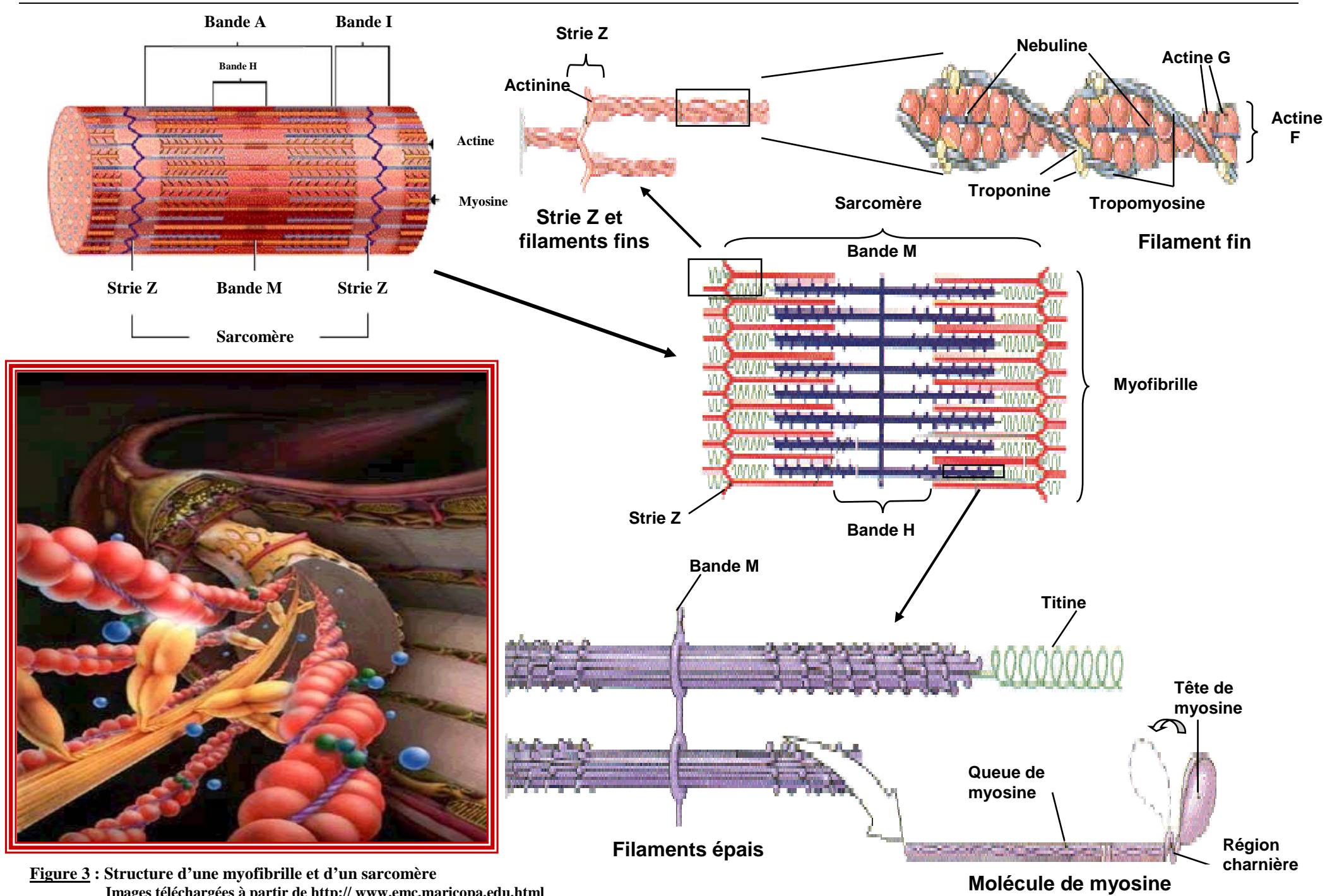


Figure 3 : Structure d'une myofibrille et d'un sarcomère
 Images téléchargées à partir de [http:// www.emc.maricopa.edu.html](http://www.emc.maricopa.edu.html)

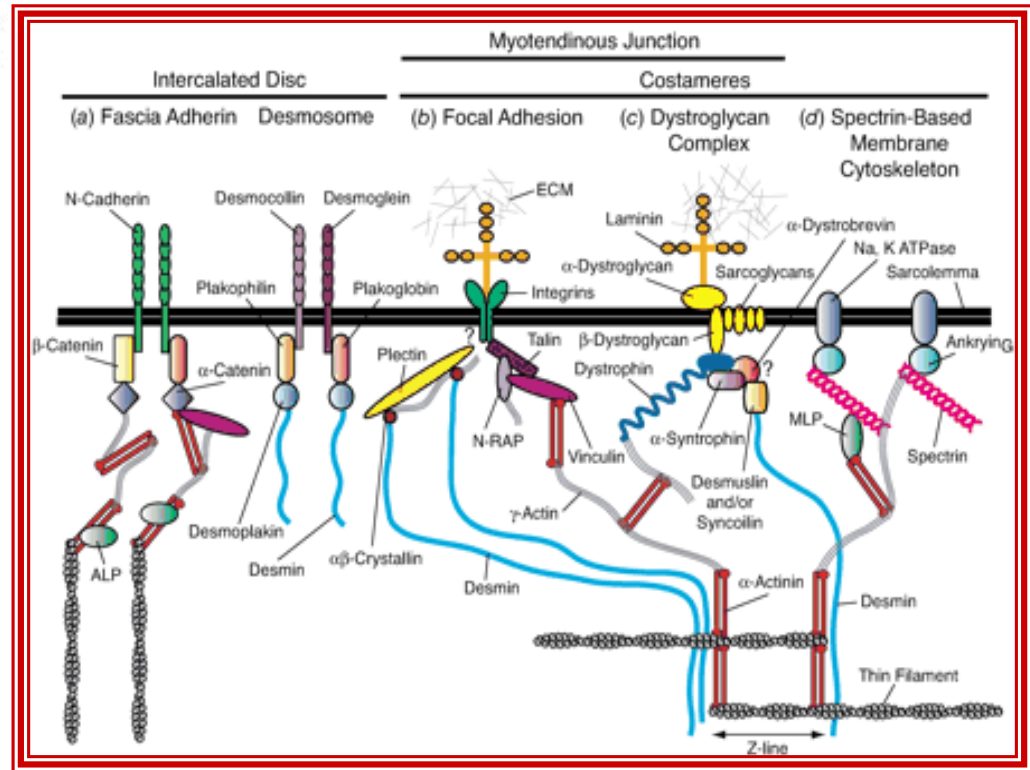
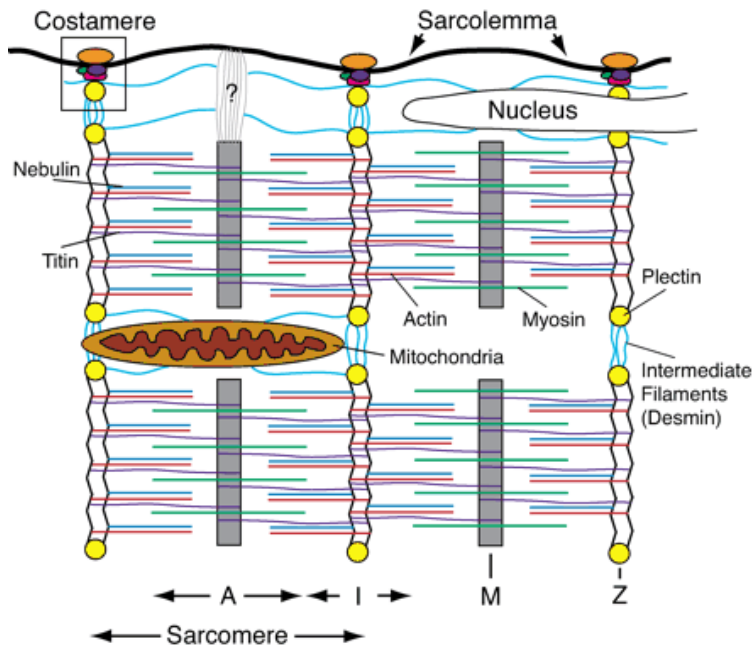
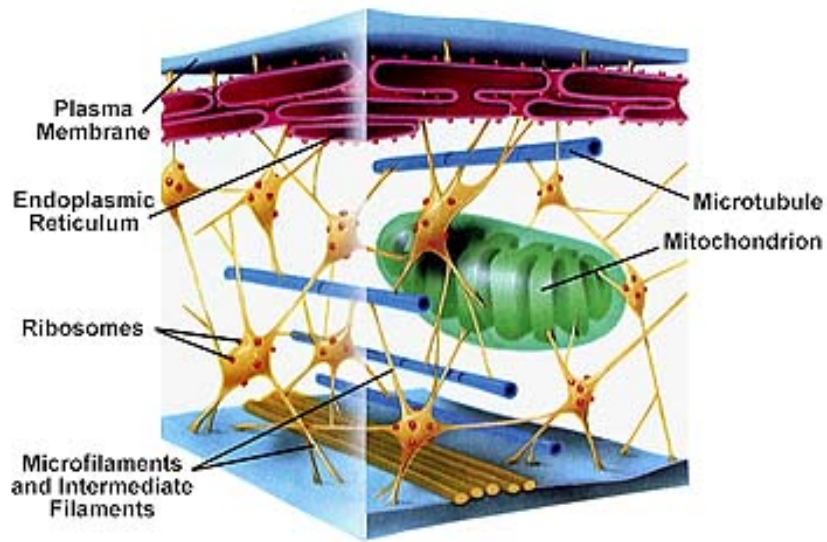


Figure 4 : Protéines du cytosquelette (d'après Carlson et Thornell, 2001)
 Images téléchargées à partir de :
[http:// www.siu.edu/departonents/biochem.html](http://www.siu.edu/departonents/biochem.html);
<http://www.fractogene.com/cerebellum.html>;
<http://cellbio.annualreviews.org/cgi/content/full/18/1/637.html>

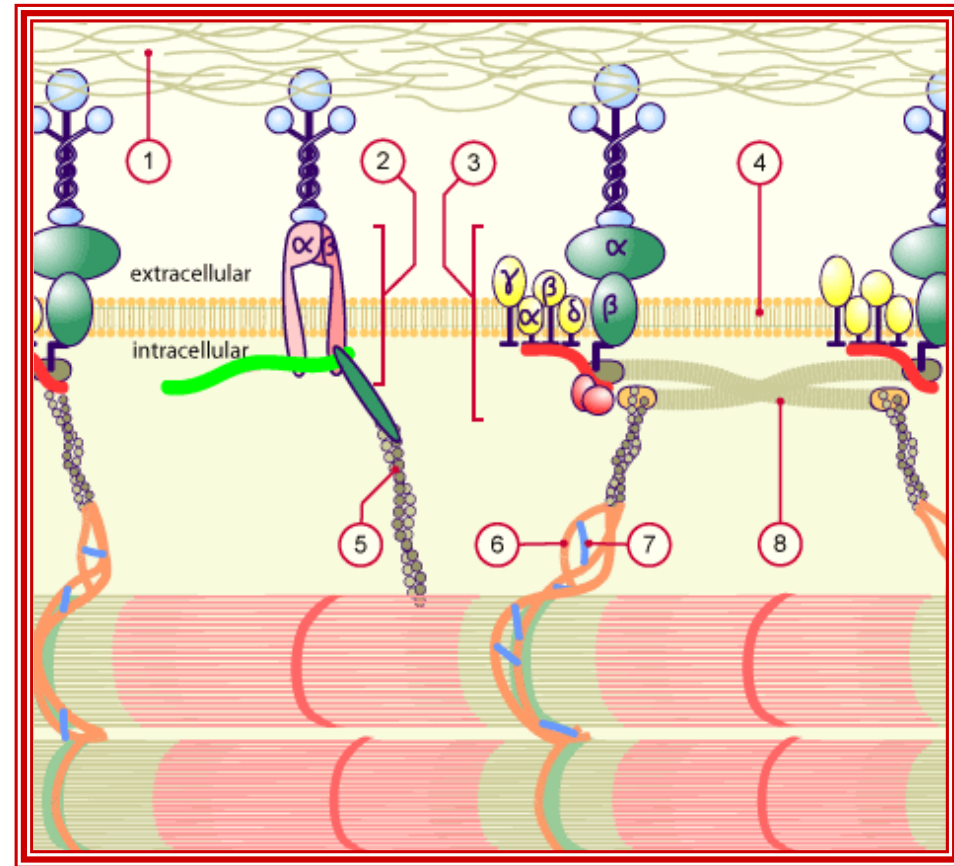
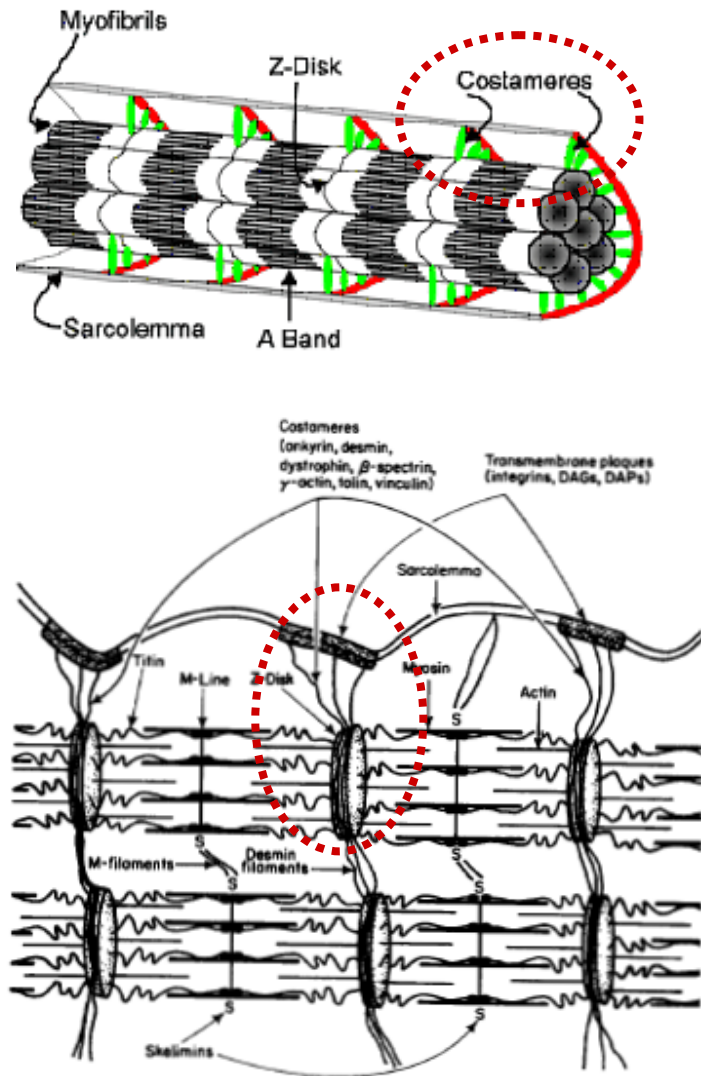


Figure 5 : Organisation des costamères (d'après Thornell et Price, 1991)

1. Basalamine, 2. Integrines, 3. Complexes dystrophines-glycoproteines, 4. Sarcolemme, 5. Actine, 6. Desmine, 7. Pectine, 8. Dystrophine.

Images téléchargées à partir de <http://www.unifr.ch/histologie.html>

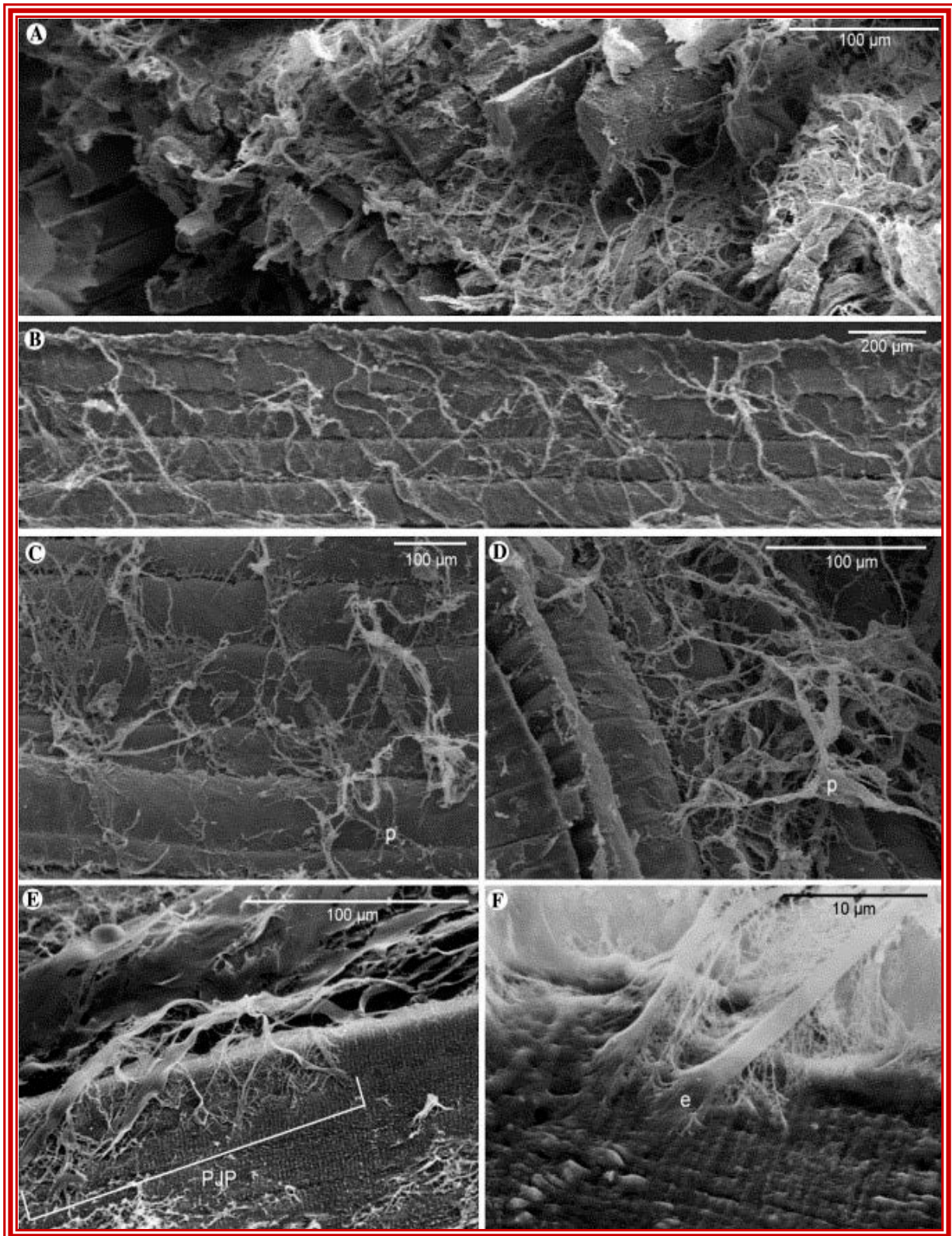


Figure 6 : Le collagène (d'après Passerieux *et al.*, 2006)

A) Vue latérale, B) Vue de face, C) Sur la surface de la myofibrille « p », D) Sur des myofibrilles adjacentes « p », E) L'attachement du collagène sur le « perimysial junctional plate », F) La fusion du perimysium avec l'endomysium « e ».

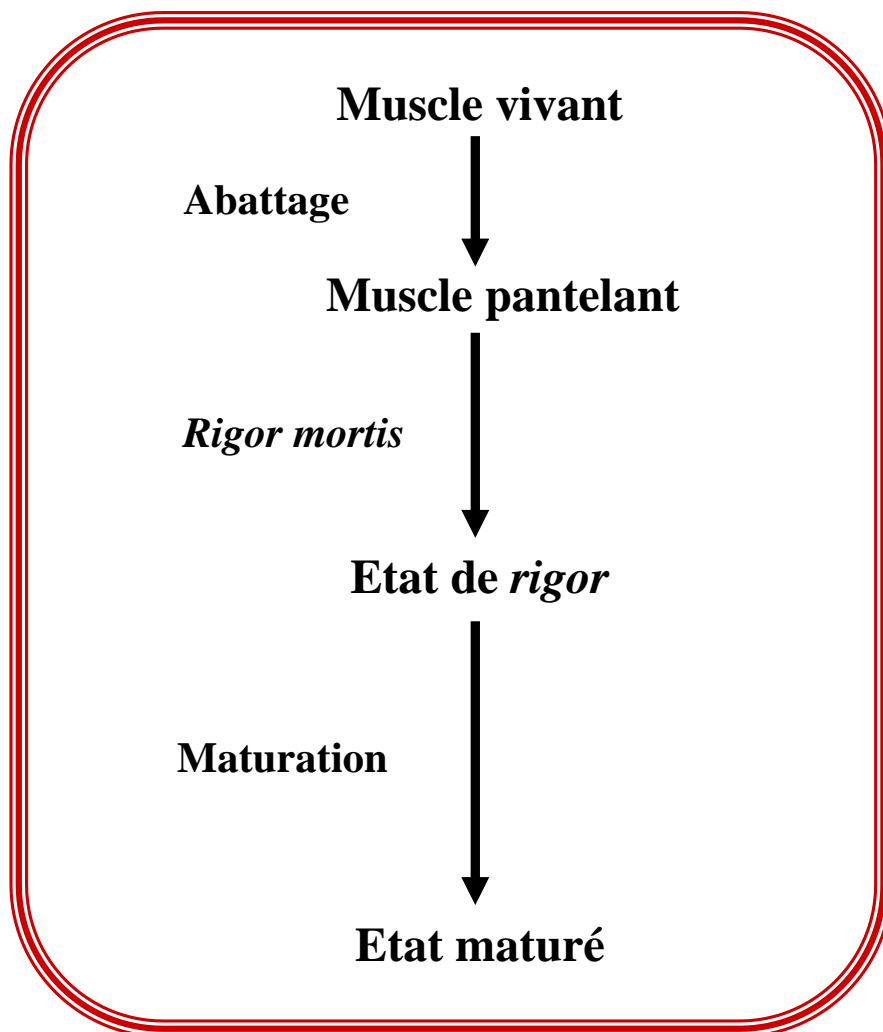


Figure 7 : Etapes successives de la transformation du muscle en viande

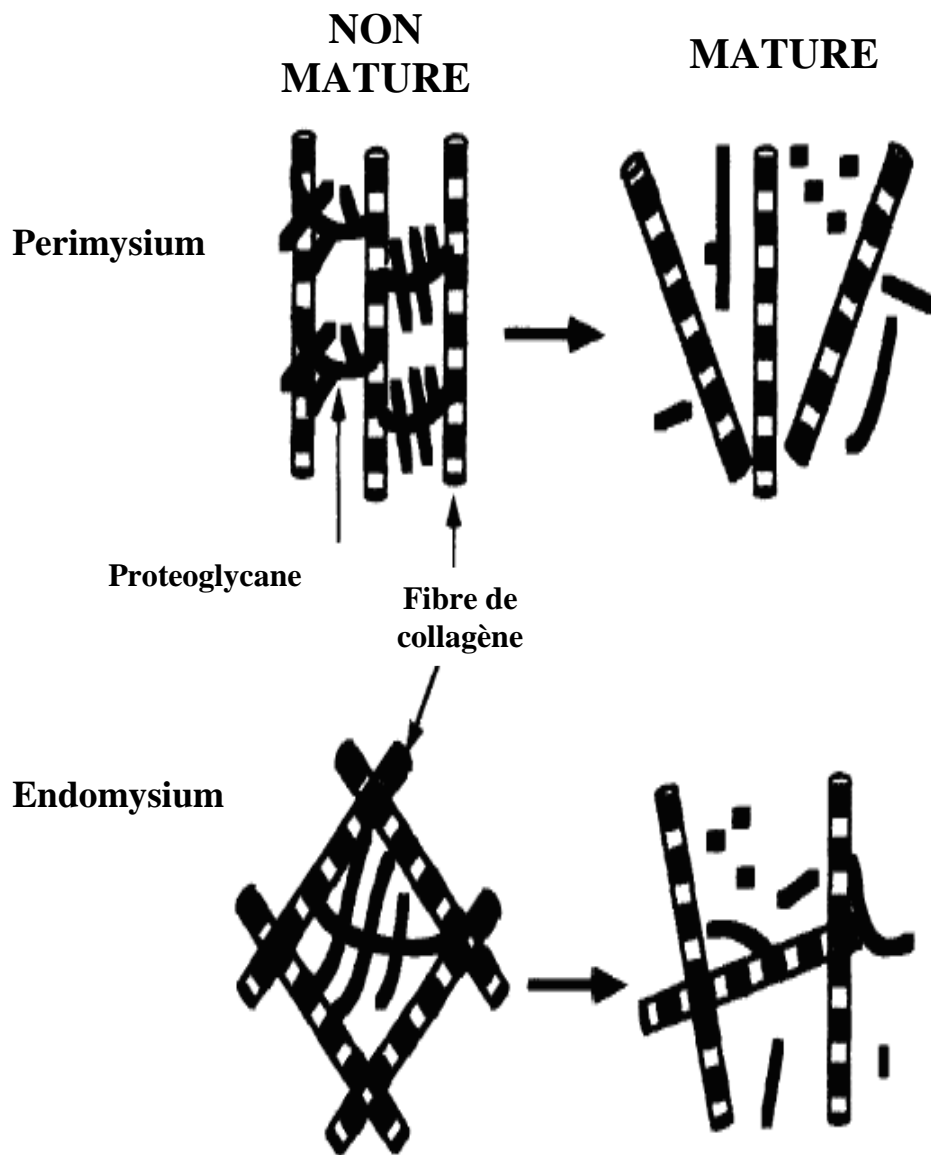


Figure 8 : Dégradation du tissu conjonctif (d'après Nishimura *et al.*, 1996)

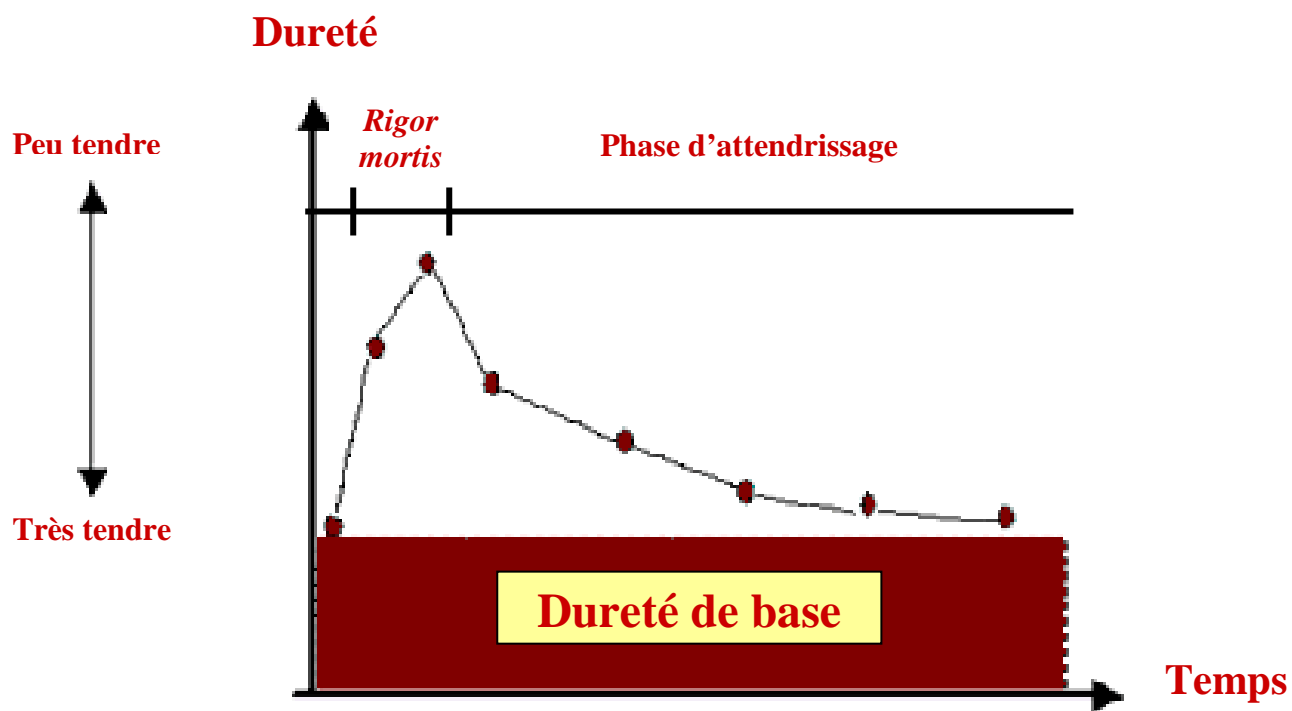


Figure 9 : Schéma d'évolution de la dureté du muscle pendant la phase de conservation à l'état réfrigéré (d'après Ouali, 1990)

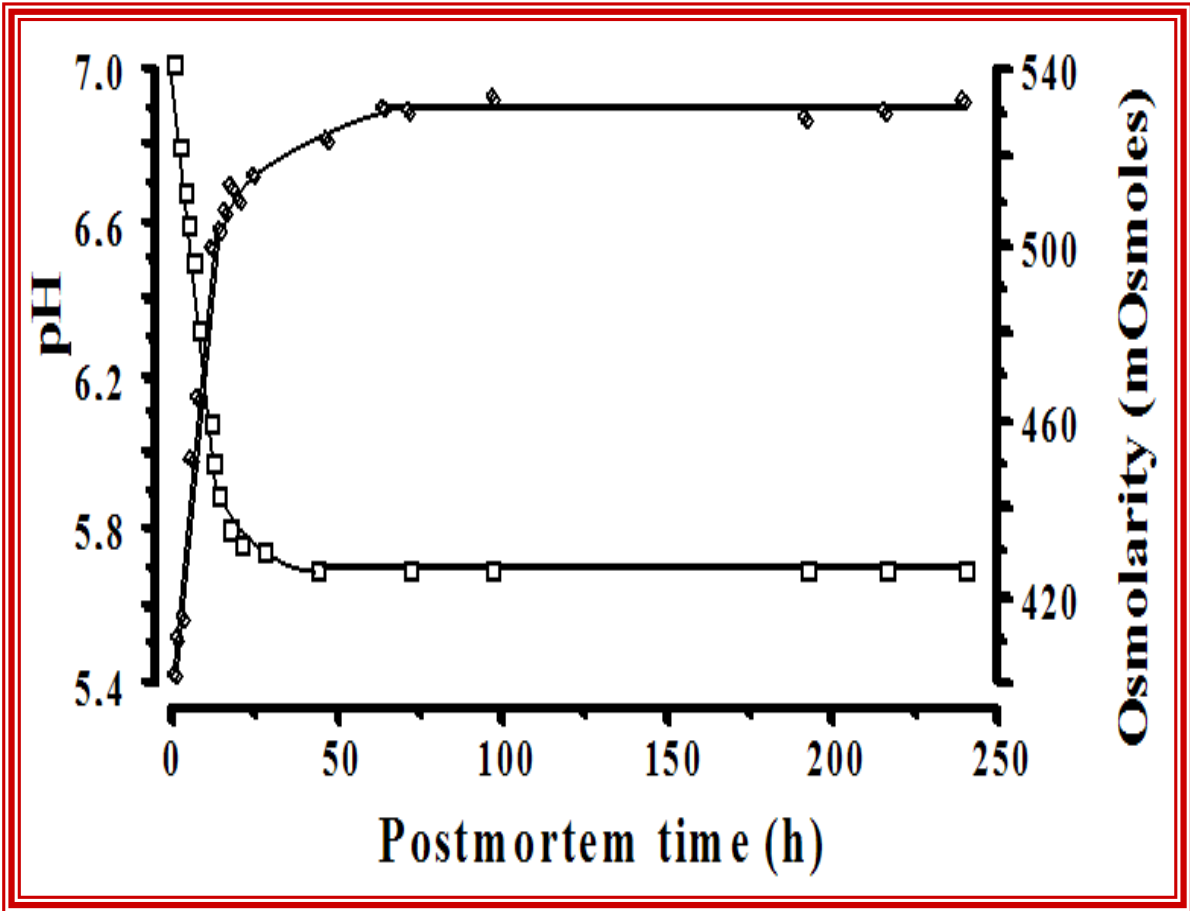


Figure 10 : Evolution *post mortem* du pH et de l'osmolarité du muscle *Longissimus dorsi* bovin stocké 24h à 15°C puis à 4°C (d'après Ouali, 1990b)

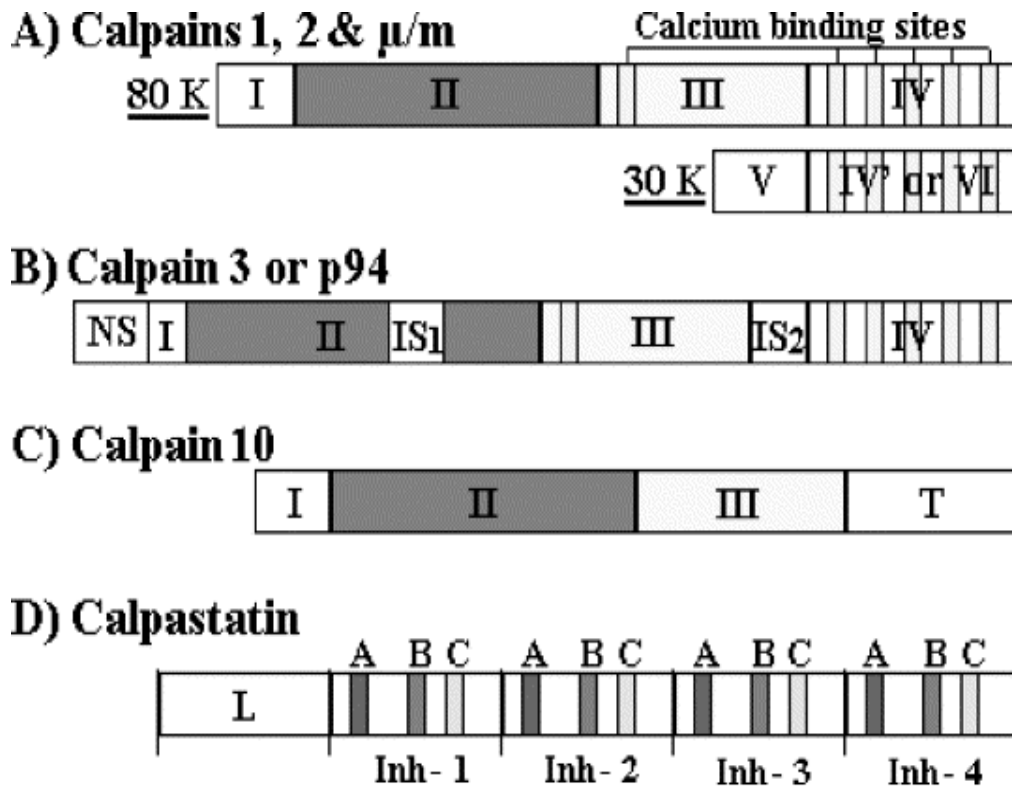


Figure 11 : Structure schématique des différentes calpaines exprimées dans le muscle squelettique et leur inhibiteur spécifique la calpastatine (d'après Sentandreu *et al.*, 2002)

(A). Calpaines ubiquitaires : calpaïne 1 « μM », calpaïne 2 « mM » et calpaïne de poulet « μ/m » ; (B). Calpaïne spécifique du muscle : calpaïne 3 ou p94 ; (C). Calpaïne 10 ; (D). Structure schématique de la calpastatine (inhibiteur spécifique). Abréviations utilisées : **I**, Domaine N-Terminal ; **II**, Domaine catalytique de la cystéine ; **III**, Domaine III ; **IV**, Domaine de liaison du calcium ou domaine calmoduline « sous-unité de 80 kDa » ; **V**, Domaine N-Terminal de la sous-unité de 30 kDa ; **VI** ou **IV'**, Domaine de liaison du calcium de la sous-unité de 30 kDa ; **NS**, N-Terminal de la séquence insérée ; **IS1**, premier inséré de la calpaïne p94 ; **IS2**, deuxième inséré de la calpaïne p94 ; **T**, Domaine T identifié dans une calpaïne atypique de *C. elegans* ; **L**, Domaine N-Terminal de la calpastatine ; **Inh-1 à 4**, Domaines répétitifs d'inhibition de la calpastatine ; **A**, **B**, **C**, régions particulières nécessaires pour l'activité inhibitrice des sous-domaines isolés et pour l'activité inhibitrice de la calpastatine.

1- INTRODUCTION

La variabilité très importante et imprévisible de la qualité de la viande tant à l'amont (production) qu'à l'aval transformation, représente le reproche majeur fait à la filière par le consommateur. Une part de celle-ci provient des conditions d'abattage, de maturation et de cuisson des viandes.

Une autre partie de cette variabilité est liée au type génétique et aux conditions d'élevage sans qu'on puisse actuellement préciser le rôle respectif de chacun de ces facteurs. On sait cependant qu'ils influencent les propriétés physiques, biochimiques et métaboliques des constituants musculaires, lesquelles conditionnent dans des proportions très variables les qualités de la viande et notamment la tendreté.

2- PRINCIPES DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Les muscles sont constitués de faisceaux de fibres enveloppés d'une gaine de tissu conjonctif, assurant leur cohésion.

Le tissu conjonctif est constitué de protéines dont la principale, le collagène, détermine par sa teneur, sa nature et sa solubilité dans l'eau et à la chaleur, la tendreté de base de la viande. C'est le niveau de cette tendreté qui permet de distinguer les muscles à bouillir, à braiser ou à rôti.

Les fibres des muscles ont des propriétés contractiles et métaboliques qui conditionnent, après l'abattage, la vitesse et la durée de maturation de ces muscles et par suite le niveau de leur tendreté finale.

Ainsi, la tendreté de la viande est fonction d'un ensemble de caractéristiques musculaires à l'abattage et durant la maturation (caractéristiques du collagène et caractéristiques des fibres, y compris leur équipement enzymatique).

Ce travail visait à identifier un ou plusieurs marqueurs biologiques de la qualité la plus recherchée par le consommateur à savoir la tendreté. Pour cela il nous fallait une variabilité de cette qualité aussi large que possible, variabilité qui a été accrue en utilisant des animaux de race, d'âge et de sexe différents dans le cas de l'espèce bovine et des animaux de race et d'âge différents dans le cas de l'espèce ovine. Plusieurs muscles ont en outre été utilisés dans le cas des ovins. Les paramètres physicochimiques (pH, osmolarité, rétention d'eau,) et le poids respectif de ces variables sur la définition de la tendreté de la viande estimée pas un jury de dégustation et/ou par des méthodes mécaniques (pénétrométrie pour la viande d'agneau et compression à 20% de déformation pour la viande bovine).

L'expérimentation sur le lot de bovins a été faite au laboratoire de biochimie da la station de Recherches sur la Viande INRA de Clermont-Ferrand/Theix. La deuxième partie faite sur les bovins a été réalisée dans les laboratoires de INATAA université de Mentouri Constantine. Ce qui explique la différence du matériel utilisé pour la mesure des différents paramètres.

3- MATERIEL BIOLOGIQUE

3-1. BOVIN

3-1. 1. CARACTERISTIQUES DES ANIMAUX

Le nombre d'animaux est de 169 (Tableau 4). Ces animaux proviennent pour la plupart des troupeaux de l'INRA: Charolais du Domaine de Galles (Cher), Limousins et Salers du Domaine de Marcenat (Cantal), Aubrac du Domaine de Redon-Theix. Ces troupeaux ont été constitués avec la participation des représentants des éleveurs de ces races et sont considérés par ceux-ci comme représentatifs de leur race. Les effectifs ont été complétés par l'achat d'animaux avec la participation des UPRA correspondantes.

Tableau 4 : Répartition des animaux par âge, race et sexe

Age (mois)	Nombre	Race	Nombre	Sexe	Nombre
15	28	Aubrac	42	Femelles	85
19	28	Charolaise	43	Males	84
24	28	Limousine	42		
54	28	Salers	42		
78	28				
102	28				
Total des animaux					169

Deux types d'animaux ont été considérés, des taurillons et des vaches de réforme des 4 à 9 ans des 4 races désignées précédemment, conduits dans les mêmes conditions et abattus à l'intérieur d'une large gamme d'âges pour chaque type de production : de 15 à 24 mois pour les taurillons, de 4 à 9 ans pour les vaches de réforme. Les mesures ont porté sur le muscle à rôtir, le *Longissimus Dorsi* (faux-filet). Elles ont porté sur l'évolution, au cours de la maturation, du pH, de l'osmolarité et la quantité de jus. La tendreté a été mesurée par des mesures mécaniques à uniquement 3 temps post mortem.

3- 1. 2. PLAN EXPERIMENTAL :

Les taurillons des 4 races ont été achetés à l'âge de 9 mois et engraisés à l'Unité Expérimentale des Bovins en Croissance de l'URH. Du début de l'expérimentation (10 mois) et jusqu'à l'abattage à 15, 19 ou 24 mois, ils ont été conduits dans les mêmes conditions. Ils ont reçu à volonté une ration constituée de pulpes de betteraves surpressées ensilées (85%) complétées par du maïs grain, du tourteau et de l'urée. C'est une ration économe de la Limagne auvergnate.

Le muscle *Longissimus Dorsi* (LD) a été prélevé à chaud, immédiatement après l'abattage des animaux. Ce muscle a été retenus car il fait partie des muscles à griller et pour lesquels la maturation joue un rôle important dans la tendreté. Par ailleurs, il est suffisamment volumineux

pour autoriser la totalité des mesures et il a été largement étudié auparavant.

Les paramètres physico-chimiques étudiés ont été mesurés en cinétique aux temps *post mortem* suivants : 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 72 heures. La tendreté à 1, 7 et 14 jours post mortem.

3-1. 3. METHODES PHYSICO-CHIMIQUE

a- Mesure du pH :

La mesure du pH à partir de 2 g de muscle, préalablement broyés à la moulinette et homogénéisés au polytron 10 à 15 secondes dans 20 ml d'acide iodoacétique, 5 mM. L'acide iodoacétique n'a aucun pouvoir tampon donc le pH est égal au pH réel. De plus, il bloque l'activité des enzymes glycolytiques qui peuvent influencer la valeur du pH, notamment *ant-rigor*. La mesure est réalisée sur l'homogénat ainsi obtenu à l'aide d'un pHmètre de paillasse a microprocesseur de type WTW 537 (amilabo, lyon) équipé d'une électrode combinée en verre de même marque.

b- Détermination de l'osmolarité

L'osmolarité du muscle est généralement déterminée à partir du jus extrait de la viande après centrifugation 30 minutes à $100\ 000 \times g$ et mesurée à l'aide d'un osmomètre (DEBITON 1994) 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 a lieu directement à partir de l'échantillon de viande solide. En général, ces deux techniques ne donnent pas les mêmes résultats (ZAMORA 1996).

L'osmolarité a été mesurée à partir du jus extrait après centrifugation 30 minutes à $100\ 000 g$. La mesure a été réalisée à l'aide d'un micro osmomètre (Herman Roebing Messtechnik Allemagne) et l'omolarité est exprimée en mOsmol/g de muscle.

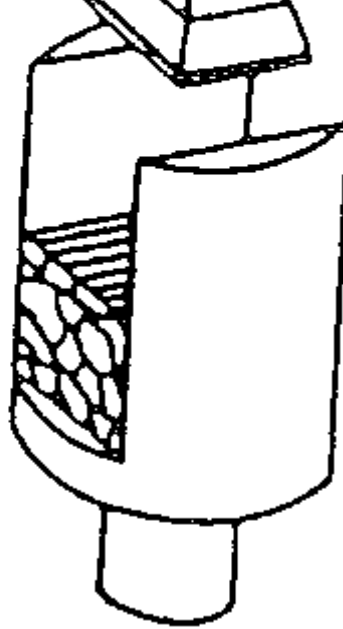
c- Estimation de la quantité de jus extractible :

La quantité de jus extractible est déterminée à partir de 5 g de viande, hachée a la moulinette pendant environ 8 secondes, centrifugés a $100\ 000g$ pendant 30 minutes. Le pouvoir de rétention d'eau des protéines musculaires est estimé par la quantité de jus relarguée lors de la centrifugation (en g/g de muscle)

3- 1. 4. MESURES MEC

a- Mesure mé

La mesure de compression INSTR permettant de traiter contrainte ainsi calcul 35-40 N/cm² au max optimum de maturatic



ppareil de traction - un logiciel série IX : Buffiere (1993). La r varie entre environ i viande a atteint son

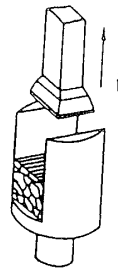


Figure 12 : Représentation schématique de la cellule de compression avec un échantillon de viande dans la configuration longitudinale (d'après Lepetit et Buffière, 1995)

Un échantillon de muscle cru rectangulaire (longueur = 1.5 cm, largeur = 1 cm, hauteur = 1 cm) est placé, maintenu et compressé dans une cellule comportant deux parois latérales. La direction des fibres musculaires de l'échantillon est parallèle aux parois et la déformation est appliquée perpendiculairement aux fibres musculaires. Au cours de la compression, l'échantillon de déformation est de 20% et la fréquence de 10Hz, ce qui permet de mesurer uniquement les propriétés mécaniques des fibres musculaires et non du collagène.

b- Mesure de la résistance de l'ensemble fibre musculaire et tissu conjonctif

Dans le même test que précédemment la résistance maximale a été déterminée. Elle est obtenue à déformation élevée. Cette résistance met en jeu des propriétés de la fibre musculaire, du tissu conjonctif mais également des interactions entre ces deux structures.

Ces deux mesures (résistance de la fibre musculaire et de l'ensemble fibre musculaire et tissu conjonctif) ont été également déterminées sur la viande après chauffage.

Le muscle LD a été prélevé à chaud (1 h post mortem) a été coupé en 9 tranches de 3 à 4 cm d'épaisseur, emballées sous vide et stockées à 12°C (bain thermostaté) pendant 24 h avant d'être transférées dans un bain d'eau à 4°C. Les échantillons ont été stockés ainsi pendant 8 jours. Les analyses décrites ci-après ont été réalisées sur ces échantillons soit juste après l'abattage (1 h post mortem) soit en cinétique et dans ce cas les mesures ont été faites aux stades 1 h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 24 h, 48h et 72h après l'abattage.

3- 2. OVINS

3- 2. 1. CARACTERISTIQUES DES ANIMAUX :

Deux lots d'ovins ont été utilisés. Le premier composé six animaux a servi à la recherche d'une relation entre la mesure sensorielle et instrumentale de la tendreté, l'autre, composé de dix animaux, pour la recherche de relations entre les paramètres physico-chimiques et la tendreté.

Le lot, composé de six animaux provenait d'une ferme de la région de FERDJIOUA. Les six agneaux de race EL'TEL ont été obtenus auprès du même producteur. Ils avaient des animaux âges différents qui variaient de 6 à 18 mois. Ce choix nous permettait d'avoir des degrés de tendreté différents (tendre, moyennement tendre et dure) et de pouvoir ainsi l'estimer par des tests sensoriel et instrumental. Le poids des carcasses variait entre 14 et 21 kg (tableau 5).

Le deuxième lot, composé de dix agneaux provenait de la ferme pilote BAARAOUIA-Khroub. Ces animaux de même sexe, ont eu un même régime alimentaire et une même prophylaxie. Ils sont de race de OULED DJELLAL, âgés entre 11 et 13 mois et ont un poids des carcasses variant entre 11 et 18 kg (tableau 5).

Tableau 5. Caractéristiques des animaux

	Lot 01 (N1 = 06)			lot 02 (N2 = 10)		
	Intervalle	Moy	E T	Intervalle	Moy	E T
Age (mois)	06 – 18	10.00	4.90	11 - 13	12.10	0.74
Poids vif (kg)	--	--	--	25 - 42	33.60	5.48
Poids des carcasses (kg)	14 – 21	17.67	2.50	11 - 18	13.25	2.78

***moy** : moyenne entre les animaux

***E T** : écart-type entre les animaux

3- 2. 2. PLAN EXPERIMENTAL :

Pour le premier lot (N = 06), les animaux ont été abattus au niveau de l'abattoir de FERDJIOUA. Après ressuyage (20 heures) dans une chambre froide, les cuisses ont été acheminées dans un délai de 2 heures au laboratoire du DNATAA dans une glacière à environ 18°C. Les quatre muscles qui ont servi de modèle d'étude sont : Muscle *Semi Membranosus* (SM), Muscle *Semi Tendinosus* (ST), Muscle *Bicipitis Femoris* (BF) et le muscle *Rectus Femoris* (RF). Ils ont été prélevés dès la réception de l'échantillon.

Après le repérage anatomique, les muscles sont prélevés aseptiquement au bistouri stérile. Immédiatement après le prélèvement, chaque muscle est découpé en dix tranches, puis chacune des tranches est découpée en morceaux rectangulaires (longueur 2 cm, hauteur 2 cm, largeur 1 cm). Dix morceaux de chaque muscle vont servir à la mesure instrumentale (test de pénétration) les mêmes morceaux ont été cuits à l'eau pendant 30 minutes et utilisés pour la mesure sensorielle. Nous avons utilisé le même échantillon pour la mesure instrumentale et la mesure sensorielle afin de minimiser la variabilité de l'échantillon.

Pour le **deuxième lot** (N = 10), les animaux étaient transportés jusqu'à l'abattoir de Constantine à 6 heures du matin. Immédiatement après abattage, éviscération et inspection vétérinaire, les cuisses sont acheminées au laboratoire de l'INATAA. Les quatre muscles (SM, ST, BF, RF) des deux cuisses de la carcasse sont prélevés.

Immédiatement après, le prélèvement, chaque muscle a été découpé en 07 tranches d'épaisseurs égales. A part les quatre tranches utilisées pour la première analyse, toutes les autres ont été emballées dans des sachets en plastique et placées dans un bain d'eau dont la température est maintenue constante et égale à 12°C de façon à éviter le phénomène de « cold-shortening ». A 24 h *post mortem*, les échantillons sont transférés dans un bain à 4°C et stockés ainsi jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Les paramètres étudiés sont mesurés en cinétique aux temps suivants : 1, 4, 8, 14, 24, 48, 72 heures *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 à été faite cinq fois.

3- 2. 3. METHODES PHYSICO-CHIMIQUE

a- Mesure du pH :

Pour la mesure du pH, 2 g de muscle sont préalablement broyés à l'utratrax T25 (IKA Labortechnik) à 8000 tours/minute et homogénéisés au polytron pendant 10 à 15 secondes dans 20 ml d'acide iodoacétique. La mesure est réalisée sur l'homogénat ainsi obtenu à l'aide d'un pHmètre de paillasse à microprocesseur de type HI8521 (HANNA instruments) équipé d'une électrode combinée en verre de même marque.

b- Estimation de la capacité de rétention d'eau des protéines myofibrillaires

La quantité de jus extractible est déterminée à partir de viande hachée grossièrement à l'aide de bistouri pendant environ 8 secondes, centrifugée à 100 000 ×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

C- Détermination de l'osmolarité

Ne disposant pas de ces techniques au niveau de notre laboratoire, nous avons estimé l'osmolarité du muscle indirectement en mesurant la conductivité électrique du jus extrait de la

viande. L'extraction du jus de viande a été réalisée dans les mêmes conditions décrites par ZAMORA et coll. en 1996.

C1- Principe de la méthode

Le conductimètre utilisé est à microprocesseur type LF 196 (WTW) 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 5 g découpé grossièrement à l'aide de bistouri pendant 8 secondes est ensuite centrifugé à $100\,000 \times g$ pendant 30 minutes. Le volume de jus récupéré est complété à 20 ml avec de l'eau distillée afin d'avoir un volume suffisant pour plonger la cellule de conductivité. La conductivité électrique de l'eau distillée est mesurée à chaque prélèvement. Cette dernière constitue le blanc. La mesure est réalisée à une température de référence de 25°C.

Le résultat est déduit à partir d'une courbe d'étalonnage obtenue avec des solutions de NaCl pure pour analyse. Les concentrations de NaCl mol/l sont transformées en osmolarité par l'expression (WELL 1997) :

$$O_s = M \times [1 + (p - 1) \times \alpha]$$

Os : Osmolarité (mOsmol/g)

M : Molarité de la solution (mol/l)

P : Nombre d'ions formés par la molécule dissociée (2 pour NaCl)

α : Coefficient de dissociation $\alpha_{NaCl} = 1$

C2. Courbe et fonction d'étalonnage

Dix courbes d'étalonnage ont été établies durant l'expérimentation dans le but de déterminer la fonction d'étalonnage moyenne et d'en tracer la courbe moyenne. Le meilleur ajustement de la droite d'étalonnage a été réalisé par la méthode des moindres carrés.

Le tableau 6 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).

Tableau 6. Paramètres des différentes fonctions d'étalonnages, (N = 10)

N	R ± E. T	r	P
1	0.0021± 0.0001	0.9995	0.001
2	0.0021±0.0001	0.9995	0.001
3	0.0021±0.0001	0.9998	0.001
4	0.0020±0.0001	0.9998	0.001
5	0.0021±0.0001	0.9994	0.001
6	0.0020±0.0001	0.9990	0.001
7	0.0021±0.0001	0.9996	0.001
8	0.0021±0.0001	0.9992	0.001
9	0.0021±0.0001	0.9960	0.001
10	0.0021±0.0001	0.9999	0.001

*r et R : coefficients de corrélation et de régression ; E. T. écart- type.

La fonction moyenne d'étalonnage (N = 10) est de la forme

$$Y = (a \pm IC) X$$

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 (SCHWARTZ 1993)

$$IC = t \times E.T. / \sqrt{N-1}$$

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 a 0.00001 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 (χ) sont exprimées respectivement en mOsmol/g et $\mu S/cm$

$$Os = (0.002 \pm 0.0000075) \times \chi$$

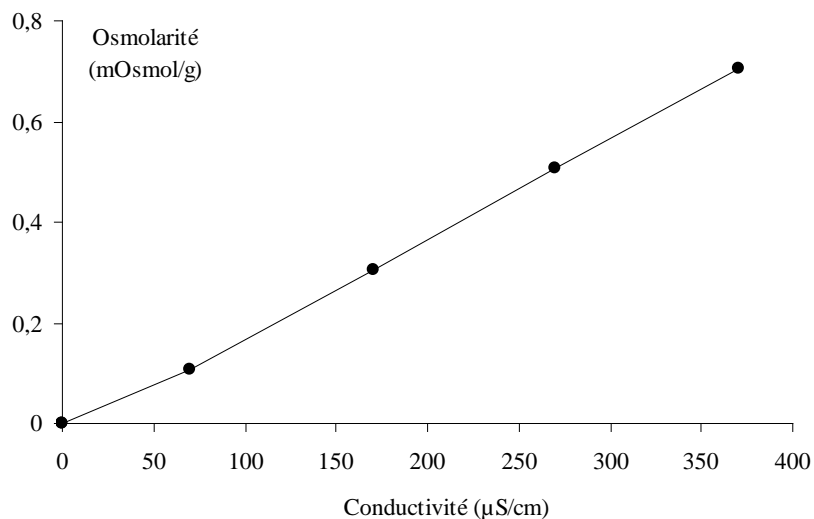


Figure 13. Courbe moyenne d'étalonnage

C3. Détermination du seuil de détection

Cette estimation indirecte de l'osmolarité par mesure de la conductivité électrique n'étant pas utilisée auparavant, elle reste une technique qui demande encore une mise au point. 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 d'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 7). La moyenne est de 9.76 ± 0.84 (µS/cm).

Tableau 7. 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

Moy \pm ET : 9.76 \pm 0.84

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 (μ) est égal à 1.96.

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

X : limite de détection

Moy_{blanc} : moyenne des conductivités des blancs

E. T._{blanc} : écart-type des conductivités des blancs

μ : l'écart réduit à 1.96 pour un ddl de 69 et seuil de signification $P < 0.05$

Si Moy_{blanc} est nulle par la soustraction de cette valeur de toutes les mesures de conductivité, on obtient : $X = 1.96 \times \text{E. T.}_{\text{blanc}} / \sqrt{N-1}$ où X est la valeur du plus petit signal. 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 0.20 $\mu\text{S/cm}$ qui correspond à 0.0004 mOsmole/g.

3- 2. 4. MESURES MECANIQUES (Estimation de la dureté par le pénétromètre)

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.

Le pénétromètre est un instrument qui comprend un support ou table de pénétration reposant sur quatre pieds à vis pour ajuster l'appareil. Il possède une vaste gamme d'accessoires. La partie la plus importante est le corps pénétrant servant à mesurer la pénétrabilité. Cette dernière est la résistance à l'enfoncement d'un corps de pénétration spécifique dans la substance étudiée. Cette mesure permet de qualifier la plasticité, la dureté ou les caractéristiques rhéologiques d'un matériau. Elle est exprimée en millimètres. Pour la viande, le corps pénétrant utilisé est une aiguille qui pèse 2.5 g avec un guide de 47.5 g, La charge totale est de 50 g. Sur le cadran d'affichage apparaissent les valeurs standard suivantes :

limite supérieure	50.00 mm
limite inférieure	00.00 mm
Temps de pénétration	5.00 secondes
Retard au démarrage pré réglé	0.0 secondes
Profondeur de pénétration	mm

Un échantillon de muscle cru 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.

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.

3- 2. 5. APPRECIATION DE LA TENDRETE PAR ANALYSE SENSORIELLE

Le test de notation avec échelle est choisi pour l'appréciation de la tendreté de la viande (ANONYME 1995). 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. De ce fait, sont 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 déroulent les essais se situe entre 10 heures et 11 heures 30 minutes du matin.

a. Traitement de l'échantillon avant dégustation

Les morceaux de viande appariés à ceux ayant servis 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 la viande est de 80°C. Les cubes de chaque muscle sont cuits séparément.

b. déroulement de l'essai

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 (ANONYME 1995). Chaque sujet dispose d'un formulaire de réponse (figure 14) comportant l'échelle établie suivante avec notes et qualificatifs :

- 1 extrêmement dure
- 2 très dure
- 3 dure
- 4 assez dure
- 5 ni dur, ni tendre
- 6 assez tendre

- 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 l'échelle de tendreté suivante :

Echelle	Profondeur de pénétration (mm)
1	[0 – 2.22]
2	[2.23 – 4.45]
3	[4.46 – 6.68]
4	[6.69 – 8.91]
5	[8.92 – 11.14]
6	[11.15 – 13.37]
7	[13.38 – 15.6]
8	[15.61 – 17.83]
9	[17.84 – 20.06]

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

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) 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

- 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 15). 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 coll. 1996)

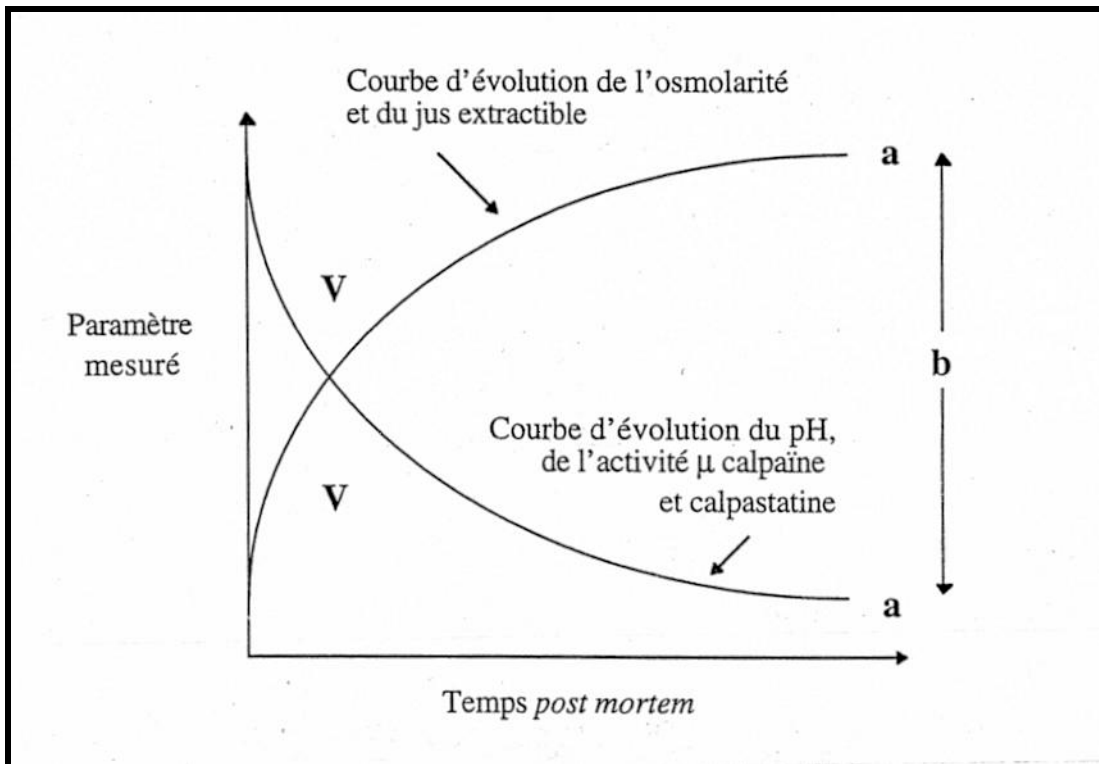


Figure 15. Détermination de la valeur finale, la vitesse et l'amplitude d'évolution des paramètres suivis en cinétique

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

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

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

Les courbes de mesures au pénétromètre ont été ajustées à l'aide de l'équation polynomiale d'ordre 2 de la forme

$$Y = a X^2 - bX + c$$

a, b, c : les régrésseurs

Y : profondeur de pénétration exprimée en millimètre

X : le temps post mortem

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).

La régression linéaire multiple utilisée pour rechercher des éventuelles relations entre la dureté des muscles et les variables biologiques mesurées. Elle permet d'étudier la relation entre une variable Y et des variables $X_1, X_2 \dots X_p$ à l'aide du modèle

$$Y = a_0 + a_1 \cdot X_1 + a_2 X_2 + a_p X_p + \text{erreur}$$

La variable Y représente la variable a expliquée (la tendreté) et $X_1, X_2 \dots X_p$ les variables explicatives (différentes variables mesurées). Ce modèle est linéaire car les coefficients $a_0, a_1, a_2 \dots a_p$ interviennent de façon linéaire. Le terme « erreur » du modèle signifie que la relation n'est pas totalement exacte (TOMASSONE et coll. 1983).

- Pour tous les tests, le seuil minimal de signification a été choisi à $p < 0.05$

Préambule

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 la mise en place d'outils permettant l'analyse des qualités de la viande. Pour cela, il m'a été nécessaire d'aller me former dans les laboratoires étrangers et plus particulièrement à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Clermont Ferrand. Cela explique pourquoi une partie de l'étude a porté sur le bovin, modèle le plus utilisé en France, et l'agneau modèle plus facile d'accès en Algérie. Un petit laboratoire a donc été installé, par la suite, à l'INATAA avec le matériel nécessaire à la mesure des paramètres physicochimiques traditionnels (pH, température, osmolarité, etc.). Nous avons, par ailleurs, acquis très récemment un appareil d'électrophorèse qui permet de réaliser des manipulations de recherche au laboratoire et aux projets de fin d'études des étudiants. Ne disposant pas d'osmomètre, nous avons développé une méthode de mesure de ce paramètre basée sur la détermination de la résistance à la conduction du courant par les extraits musculaires et cette mesure a été étalonnée par rapport à un osmomètre. Enfin, s'agissant de travaux sur la tendreté de la viande, il nous fallait disposer d'une méthode instrumentale objective d'estimation de la dureté de la viande. Celle-ci fait appel à un pénétromètre. Cette mesure a été étalonnée par rapport à un jury de dégustation. La pénétrométrie n'est utilisable que pour des muscles ayant des taux de collagène réduits, comme c'est le cas chez l'agneau.

Le deuxième objectif était de mettre en place des expérimentations destinées à mettre en œuvre toutes ces techniques afin de les maîtriser et de pouvoir ensuite les utiliser en routine. Nous exposerons les résultats obtenus un peu plus loin ainsi que les publications réalisées ou en cours de parution.

Enfin, durant mes séjours à l'INRA de Clermont Ferrand, j'avais participé à des expérimentations dont certaines ont été publiées en tant que co-auteur et une autre nouvelle publication d'article est en voie de parution dans « African Journal of Agricultural Research », celle-ci reprend les résultats obtenus à l'INRA et plus précisément à la Station de Recherches sur la Viande. Nous présenterons les résultats obtenus et les ouvertures de ces travaux vers de nouvelles hypothèses sur les mécanismes enzymatiques d'attendrissage des viandes.

CHAPITRE I

Développement d'une méthode physique d'estimation de la tendreté de la viande d'agneau

1. Estimation de la tendreté de la viande d'agneau par pénétrométrie

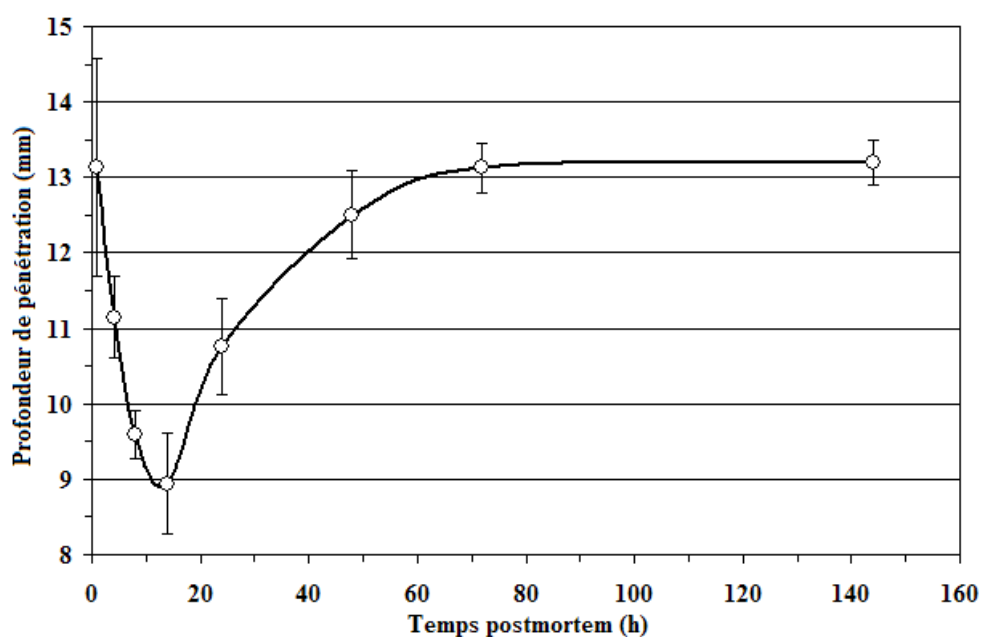
La tendreté de la viande reste la qualité la plus recherchée par le consommateur et c'est elle qui va conditionner le rachat (fidélisation) ou le rejet d'un type de viande par ce dernier. D'autre part, les viandes de mouton et de bovin en particulier sont des denrées chères et ceci quelle que soit sa tendreté, qualité qui ne pourra être jugée qu'au moment de sa consommation. Si l'on veut un jour disposer d'un rapport qualité/prix convenable, il est indispensable de se donner les moyens de prédire cette qualité dès l'abattage de l'animal. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'ensemble de ce travail qui vise à identifier des marqueurs biologiques et/ou physicochimiques susceptibles de prédire la qualité ultime d'une viande donnée dès l'abattage de l'animal. Ces marqueurs pourront être également utilisés par les producteurs dans leurs programmes de sélection génétique destinés à améliorer la qualité des animaux et de la viande qui en est issue.

Pour estimer cette qualité, nous avons développée une méthode instrumentale basée sur la pénétrométrie que nous avons calibrée par la mise en place d'un jury de dégustation, la dégustation étant la méthode de référence d'appréciation de cette qualité.

Pour illustrer ce propos, nous présentons le profil d'évolution, au cours de la conservation, de la dureté du muscle *Rectus femoris* d'agneau (Figure 16). La dureté a été estimée par pénétrométrie et se trouve donc exprimée en mm de pénétration.

Figure 16: Profil d'évolution postmortem, de la dureté du muscle *Rectus femoris* d'agneau estimée par pénétrométrie.

Chaque point est la moyenne (\pm écart type) pour 10 animaux différents.



Comme nous pouvons le constater, le profil est identique à ceux rapportées 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)

L'étude proprement dite a fait l'objet d'une communication écrite et paru dans les Proceedings du Congrès International sur la sécurité alimentaire, qui s'est déroulé en 2006 à Tunis. Tous les résultats sont donc présentés dans cette communication, jointe ci-après.

Communication N° 1

PREDICTING VARIABILITY OF TOUGHNESS IN LAMBS MEAT BY PENETROMETRY

BOUDJELLAL¹Abdelghani*, BECILA¹Samira*, AGLI Abdel Nacer*, OUALI Ahmed**

***In: Proceedings du Congrès International sur la sécurité alimentaire qui
s'est déroulé à Tunis en 2006***

¹ BA et BS have an equivalent contribution to the present work

PREDICTING VARIABILITY OF TOUGHNESS IN LAMBS MEAT BY PENETROMETRY

BOUDJELLAL¹ Abdelghani*, BECILA¹ Samira*, AGLI Abdel Nacer*, OUALI Ahmed**

**Département de la 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*

ABSTRACT

The variability in organoleptic quality is a real problem of meat technology. Particularly tenderness, which is the major palatability trait affecting consumer acceptance of meat. recently there isn't a practical to measure the tenderness of meat in industry.

The aim of this study was to elaborate a method predicting meat tenderness. This property is measured with the penetrometer. Because of the non specificity of this apparatus to assay meat tenderness, we calibrated the penetrometer measurements to sensory test. The variability of tenderness with the animal age and muscle types were tested.

Six ELTEL breed lambs had been selected and have similar zootechnic characteristics, excepting the age. Different animals from 6 to 18 months were used in the order to get different degrees of toughness. The studied muscles are: Semi Membranosus, Semi Tendinosus, Bicipitis Femoris and Rectus Femoris.

Sperman rank correlation is used for relationships between the penetrometer and sensorial test. Analysis of variance are used to study the age factor and muscle types.

The results obtained show that, globally values of penetrometer were correlated positively ($r = +0.98$; $p < 0,01$) with those of sensory tests, we also, underline highly significance for age, and muscle types factors ($F: 7,91$ and $25,45$ respectively $p < 0,01$).

We conclude that the penetrometer should be used for an overall estimate of meat tenderness and should be advantageously used instead of sensory analysis. Penetrometry was found to be a fast and, not destructive technique for tenderness assessment. Using this technique, we could expect to predict the ultimate toughness of meat.

INTRODUCTION

The study of the texture of the meat, is a significant component of quality and acceptability of this food by the consumer. The estimate of the hardness of the meat utilizes pluridisciplinary knowledge : in the field of rheology (mechanical properties of food) and in the field of the sensory analysis (perception of the texture determined by a jury). The rheological techniques seek to predict the judgements of the tasters.

Tenderness of the meat results from the mechanical properties of the various structures of the muscle but also, of the bonds which exist between these structures. The measurement of the properties specific to each principal structure which are the muscle fibres, the fibres of collagen and the elastin fibres, is possible in the case of the raw meat. It is possible to define zones of deformation in each one of which only one structure is requested (LEPETIT 1991). Such an approach is more difficult to realize with cooked meat (GRAJALES and coll. 1996).

The majority of the measuring instruments of the hardness of the meat are destructive and not very practical on an industrial scale. However, the penetrometer is a simple, fast, not destructive and inexpensive instrument. It can be used for the classification of the parts of carcass according to their degree of hardness, but it should be calibrated with the sensory appreciation. The complexity of the process of chewing during which food undergo deep structural modification is not easily reproducible (MATHONIERE and coll. 1996).

Thus our study consists in calibrating the penetrometer with the sensory analysis so that, instrumental measurements is easily converted into scale of real tenderness. We introduced two factors of variation of the tenderness : the age and the type of muscle. However, the texture of the meat is under the dependence of a great number of other biological and technological factors (OUALI 1990).

MATERIALS AND METHODS

Animal and sampling

The study was carried out on the muscles : *Semi Membranosus (SM)*, *Semi Tendinosus (ST)*, *Bicipitis Femoris (BF)* and *Rectus Femoris (RF)* of six lambs of race ELTEL. These lambs zootechnic come from the same farm in order

to be, rather homogeneous. We selected different animals of age (6 to 18 months) with an aim of having different degree of hardness. The weight of the carcasses evaluated to slaughtering varies between 14 and 21 kg.

After animal slaughtering, carcasses are preserved during 20 hours at 12-18°C in order to avoid the phenomenon of cold shorting. Then the carcasses are stored at 4°C.

The four muscles are taken 24 H *post mortem* from left and right thigh. Each muscle was cut out in ten sections, (length 2cm, height 2cm, width 1cm). The ten sections of the same muscle can be used at the same time for mechanical measurement and then with the sensory appreciation of which the goal of minimized the variability of to the sample.

Mechanical measurement

Mechanical measurements were carried out at ambient temperature using a standard penetrometer PNR 10. This instrument is provided with a body, which penetrates in free fall in a matter under the action of its own weight, during a given time. This penetration depth measured in 1/10 mm or unit of penetration (1 UP = 0.1 mm) then constitutes an objective size of the consistency of the analysed substance. The penetrating body used is a needle which weighs 2.5 g with a guide of 47.5 g, the total load is 50 g.

The meat samples are placed on the support of the penetrometer. The constraint is applied perpendicular to muscle fibre (KRZYWICKI 1977; TORNBERG and coll. 1994). The maximum penetration depth is posted in millimetre after a time of 5 seconds penetration. A high value penetration depth corresponds to a very tender meat, a low value indicates that the meat is hard.

Sensory measurement

Treatment of the sample before testing

The same meat sections used for instrumental measurement are used after cooking in water at 95°C. This mode of cooking was selected, in order to ensure an homogeneous heating for all parts of the sample. It also makes it possible to have a homogeneous texture by avoiding the formation of crust on the surface (LAROCHE, 1983; HERNANDEZ 1999). We kept the same volume of water of 400 ml for the cooking of all the samples. The time of cooking is 30 minutes. The temperature reached in the heart of the cube of the meat is 80°C. The cubes of each muscle are separately cooked.

Sensorial test

The AFNOR test of notation with scale was selected for the appreciation of tenderness meat (AFNOR 1995). This test of notation makes it possible to quantify the amplitude of the differences between the meat samples. Ten tasters qualified with this kind of analysis estimated tenderness of each muscle by chewing freely the sample according to a scale of tenderness ranging from 1 at 9 (Table 1).

Statistical analysis

Analysis of the correlation between instrumental measurement and the age of the animals was carried out by the calculation of the simple linear regressions (TOMMASSONE 1989).

The effect of animal age and muscle type was carried out using an analysis of the variance to one factor (WINER 1971).

The correlation between instrumental measurement and the sensory assessment of meat tenderness was calculated according to the test of general tendency using the coefficient of correlation of the rank of Spearman.(ROUQUETTE and coll. 1985).

For the application of the test, we transformed into notes all instrumental measurements according to the following scale of tenderness:

Table 01 : Scale of transformation of instrumental measurements in to notes*

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 hard	[6.69 – 8.91]
5	- Nor hard, nor to tighten	[8.92 – 11.14]
6	- Sufficiently tighten	[11.15 – 13.37]
7	- Tighten	[13.38 – 15.6]
8	- Very Tighten	[15.61 – 17.83]
9	- Extremely tighten	[17.84 – 20.06]

*the limit of minimal penetration is 0 mm, the limit of maximum penetration is equal to 20 mm (measurement starting from the free fall of the body penetration from 2 cm high).

We calculate then the coefficient of correlation of the rank of Spearman between Xi (notes of transformed instrumental measurement) and Yi (notes of sensory measurement) using the following simplified formula:

$$r = 1 - 6 \sum di^2 / N (n^2 - 1) \text{ where}$$

di : the difference of the notes (Yi - Xi)

n : numbers of couple (instrumental measurement - sensory measurement). Each instrumental or sensory measurement corresponds to the average obtained starting from 10 different measurements.

r : coefficient of correlation

RESULTS AND DISCUSSION

Measurements with the penetrometer of the various muscles are reported in the table 02. results obtained show that, more the age of the animals increases more the penetration depth and the small thus strength to the pressure applied is larger.

The coefficient of variation (CV) high for certain sample can have two distinctes causes: (a) the presence and irregular distribution of connective tissue in the sample and/or (b) the preparation of the sample which is a major cause of error since the meat must be cut in a standard way. This difficulty has been noted for most mechanical technique used so far for meat tenderness assessment (VOISEY 1976 ; JOSEPH and CONNOLLY 1979).

Table 02 : Penetration depth expressed in millimetre measured on 24 H *post mortem* samples from muscles *semimembranosus* (SM), *semitendinosus* (ST), *Biceps Femoris* (BF) and *Rectus Femoris* (RF)*

Animal number		A1	A2	A3	A4	A5	A6	
Age of the lambs (month)		6	6	8	8	14	18	
Penetration depth (mm)	SM*	Mean	12,19	12,91	11,65	11,92	11,47	10,03
		SD*	0,28	1,91	2,26	0,07	1,06	0,71
		CV (%)*	2,32	14,79	19,42	0,59	9,25	7,12
	ST	Mean	12,91	12,42	11,32	11,99	10,93	10,79
		SD	1,02	0,92	2,12	0,78	3,2	1,76
		CV (%)	7,89	7,4	18,73	6,49	29,31	16,31
	BF	Mean	14,06	13,63	11,91	12,4	10,76	11,82
		SD	3,04	0,35	0,64	1,2	0,49	1,2
		CV (%)	21,63	2,59	5,34	9,69	4,6	10,17
	RF	Mean	10,21	11,45	8,83	8,62	8,83	8,72
		SD	3,49	0,49	1,35	0,73	1,35	0,09
		CV (%)	34,16	4,32	15,3	8,45	15,3	1,05

*Each value corresponds to the mean and standard deviation (SD) obtained for 10 different measurements. CV (%) = (SD / mean) × 100

Evaluation of the age and muscle type effect on tenderness as assessed by penetrometry

Variance analyses has been carried out in order to determine if measurements with the penetrometer its significantly different according to the age from the animals and the type of studied muscles (table 03).

The variance analysis showed a highly significant (p< 0.01%) effect of the age of the animal and the muscle type on the penetrometry values. This instrumental measurement confirmed therefore the well established differences in tenderness according to these two factors.

Table 03 : Evaluation, by variance analysis, of the animal and muscle effect on the penetrometry measurements

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

Correlation between instrumental measurement and the age of the animals

We note a strong correlation between instrumental measurement and the age of the animals, for all the muscles but in a negative way for the four muscles (R = 0.91; p < 0.05). As the age of the animals increases, the depth penetration decreases (Fig. 01). Therefore the younger animals present a greater tenderness than the older animals.

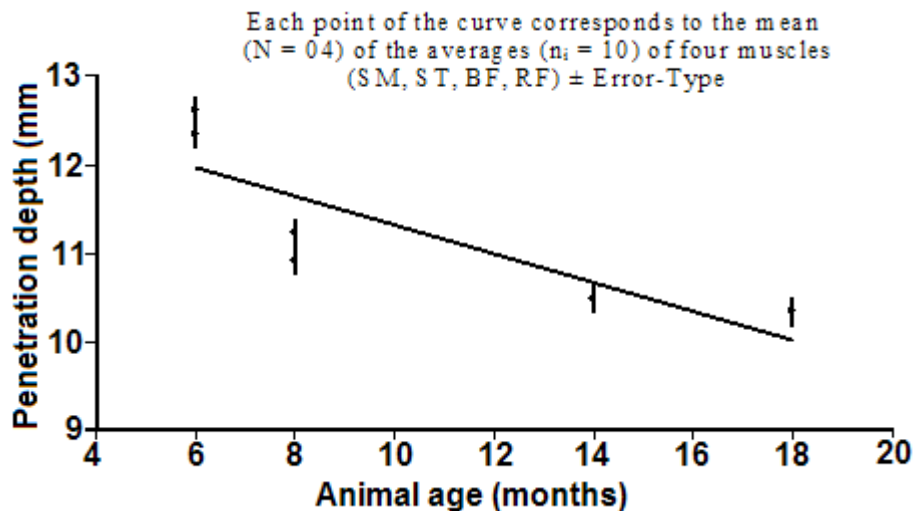
The penetrometer, measures the resistance of the muscle to the penetration of the myofibrillar and conjunctive tissu. However, the conjunctive tissue evolves very little during storage and thus constitutes a basic hardness which is not solved completely at the time of the phenomenon of maturation of meat (NISHIMURA and coll. 1996)). Therefore the resistance of conjunctive tissu is measured the more so as, the animals not the same age. Consequently, the content

collagen of the muscles cannot be regarded as equivalent of an animal to the other and thus happen in the variability of the hardness of meat (LEPETIT and coll. 1986). But in addition to collagen, other biological parameters would play a role in the variability of tenderness related to the age, as the contractile structure which becomes less sensitive to the action of the endogenous proteases and salts (OUALI 1990b). Moreover for sheep (OU and Coll.1991) and rabbits (OU and FORSBERG 1990), proteolytic activities decrease with age in the skeletal muscles, in particular those of the calpains.

Correlation between instrumental measurement and muscular typing

The evolution of tenderness, measured in-depth of penetration, of the four muscles according to the age of the animals is illustrated by fig. 02. We observe an increase in the hardness of the meat with the increase in the age for all the muscles. Muscles SM, ST and BF present relatively close values of measurement. Whereas for muscle RF, the measured penetration depths are low, compared to the three other muscles. One observes for the same animal as muscles SM, ST and BF are more tender than muscle RF. This is probably of with the type of muscle.

Fig. 01 : Evolution of the penetration depth (mm) according to the age of the animals



Meat tenderness is strongly dependent on the muscle type. Indeed, it is three times more significant than the species effect, with regard to the speed and the intensity of tenderisation (DRANSFIELD and coll. 1980-81). Thus, the *longissimus dorsi* and *Semimembranosus* were aged within 12 days whereas continuous *Gluteus medius* was not aged before 24 days *post mortem* (EILERS and coll. 1996). The aging rate is correlated positively with their glycolytic metabolism and their contraction speed (OUALI 1990b; ZAMORA and al. 1996).

The RF, regarded as a type IIB muscle (glycolytic metabolism and fast contraction speed) (ASHMORE and DOERR, 1971), presents the maximum toughness at all post-mortem sampling time as compared to the three other muscles, i.e. SM, ST BF, which are all more oxidative.

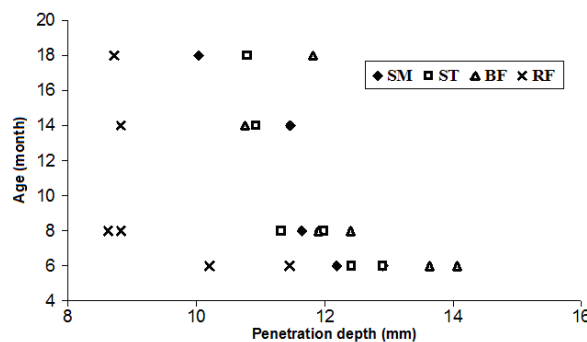


Fig. 02 : Penetration depth (mm) for muscles *Semimembranosus* (SM), *Semitendinosus* (ST), *Biceps Femoris* (BF) and *Rectus Femoris* (RF) according to the age of the animals (months)

Correlation between instrumental measurement and sensory measurement of tenderness

The results obtained were validated by the search for relation between instrumental and sensory measurement. The test of SPEARMAN, applied overall to the whole of the measurements taken without distinction enters the four studied muscles of the thigh, the test revealed a strong correlation ($R = 0.98$) between instrumental measurements and sensory measurements (Table 04). The penetrometer can thus be used for a estimation of tenderness of the meat of the thigh.

However, we cannot prejudge validity of instrumental measurement for all the muscles present in the thigh. We need to test the existence of the relation between sensory and instrumental measurement for each muscle. We applied the test of SPEARMAN to each muscle. The estimate of tenderness by instrumental measurement is correlated with sensory measurement for the muscles ST and BF. But, for muscles SM and RF it does not have there a significant correlation to the threshold of 5% between the two methods of measurement (table 04).

Table 04. Results of the test of SPEARMAN for the various muscles*

Muscles	N	R	P
The four muscle	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: numbers of couple (instrumental measurement - sensory measurement). Each instrumental or sensory measurement corresponds to the average obtained starting from 10 different measurements; r : coefficient of correlation ; P : probability; NS : non significant $p > 0.05$

The weak correlation between instrumental and sensory measurement for muscles SM and RF could be explained by the regrouping of the data on average in the analysis of the data ($N = 60$). The regrouping aiming at minimizing the fluctuations had as a consequence the reduction of the sample size with $NR = 6$ and the alteration of the power of the test of SPEARMAN.

In order hand this weak correlation can be also explained by the fact that the penetrometer does not measure only the properties of muscle fibres but also of conjunctive tissu. The collagen, which is the principal one constituting conjunctive fabric, is a significant factor of the hardness of meat (YOUNG and BRAGGINS 1993). The content of this last is variable of a muscle with another and thus has a more or less significant basic hardness (VALIN 1995).

KHAN and coll. (1973) think that the heterogeneity of the muscle is responsible in major part of the weak correlation between instrumental measurement and sensory measurement. Indeed, in the same muscle the forces of shearing vary from an end with another and a place to another. Consequently, even with well cut samples and by taking all the precautions of use, the samples measured instrumental do not have necessarily the same one tenderness as those done to tasting. In the same way the tasted samples necessarily did not have a uniform tenderness.

JOSEPH and CONNOLLY (1979) studied the correlation existing between instrumental measurement using a tenderometer VOLODKIVITH based to the test of shearing and compression and the sensory measure carried out on six muscles LD, PM, BF, ST, SM and GM. The correlations are significant only for muscles LD and PM. For our study, these results confirm the weak correlation for the muscle SM whereas for muscles ST and BF we found a strong correlation.

Relationship between instrumental and sensory measurement

Finally, we showed a strong relation between the instrumental and sensory assessment of meat tenderness irrespective of the muscle type. This is interesting in the overall estimate, fast of is tenderness of the meat of the thigh. The total relation connecting sensory measurement, real estimate of tenderness ($Tend_r$) with instrumental measurement with the penetrometer (MI) is :

$$Tend_r = (0.62 \pm 0.30) MI + 4.22$$

Tend_r : real tenderness, expressed in scale of tenderness (value rounded to nearest whole number)

MI : instrumental measurement expressed in millimetre

For the two muscles presenting a significant correlation, the relations are :

Muscle *Semi Tendinosus* : $Tend_r = (2.25 \pm 0.63) MI + 3.93$

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

These relations determined starting from instrumental and sensory measurement can be used in practice on the ground, at the level of the slaughter-house for example by using the penetrometer as a fast and non destructive technique

for tenderness assessment of the thigh. Measurement with the penetrometer is easily converted into tenderness scale according to table 01. Penetrometry constitutes therefore a simple method to classify carcasses according to level of tenderness

CONCLUSION

According to the results obtained, the penetrometer discriminates the samples according to the age of the animals and the muscular type. It measures simultaneously resistances of conjunctive tissue which is low in lamb muscles and the myofibrillar proteins. The penetrometer can be used for an overall estimate of tenderness of the meat of lamb and can thus replace the sensory measurement of tenderness.

From an industrial point of view, that is interesting in the estimate of *post mortem* hardness at 24H of the meat by using the penetrometer which is fast, non destructive and inexpensive technique predict, ultimate tenderness of lamb meat.

However, we cannot prejudge about the validity of the instrumental assessment of tenderness by pénétrométrie for all muscles of the carcass. The present relationship needs to be consolidated by using a more significant number of animals and a larger set of muscles consumed preferentially for their tenderness. Other sources of tenderness variability could be tested like the species, breed, sex...

ACKNOWLEDGEMENTS

We would thanks Mr. OUALI AHMED (INRA Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France) for the development of the experimental protocol and Mr. BOUSABOUA ATMAN for financial assistance.

REFERENCES

1. AFNOR, 1995. Norme AFNOR NF V - Analyse sensorielle – Méthodologie – Essai de notation, In : Recueil des normes françaises – Contrôle de la qualité des produits alimentaires., Analyse sensorielle, AFNOR, 5^{ème} édition, AFNOR, Paris, 1995 : 400p.
2. ASHMORE C. R. & DOERR L., 1971. Comparative aspects of muscle fibre types in different species. *Exp. Neurol.*, **31**, 408-418.
3. DRANSFIELD E., JONES R. C. D. & MACFIE H.G.H., 1980-1981. Quantifying changes in tenderness during storage of beef. *Meat Sci.*, **5**, 131-137.
4. EILERS 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.
5. GRAJALES A., LEPETIT J. & CANISTRO J., 1996. Contraction au froid et chauffage de la viande bovine. *J. viandes Prod. Carnés Vol 17 (6)*, 339-341.
6. HERNANDEZ P., NAVARRO J. L., TOLDRA F., 1999. Lipids of pork meat affected by various cooking techniques. *Food Sci. Tech. Publishers, Inc.* **5(6)**, 501-508.
7. JOSEPH R., CONNOLLY J., 1979. Measurement and prediction of tenderness in six beef muscle. *Meat Sci.* **3 (2)**. (C. D. I. U. P. A., N°127918), 21-29.
8. KHAN A., LENTZ C., VAN DEN BERG L., 1973. Relation between shear force and tenderness of beef. *J. of Food Sci.*, **35(3)**. (C. D. I. U. P. A., N° 67990), 1258-1259.
9. KONDO H., KIMURA M. & ITAKANA N., 1991. Manganese, copper, zinc and ion concentration and subcellular distribution into two types of skeletal muscle. *Proc. Soc. Exp. Med.*, **196**, 83-87.
10. KOOHMARIE M., KILLEFER J., BISHOP M. D., SHACHELFORD S. D., WHEELER T. L. & ARBONA J. R., 1995. In : Expression of tissue protéinases and regulation of protéine degradation as related to meat quality. Ouali A, Deneyer D. I. & Smulders F. J. M. (eds), ECCEAMST, Utrecht, Pays-Bas, 395-411.
11. LAROCHE M., 1983. Transferts intervenant au cours du chauffage de la viande. Réunion viandes et produits carnés. In : Technologie de la Viande et des Produits Carnés. Girard J. P. & Valin C., 1988. APRIA. INRA. Technique et documentation – Lavoisier. Paris, 280p.
12. LEPETIT J. & BUFFIERE C., 1995. Meat ageing measurement comparison between two mechanical methods *Fleischwirtsch.*, **75(10)**, 1120-1222.
13. LEPETIT J., SALE P. & OUALI a., 1986. Post mortem evolution of rheological properties of the myofibrillar structure. *Sci. des Alim.* **16**, 161-174.
14. MATHONIERE C., MIOCHE J. & CULIOLI J., 1996. Evaluation de la texture de la viande par différentes methods : rhéologique, sensorielle et électromyographique. *J. viandes Prod. Carnés Vol 17 (6)*, 336-338.
15. OU B. R MEYER H. H. & FORSBERG N. E., 1991.: Effects of age and castration on activities of calpain and calpastatin in sheep skeletal muscle *J. Food Sci.* **69**, 1919-1924.
16. OU B R. & FORSBERG N E, 1990. Age related expressionn of calpain and calpastatin activities and nRNA in skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **111**, 497-452.
17. OUALI A., 1990a. La maturation des viandes : facteurs biologiques et technologiques de variation. *Viande prod. Carnés*, **11**, 281-290.
18. OUALI A., 1990b. Meat tendirisation : possible causes and mechanisms. A review. *J. Muscle Foods.* **1**, 129-165
19. THOMASSONE R., LESQUOY E. & MILLIER C., 1989. La régression. Nouveau regards sur une ancienne méthode statistique. Inra et Masson, Paris, 177p
20. VALIN C., 1995. Animal and muscle variability in tenderisation : possible causes. In : Expression of tissue protéinases and regulation of protéine degradation as related to meat quality. Ouali A, Deneyer D. I. & Smulders F. J. M. (eds), ECCEAMST, Utrecht, Pays-Bas, 435-442.
21. VOISEY P., LARMOND E., 1977. The effect of deformation rate on the relationship between sensory instrumental measurements of meat tenderness by the Warner-Bratzler method. *J. Inst. Sci. Tech. Alim.* **10**, N°4. (C. D. I. U. P. A., N° 118593), 307-312.
22. WHIPPLE G. & KOOHMARAIE M., 1992. Effects of lamb age, muscle type and 24-hour activity of endogenous proteinases on *post mortem* proteolysis. *J. Anim. Sci.*, **70**, 798-804.
23. YOUNG O. A. & BRAGGINS T. J., 1993. Tenderness of ovine muscle Semimembranosus : is collagen concentration or solubility the critical factor ?. *Meat Sci.*, **35**, 213-222.
24. ZAMORA F., DEBITON E., LEPETIT J., LEBERT A., DRANSFIELD E. & OUALI A., 1996. Predicting variability of ageing and longhness in beef M. *Longissimus Lumborum and Thoracis.* *Meat Sci.* **43 (3-4)**, 321-333.

Conclusion

Les résultats rapportés dans cette communication montrent clairement que la méthode d'estimation de la dureté de la viande d'agneau par pénétrométrie donne des valeurs fortement corrélées aux valeurs de tendreté estimée par un jury de dégustation. Nous disposons donc maintenant d'une méthode simple de mesure de la dureté d'une viande qui va nous permettre d'envisager des études sur l'influence qualitative et quantitative de divers facteurs de variation de cette qualité qu'ils soient de nature biologique, technologique ou génétique.

CHAPITRE II

Paramètres physicochimiques et qualité de la viande bovine

1 EVOLUTION DES PARAMETRES PHYSICO-CIMIQUES

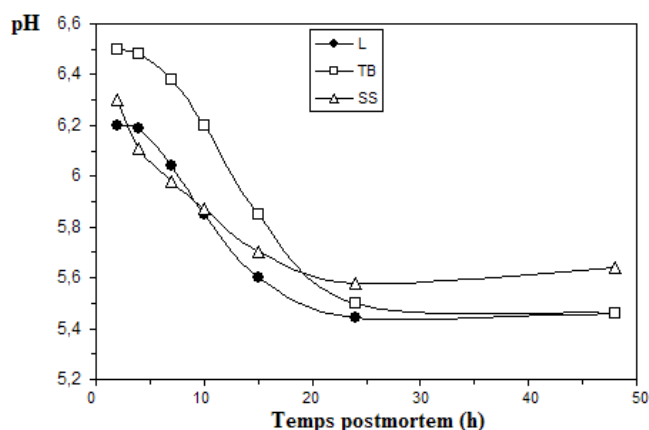
1.1. Le pH

1.1.1. Profil de chute du pH et qualité de la viande bovine

Le pH a toujours été considéré, à raison, comme un facteur primordial dans le processus de maturation des viandes et l'élaboration des qualités organoleptiques. L'acidification du muscle *post mortem* va en effet avoir une influence sur de nombreux processus cellulaires comme la migration des ions et l'apparition d'acide lactique, (osmolarité), la perméabilité des membranes, les mécanismes enzymatiques, la contraction musculaire, la rétention de l'eau, etc. Jusque là, on admettait que la chute du pH était un phénomène continu plus ou moins rapide selon les caractéristiques métaboliques des muscles et la vitesse de chute de la température. Une vitesse de chute du pH trop rapide est généralement synonyme de viande exsudative et dure (Monin et Ouali, 1991).

Ce facteur intervient dans tous les processus qui interviennent dans l'acquisition des qualités organoleptiques des viandes (tendreté, couleur, saveur, flaveur et goût). 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 17 (Ouali, 1990b). 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.

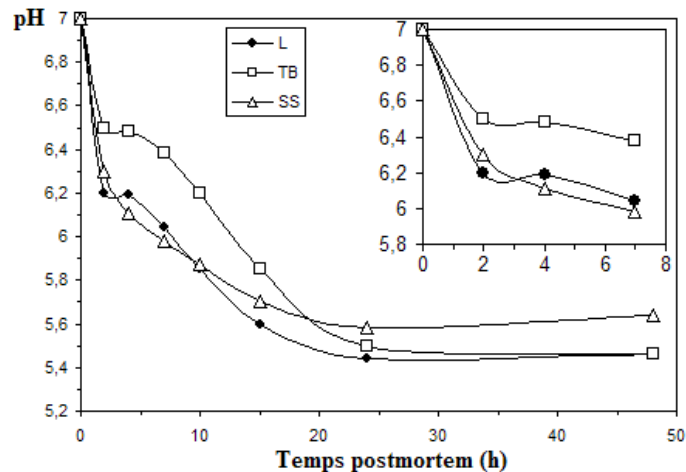
Figure 17 : Evolution *post mortem* du pH des muscles *longissimus (L) triceps brachii caput longum (TB) et supraspinatus (SS)* de bovin conservé à l'état réfrigéré (OUALI 1990). Le premier point expérimental correspond au temps 2h postmortem.



Si maintenant on ajoute à la série de points la valeur physiologique initiale (Figure 18), on observe l'apparition d'au moins une discontinuité dans la courbe. Pour les muscles L et TB, un plateau est ainsi détectable entre 2 et 4 h *post mortem*. Ce plateau est mieux visible dans l'insert de la figure 18. Par contre le profil semble monophasique pour le muscle SS dans cette zone du tracé mais également

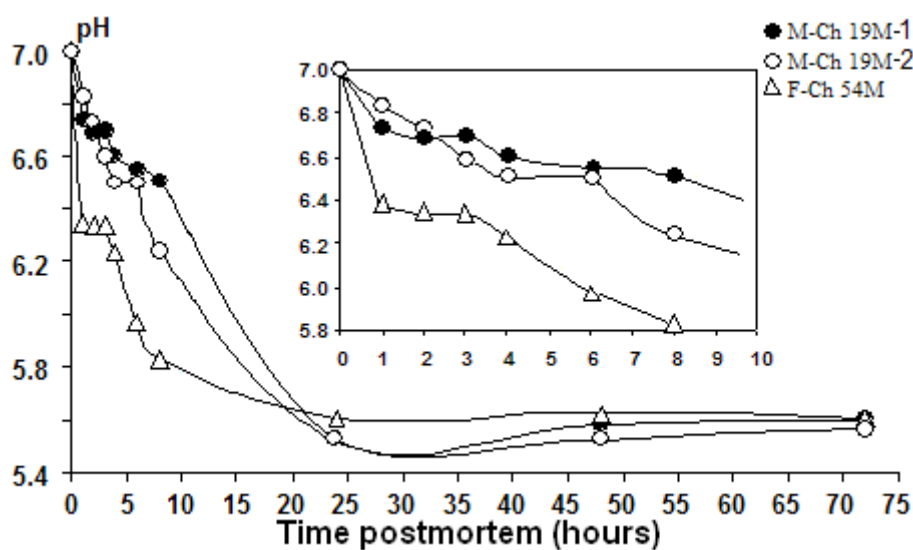
au-delà. Ce dernier diffère des autres par le fait qu'il s'agit d'un muscle de type I (muscle rouge à contraction lente). De là, à penser que ce type de muscle ne présente pas de plateau, il n'y a qu'un pas qu'il nous paraît hasardeux de franchir car nous ne disposons que de peu de données sur ce type de muscle.

Figure 18: Profil d'évolution du pH des muscles *longissimus (L)*, *triceps brachii caput longum (TB)* et *supraspinatus (SS)* de bovin incluant la valeur physiologique initiale. L'insert présente le profil pour les 8 premières heures postmortem et met plus en évidence les plateaux



Le nombre de plateaux de stabilité du pH détectables dans les 10 premières heures *post mortem* varie, d'un animal à un autre entre 1 à 2 comme l'illustre la Figure 19.

Figure 19: Profil d'évolution du pH dans le muscle *longissimus (L)* de bovin. Les animaux, tous de race charolaise; étaient des mâles de 19 mois (M_Ch_19M-1 et -2) et d'une femelle de 54 mois (F_Ch_54M).



1.1.2. Analyse de profils de chute de pH en relation avec la tendreté ultime de la viande.

L'expérience a porté sur 100 animaux bovins de race, de sexe et d'âges différents. Les caractéristiques des animaux sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques des animaux utilisés dans cette étude

Breeds	Sex	Age (months)						Total
		15	19	24	54	78	102	
Aubrac	F				4	2	4	10
	M	3	2	7				12
Charolais	F				2	5	6	13
	M	4	4	7				15
Limousin	F				4	4	6	14
	M	3	4	6				13
Salers	F				2	1	6	9
	M	2	5	7				14
Total		12	15	27	12	12	22	100

Comme nous l'avons vu précédemment (Figure 4), les différentes transitions observées sont le plus souvent des plateaux correspondant à une stabilité transitoire du pH. Pour un animal donné, le nombre maximum de plateaux est de 2. Dans certains cas plus rares, ce plateau correspond en fait à une augmentation plus ou moins importante du pH.

Une analyse rapide des données par estimation des différences entre deux valeurs de pH consécutives (pH2h-pH1h ; pH3h-pH2h ; pH4h-pH3h ; pH6h-pH4h et pH8h-pH6h) nous a permis de constater qu'une grande majorité des animaux présente une discontinuité dans la chute de pH (figure 20).

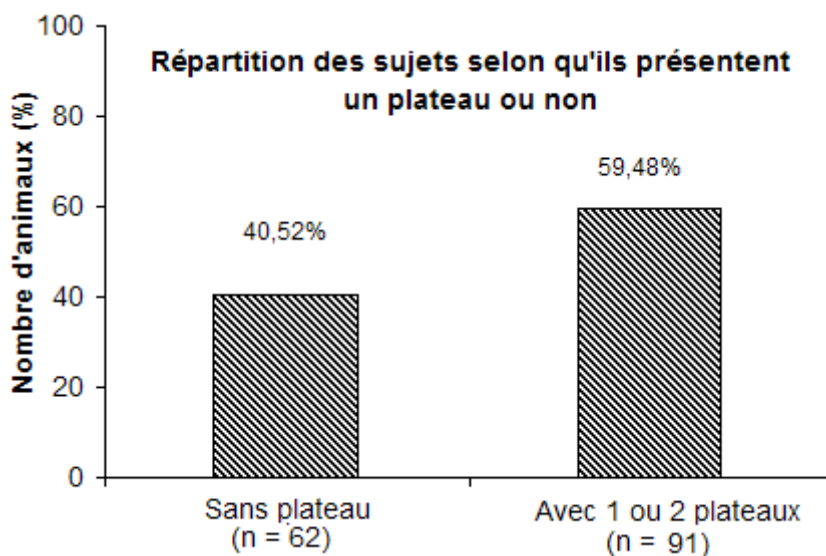


Figure 20: Proportion d'animaux (n=153) présentant ou non une discontinuité du profil de chute de pH estimé par mesure des différences entre deux valeurs consécutives. .

Une analyse plus détaillée de ces profils est faite avec détermination des vitesses de chute du pH pour chaque palier et une relation de ces paramètres avec la dureté ultime de la viande estimée, sur viande crue, par compression à 20% de déformation. A noter que le nombre de plateaux semble être le déterminant le plus important pour la définition de la tendreté ultime. Tous les résultats sont présentés dans un texte de publication soumis à un journal international.

Publication N° 1

Polyphasic character of postmortem pH drop in bovine and ovine muscles: consequences on meat texture and possible causes

Abdelghani Boudjellal[§], Samira Becila^{a*}, Gerald Coulis*, Carlos Hernan Herrera-Mendez*, Laurent Aubry*, Jacques Lepetit*, Khaled Harhoura[‡], Miguel Angel Sentandreu[⊕] and Ahmed Ouali*.

- Soumis pour publication dans un journal international AJAR

**Polyphasic character of postmortem pH drop in bovine and ovine muscles:
consequences on meat texture and possible causes.**

Abdelghani Boudjellal[§], Samira Becila^{a*}, Gerald Coulis*, Carlos Hernan Herrera-Mendez*,
Laurent Aubry*, Jacques Lepetit*, Khaled Harhoura[‡], Miguel Angel Sentandreu[⊕] and Ahmed
Ouali*.

^(*) INRA, UR370 QuaPA, 63122 Saint Genes Champanelle, France

^(§) INATAA, Université de Constantine, Route de Ain El Bey, 25000, Constantine, Algérie

[⊕]Actual address: Department of Food Science, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos
(C.S.I.C.), Apt. 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

[‡] Ecole nationale vétérinaire d'El Harrach, 12 Av. Hacène Badi, 16010 El Harrach, Algérie

^aAddress correspondence to:
Abdelghani BOUDJELLAL,
INATAA,
Université de Constantine,
Route de Ain El Bey,
25000, Constantine, Algérie
Tel : (213) 31 66 18 84
Fax : (213) 31 66 18 84
E-Mail : boudjellal@caramail.com

Abstract

In meat science, pH is an important determinant of meat quality including juiciness and tenderness. Muscle acidification is generally considered to be a continuous and monophasic process. We provide here evidence that pH drop is, in fact, a discontinuous and polyphasic process. The experiment was carried out on the *Longissimus* muscle of 100 bovine animals of different breeds, sex and age, and on five different muscle of ten 11 to 13 months old Ouled-Djellal lambs. In beef, *Longissimus* muscle of all animals investigated exhibits a discontinuous profile of pH fall with either one or two pH stability steps (plateau) appearing within the first 8 hours post-mortem. Analysis of five different lamb muscles comforted the findings obtained in beef and further showed that the two pH stability steps observed appeared concomitantly in all muscles, suggesting that the number of steps characterised more the animal than the individual muscles. In beef, ultimate toughness of *Longissimus* muscle from animals showing one pH stability step is significantly lower than that observed for animals showing two steps. Animals with one step further showed a lower initial rate of pH drop and a lower extent of pH fall. This relationship between the number of pH stability steps and the ultimate toughness of meat was confirmed using two other sources of variation of the ultimate quality of meat including sex and age of the animals. Regarding the different groups of age, a significant and linear relationship was found between the ultimate meat toughness and the percentage of animals showing either one step or two steps ($r = 0.92$). Taken together, these results demonstrated that muscle from animals showing only one stability step will provide more tender meat irrespective of their breed, sex and age. The potential origins of the pH stability steps and their relationship with meat toughness were then discussed.

Key words: pH, muscle, pH stability steps, meat toughness, beef, lamb, cell death

Introduction

After meat animals bleeding, muscle cells have been long assumed to try to survive and produce ATP from creatine phosphate and glycogen stores by activating the glycolytic pathway and from the tri-carboxylic (TCA) pathway as well. This was clearly supported by recent proteomic analysis of pre- (living animal) and post-bleeding bovine muscle biopsies (Jia et al., 2006a). These authors indeed reported a clear shift in energy metabolism in post mortem muscle with an increase in enzymes involved in the glycolytic pathway as well as in the TCA cycle. After bleeding, very limited amounts of blood is present in muscle and oxygen supply from blood is very likely negligible. However, residual oxygen including the myoglobin bound one will support oxidative metabolism (Pösö and Puolanne, 2005). The low amount of oxygen therefore available will however enable a transient pyruvate conversion to energy via the tri-carboxylic acid cycle. Taken together, the present findings clearly argued for an intense metabolic activity in muscle cells just after bleeding.

As soon as oxygen is depleted, pyruvate is converted to lactate which accumulates in postmortem muscle leading to muscle acidification. The rate and extent of pH drop in postmortem muscle are important determinant of meat quality including meat tenderness (Zamora et al., 2005) and water holding capacity as well (Offer, 1991). In a large majority of investigations, the pH drop was considered so far to be a continuous process up to the end point normally ranging from pH 5.4 to 5.9 depending on muscle type. However, one or two transient pH stability steps have been reported to occur in beef muscles in the first hours after slaughter (Ouali et al., 2006; Herrera-Mendez et al., 2006; Hildrum, personal communication). A similar pH behavior has been also recently observed in a set of five different lamb muscles.

The present paper reported the characterization of the polyphasic pH drop profiles in bovine and lamb muscles and the potential influence on the ultimate beef toughness.

Materials and methods

Animals and sampling

Amongst 164 bovine animals of different breeds, sex and age slaughtered at the abattoir of the INRA Research Centre for another experiment, 100 were used for the present study. The number of animals within each group (sex and age groups) is depicted in Table 1. After captive-bolt stunning, exsanguinations and dressing, the *M. Longissimus* was excised within 30-45 min after stunning. Five 5 cm thick slices were cut off. One slice was immediately used for pH measurement, a second one was vacuum packed for the next pH measurements at day 0 (measurements every hours up to 9h post-mortem). The three other cuts were vacuum packed and stored for pH measurements at 24, 48 and 72h post-mortem. Vacuum packed samples were immediately immersed in a water bath at 12°C for 24h and then transferred to the cold room at 4°C until subsequent use.

Ten 11 to 13 months old Ouled Djellal Lambs were used. Measurements of the pH were performed on 5 different muscles excised within one hour post-slaughter including *M. Semimembranosus* (SM), *Biceps femoris* (BF), *Rectus femoris* (RF), *Longissimus lombarum* (Ll) and *Longissimus thoracis* (Lt). The pH was measured every hours up to 9 hours post-mortem and then at 24, 48 and 72h post-mortem. As for beef, muscles, vacuum packed samples were immersed in water bath at 12°C for 24h and then transferred to 4°C until subsequent use.

pH measurement

Muscle pH was measured on a crude extract after homogenisation of 2 g of muscle in 18 ml of cold 5 mM sodium iodoacetate using a WTW 537 pH meter (Amilabo, Lyon, France).

Rheological assessment of meat toughness

Muscle toughness was assessed on raw meat according to Lepetit and Buffiere (1995). This measurement is independent on the collagen content enabling comparison of muscles with various amounts of connective tissue (Lepetit, 1991).

Fitting of the pH profile for rate constant determination

This was performed using the following exponential equation:

$$[(\text{pH}_{\text{max}} - \text{pH}_{\text{min}}) \text{Exp}(-k_{\text{pH}} t)] + \text{pH}_{\text{min}}$$

where pH_{max} and pH_{min} were the maximum and minimum pH values; k_{pH} , the rate constant of pH fall, and t , the length of post-mortem storage (hours). Rate constant were determined for all parts of the polyphasic pH drop curve including the first (V1) and the second step (V2), the part of the profile between the last step and 72h post-mortem (Vfinal) and the whole profile (Vtotal). Fitting was carried out with the Microsoft excel XP solver using the least square method. The different parts of the curve fitted and the quality of the fitting are illustrated in Figure 1.

Statistical analysis

Comparison of mean values was carried out using the Student's t test and differences were significant for $p < 0.05$.

Results*Polyphasic profile of pH drop in beef longissimus muscle*

Kinetic analysis of post-mortem pH drop in beef *Longissimus* muscle revealed a polyphasic process with one or two transient pH stability steps in the first hours post-slaughter (Figure 2A). This feature was observed in all animals analysed in that experiment irrespective of their breed, sex and age. Figure 2A showed the pH profile of 3 animals. These were a 54 months old Charolais cull cows (F-Ch-54), a 102 months Aubrac cull cows (F-Au-102) and a 24 months old Salers young bull (M-Sa-24). One transient pH stability step was observed between 2 and 3 hours post-mortem for the 54 months old Charolais cull cows whereas the 102 months old Aubrac cull cows showed two steps between 1 and 3 hours post-mortem for the first one and between 4 and 8 hours post-mortem for the second. The Salers 24 months old young bull exhibited only one stability step between 1 and 3 hours post-mortem. The initial rates (first step) of pH drop were estimated to be 2.7 (F-Ch-54), 1.1 (M-Sa-24) and 0.7 (F-Au-102) pH-unit/h.

The configurations (1 or 2 steps) described here were observed for all breeds irrespective of animal age and sex.

Polyphasic profile of pH drop in different lamb muscles

pH drop was analysed in four different lamb muscles including *M. Semimembranosus* (SM), *Briceps femoris* (BF), *Rectus femoris* (RF), *Longissimus lombarum* (Ll) and *Longissimus thoracis* (Lt). Profiles shown in figure 2B are similar for all muscles and all exhibited two pH stability steps between 1 and 3 hours post-mortem for the first one and between 5 and 7 hours for the second. It is worthy to note that these steps are concomitant in the different muscles investigated. This finding would suggest that all muscles of a given carcass would have similar pH drop profiles with one or two pH stability steps depending on the animal, a change characterising very likely more the carcass than the individual muscles considered.

One or two pH stability steps: what is the consequence on the ultimate toughness?

In order to increase the variability in ultimate quality traits, especially tenderness, the present experiment was carried out on 100 animals of different breeds, age and sex. Ultimate toughness of *Longissimus* muscle was estimated mechanically after 14 days of storage at 4°C and the mean value of the set of animals showing one pH stability step (n=53) was compared to the mean value of the other set with two pH stability steps (n=47).

As shown in Figure 3, muscles from animals with one pH stability step are significantly less tough after 14 days of ageing than those with two pH stability steps ($p < 0.001$).

The question arising is to know what could be the relationship with the rate and extent of pH fall? To answer this question, different rate constants characterising the pH profile were determined by fitting the experimental curve to an exponential equation. The first one take into account the whole set of pH values from 1h to 72h post-mortem (V_{total}). The second (V_1) and the third (V_2) constant correspond to the rate of pH fall during the first and second stability steps, respectively. The last value (V_{final}) represents the rate of pH fall after the last stability step up to

72 h. On the other hand we determined the extent of pH fall using the 24 h pH value as the end point of the rigor process since, for longer periods, the pH increased more or less.

As shown in Table 2, the set of animals with one pH stability step exhibited a significantly lower extent of pH drop ($p < 0.05$) and initial rate of pH fall (V_1) ($p < 0.05$). By contrast no significant differences between the two groups were found for V_{total} and V_{final} . Greater extents of pH drop (more "acidic" meat) are generally associated with less tender meat. Although data reported in the literature are very controversial, higher initial rate of pH fall often estimated through measurement of the pH value 3h post-mortem, is associated with tougher meat (Eilers et al., 1996). These results are in good agreement with previous studies from our group (Zamora et al., 1996; 2005). The data of table 2 fit quite well with these statements since animals with 1 step are more tender and exhibited higher ultimate pH and lower rate of pH fall in the first hours post-mortem than those with 2 steps.

pH drop profiles in males and females: relationship with ultimate toughness

Previous studies investigating the relationship between male and female meat tenderness provided very controversial data (reviewed in Monin and Ouali, 1990). When some differences were noted, these remain still unexplained. In the present work we found that females provide meat significantly more tender than males ($P < 0.05$) (Figure 4a). As the above results suggested that animals with one pH stability step would give more tender meat, we tested whether the presence of only one pH stability step is more frequently observed in females than in males. As depicted in Figure 4b, 67 % of the females showed only 1 pH stability steps versus 40% in males supporting the above assumption that the presence of only one pH stability step is often associated with more tender meat. Accordingly, males with one step were significantly ($p < 0.01$) more tender than those with two steps. Though a similar difference was observed for females this was not significant (Figure 3c).

pH drop profiles as affected by age

It has long been established that ultimate tenderness of beef is closely dependent on the animal age. Results of Figure 5a comforted this statement since, for males and females, ultimate toughness of meat increases with animal age. The fact that this change occurs more sharply in males can be probably explained by the reduced range of age considered for male (15 to 24 months) as compared to females (54 to 102 months).

Plotting of the percentage of animal with two pH stability steps (Figure 5b) versus ultimate toughness led to a positive linear relationship respectively with a high correlation coefficient ($r = 0.92$). In agreement with the results reported above, this would suggest a great impact of the number of pH stability steps in the first hours post-mortem on the ultimate meat toughness. The presence of one step would be synonymous of a better ultimate tenderness.

Discussion

Muscle acidification has always been considered as a major determinant of meat quality traits including juiciness and tenderness. However, this characteristic assessed through pH measurement, is the consequence of complex and not well understood processes. Acidification was generally considered as a continuous process and often ascribed to the production of lactic acid ignoring most of the other metabolites and ions produced by post-mortem muscle cells. Here we reported that muscle acidification is more likely a discontinuous polyphasic process representative of antagonist processes leading to either acidification or alkalisation of the intracellular compartment. Each of them might be successively dominant and non dominant leading to variation in the acidification profile especially in the first hours post-mortem.

The present work thus clearly demonstrate the presence, in bovine *Longissimus* muscle, of one or two pH stability steps occurring essentially in the first ten hours post-mortem and in a pH range of about 6.2 to 6.8. Similar pH behaviour was also observed in a series of five lamb muscles. In that case, muscles analysed exhibited two successive pH stability steps occurring concomitantly

in all muscles. According to these findings, the presence of one or two pH stability steps would seem to be more characteristic of the animal rather than of the individual muscles considered, suggesting that, within a given carcass, most if not all muscles would show the same number of steps depending on the individual animal.

Analyzes of the pH drop profile in beef *Longissimus* muscle were carried out on the two groups of animals with one or two steps by considering the amplitude of pH fall, the initial speed estimated at the level of the first stability step and the final speed estimated for the last part of the curve following either the first or the second step. Comparison of the mean values obtained for each variable between the group with one step and the group with two steps revealed a significant difference only for the initial rate of pH drop and the extent of pH fall. Animals with one step thus showed a significantly lower extent ($p < 0.05$) and lower initial rate of pH fall ($p < 0.05$). Results of previous studies about the relationship between early-postmortem muscle pH and extent of pH fall with beef tenderness have been inconsistent (reviewed in Monin and Ouali 1990 and Eilers et al., 1996). In the present study, higher initial rates of pH fall determined by curve fitting were found to provide tougher meat, a result in agreement with those of Zamora et al., (1996, 2005). This contrasted with the controversial and inconsistent relationship between pH 3h post-mortem and ultimate meat toughness (Eilers et al., 1996). This discrepancy might originate from the fact that pH 3h underestimates the initial rate of pH drop since this point is, in most cases, included in the first pH stability step. Similarly to the findings of Zamora et al., (1996; 2005), a greater extent of pH fall leading to more acidic meat cuts provides also tougher meat.

Two other sources of variability in the ultimate meat toughness were analysed including sex and animal age. Meat from female cattle is generally known to be more tender than males. Although the comparison performed in the present experiment does not concern animals of similar age, we also observed a significantly lower ultimate toughness for females as compared to males. On the

other hand, the percentage of animals showing one pH stability step is much greater for females than for males confirming our previous findings suggesting a better tenderness in animals with only one stability step. For males, the proportion of animals with two pH stability steps is even much higher than those with one step. Although the biological causes of this difference between males and females are not clearly known (reviewed in Monin and Ouali, 1990), a better understanding of the origins of these stability steps would be very likely helpful.

The second source of ultimate toughness variability investigated was animal age. It is well recognized that animal age is an important determinant of meat quality including tenderness (reviewed in Monin and Ouali, 1990). Our results clearly showed that, for both males and females, ultimate toughness increased with animal age. The plot of ultimate toughness versus the percentage of animals with two pH stability steps, a characteristic previously related to tougher meat, showed a high positive correlation between these variables ($r = 0,92$). The present findings therefore provide a new predictor of meat tenderness based on the transient pH stability steps, one step corresponding to more tender meat and conversely, two steps are indicative of tougher meat.

How the presence of pH stability steps in the first hour's post-mortem can be explained? On the basis of the current understanding of the conversion of muscle into meat, it is difficult to find out answers to the related questions. Indeed, the current concept is based on the following view. When phosphocreatine stores are exhausted, the required energy is mainly produced through the anaerobic degradation of glycogen by glycolysis. The rate of the process first depends on the efficiency of the glycolytic pathway, on the level of glycogen stores and on the buffering capacities of muscle cells. As long as glycolytic enzymes are not inhibited by acidic pH, acidification will proceed regularly and proportionally to the glycolytic pathway efficiency. The discontinuity in the pH fall observed in the present experiment cannot be explained by a transient reduction in the activity of phosphocreatine kinase and other enzymes of the glycolytic pathway

but rather by a modification of either the buffering capacity of muscle cells or a transient more efficient control of muscle cell pH. A more efficient control of the pH is supported by the fact that a transient slight increase in the pH was sometimes observed instead of a flat plateau.

In recent review papers, we proposed that the first step of the conversion of muscle into meat is not the rigor mortis but the onset of the cell death programme or apoptosis (Ouali et al. 2006; Herrera-Mendez et al. 2006). The onset of the apoptotic process is energy dependent and includes the synthesis of a series of proteins involved in different cellular regulation pathways and necessary for the completion of the cell death process. These include caspases, a large set of kinases, HSPs, ...etc (Jia et al., 2006ba). This was supported by the clear shift in energy metabolism in the post mortem muscle resulting from an increase in enzymes involved in the glycolytic pathway as well as in the tri-carboxylic acid cycle indicative of greater aerobic and anaerobic energy metabolism in the first hours post-slaughter (Jia et al., 2006b). Amongst these over-expressed proteins, some contributes to cell defense and survival whereas others act for the progression of the apoptotic process, the balance between these antagonist pathways shifting rapidly to the onset of apoptosis. In addition, the intense metabolic activities of muscle cells just after exsanguination need a precise regulation of the intracellular pH which could counteract the acidification process. We further suggested, that the membrane polarity inversion might led to the replacement of acidic charges (phosphatidyl-serine) by basic charges (phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidyl-choline) counteracting the acidification process. In addition this membrane polarity inversion will cause very likely important modifications in the membrane fluidity which will become more permeable to salts and small metabolites molecules. Membrane fluidity is indeed a strictly controlled process (Simkiss, 1998; Vigh et al., 1998).

To conclude, the present report strongly supports the idea that conversion of muscle into meat starts with the onset of the apoptotic process and the increased concentration of antiapoptotic proteins in charge of the protection of cell proteins and structures and, more generally, the

protection of biological functions of cellular proteins, organelles and DNA. Further investigations are now needed to better clarify the origin of these pH stability steps and the underlying mechanisms as well.

Acknowledgements

Thanks to the Commissariat au Développement Economique et à l'Aménagement du Massif Central who funded this project in collaboration with F.N.A.D.T.

References

- Eilers J. D., Tatum J. D., Morgan J. B., and Smith G. C.. (1996). Modification of Early-Postmortem Muscle pH and Use of Postmortem Aging to Improve Beef Tenderness. *Journal Animal Sciences*. 74, 790–798.
- Herrera-Mendez Carlos Hernan, Samira Becila, Abdelghani Boudjellal and Ahmed Ouali. (2006). Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology*. 17, 394-405.
- Jia X, Hildrum KI, Westad F, Kummén E, Aass L, Hollung K. (2006b). Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. *Journal of Proteome Research*, 5, 1763-1769.
- Jia X, Hollung K, Therkildsen M, Hildrum KI and Bendixen E, (2006a). Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. *Proteomics*. 6, 936-944.
- Lepetit J. (1991). Theoretical strain ranges in raw meat. *Meat Science*, 29, 271-283.
- Lepetit, J. and Buffiere, C. (1995). Meat ageing measurement: comparison between two mechanical methods. *Fleischwirtschaft*. 75, 1220-1222.
- Monin, G., & Ouali, A. (1990). Muscle differentiation and meat quality. *Developments in Meat Science*, 5, 89–157.

- Offer G. (1991). Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: Effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Science*. 30, 157-184.
- Ouali Ahmed, 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.
- Pösö A.R., Puolanne E. (2005). Carbohydrate metabolism in meat animals *Meat Science*. 70, 423–434
- Simkiss K. (1998). Cell membranes; barriers, regulators and transducers? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 120, 17–22.
- Vigh L., Maresca B. and Harwood J.L. (1998) Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochemical Sciences*. 23, 369-74.
- Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A. , Dransfield E. and Ouali A. (1996). Predicting variability of ageing and toughness in beef M. *Longissimus lumborum et thoracis*. *Meat Science*, 43, 321-333.
- Zamora F., L. Aubry, T. Sayd, J. Lepetit, A. Lebert, M.A. Sentandreu, A. Ouali. (2005). Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Science*. 71, 730–742.

Table 1: Number of bovine animals used in the present experiment and classified according to their breed, sex and age.

Breeds	Sex	Age (months)						Total
		15	19	24	54	78	102	
Aubrac	F				4	2	4	10
	M	3	2	7				12
Charolais	F				2	5	6	13
	M	4	4	7				15
Limousin	F				4	4	6	14
	M	3	4	6				13
Salers	F				2	1	6	9
	M	2	5	7				14
Total		12	15	27	12	12	22	100

Table 2: Significance of the difference between animals showing 1 or 2 pH stability steps in the extent of pH drop (amplitude), the rate of pH drop over the whole rigor process (Vtotal), the rate of pH drop over the first pH stability step (V1) and over the second stability step (V2) and finally over the last part of the curve between the last pH stability step and 72h post-mortem (Vfinal).

	Amplitude	Vtotal	V1	V2
1 step	1.47 ± 0.07	0.12 ± 0.07	1.25 ± 0.79	
2 steps	1.50 ± 0.06	0.13 ± 0.08	1.61 ± 0.62	1.22 ± 0.82
p	0.022	0.51	0.0129	
	*	NS	*	

Legends to figures

Figure 1: Curve fitting efficiency using an exponential decay of the pH for a muscle showing only one pH stability step (insert Figure 1a). (a) Fitting of the whole curve to determine the constant rate V_{total} . Open circles represent the experimental values and the thick black line is the fitted curve. The insert located the first pH stability step (closed circles) between 1 and 3 hours postmortem. (b) Determination of V_1 by fitting the curve at the level of the pH stability step. (c) Determination of V_{final} by fitting the rest of the pH drop curve after translocation of the points to time 0, a modification enabling the verification of the maximum value estimated by the exponential model.

Figure 2: pH drop profiles in bovine (A) and lamb (B) muscles. (A) pH profile of *Longissimus* muscle from three different animals including a Charolais 54 months old cull cows (F_CH_54M), an Aubrac 102 months old cull cows (F_Au_102M) and a 24 months old Salers young bull (M_Sa_24M) (B) pH drop profiles in five different lamb muscles including M. *Semimembranosus* (SM), *Biceps femoris* (BF), *Rectus femoris* (RF), *Longissimus lombarum* (Ll) and *Longissimus thoracis* (Lt).

Figure 3: Toughness of bovine *Longissimus* muscle (mean \pm SD) from two sets of animals showing one pH stability step (1 step; n= 53) or two pH stability steps (2 steps; n=47). The difference between the two groups is highly significant. (p<0.001)

Figure 4: Toughness of *Longissimus* muscle from female and male as affected by the presence of one or two pH stability steps. (a) Comparison of female (n=46) and male (n=54) ultimate toughness of *Longissimus* muscle; Male are significantly tougher than female (p<0.05). (b) Percentage of animals showing one or two pH stability steps within each group. Steps. A major proportion of females exhibited only one step and conversely a greater proportion of males showed two pH stability steps. (c) Toughness of bovine *Longissimus* muscle (mean \pm SD) from

two sets of animals showing one or two pH stability step within each group (females and males). *Longissimus* muscle from males with two steps is significantly tougher than the same muscle from animals with one step ($p < 0.001$). No significant difference was observed in the female group.

Figure 5: Toughness of *Longissimus* muscle from female and male of different ages (a) and relationship with the percentage of animals showing two pH stability steps (b). (a) as affected by the presence of one or two pH stability steps.

Figure 1

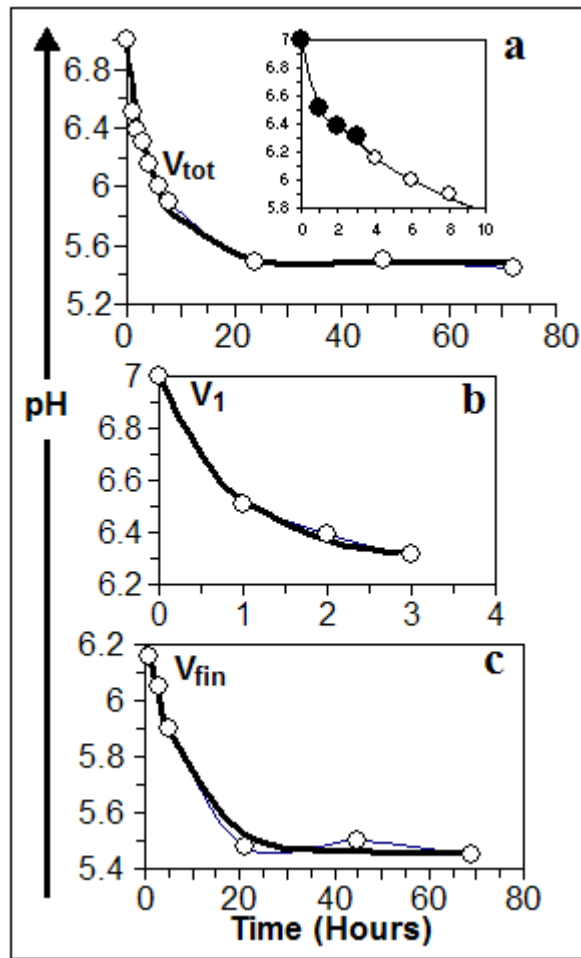


Figure 2

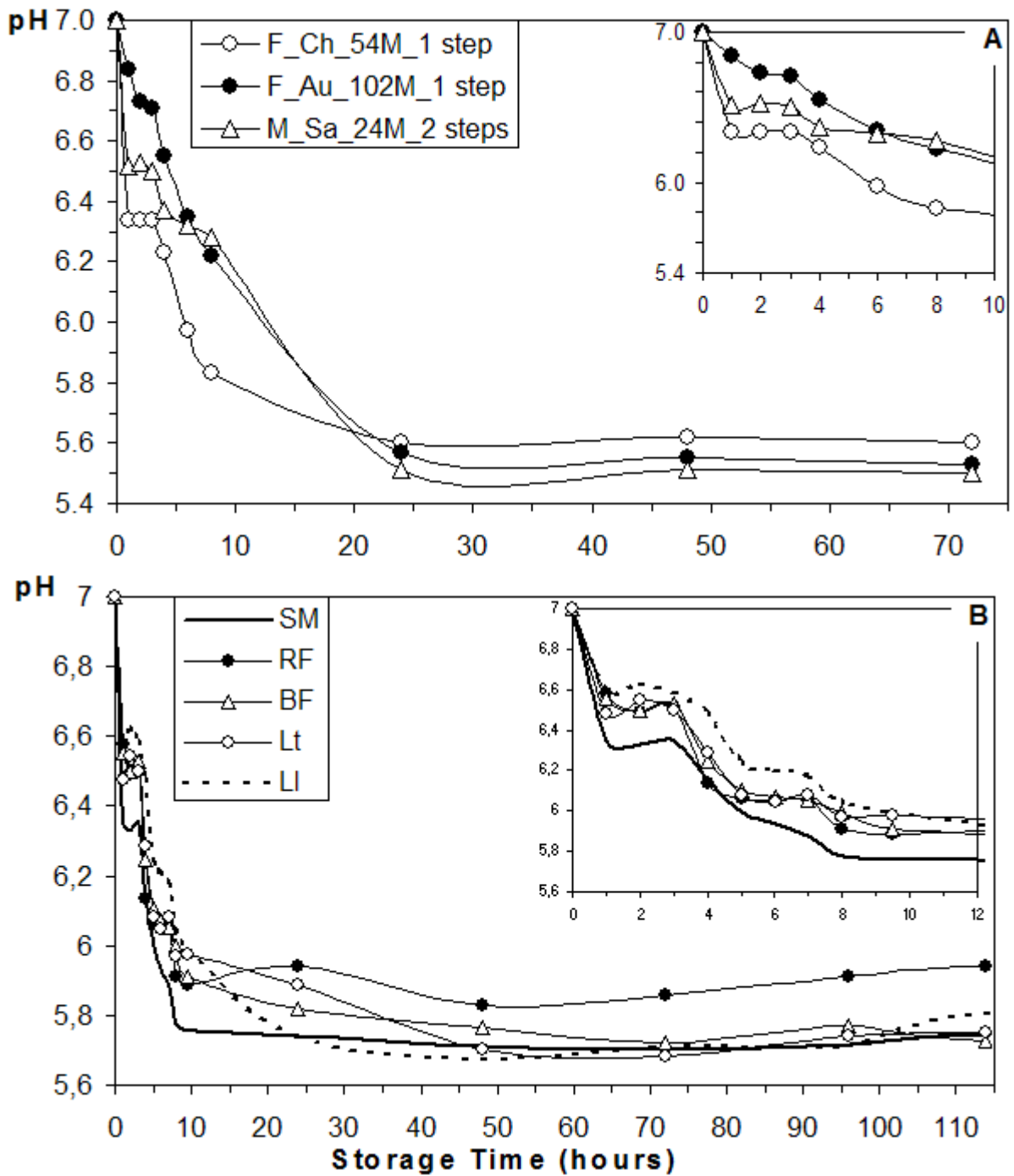


Figure 3

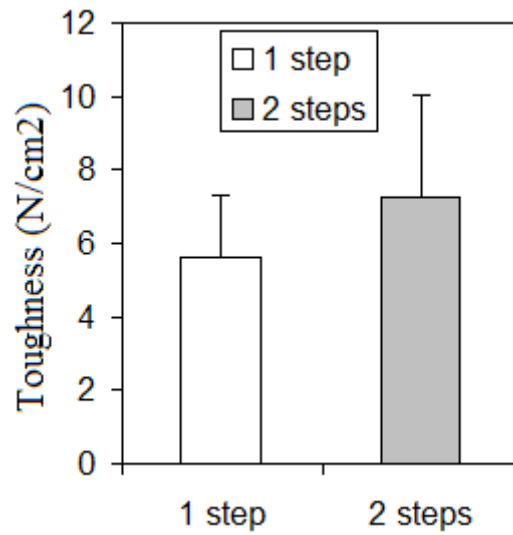


Figure 4

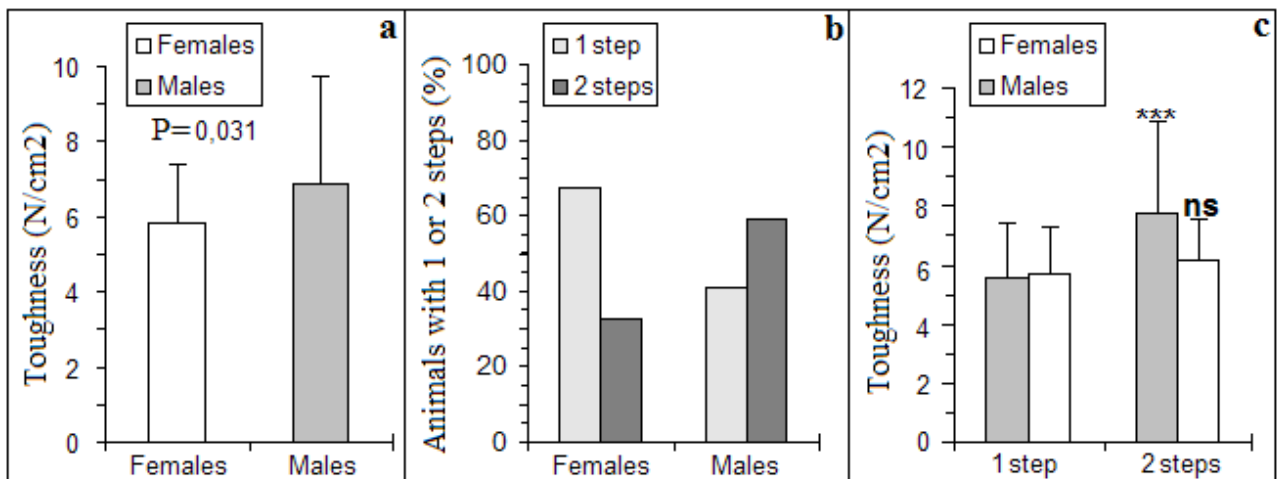
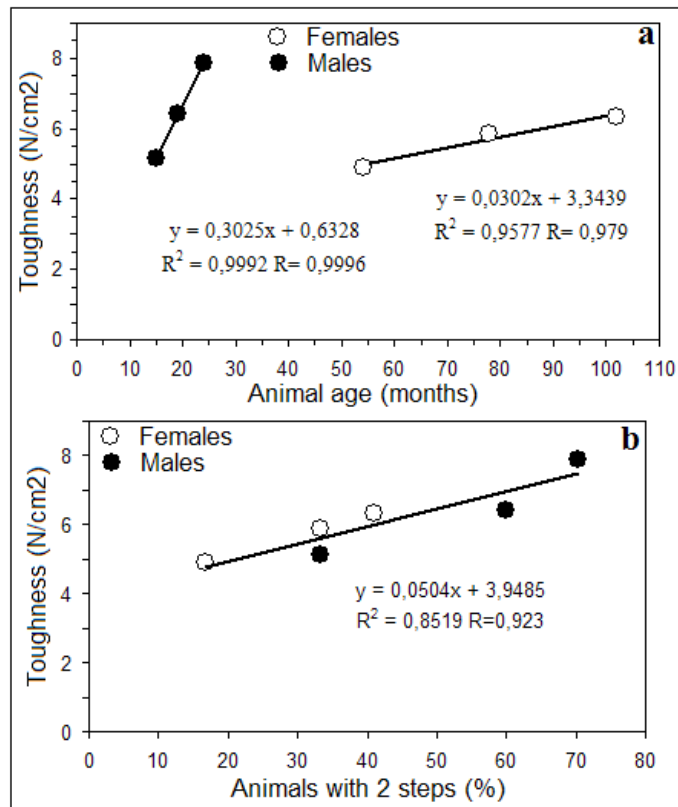


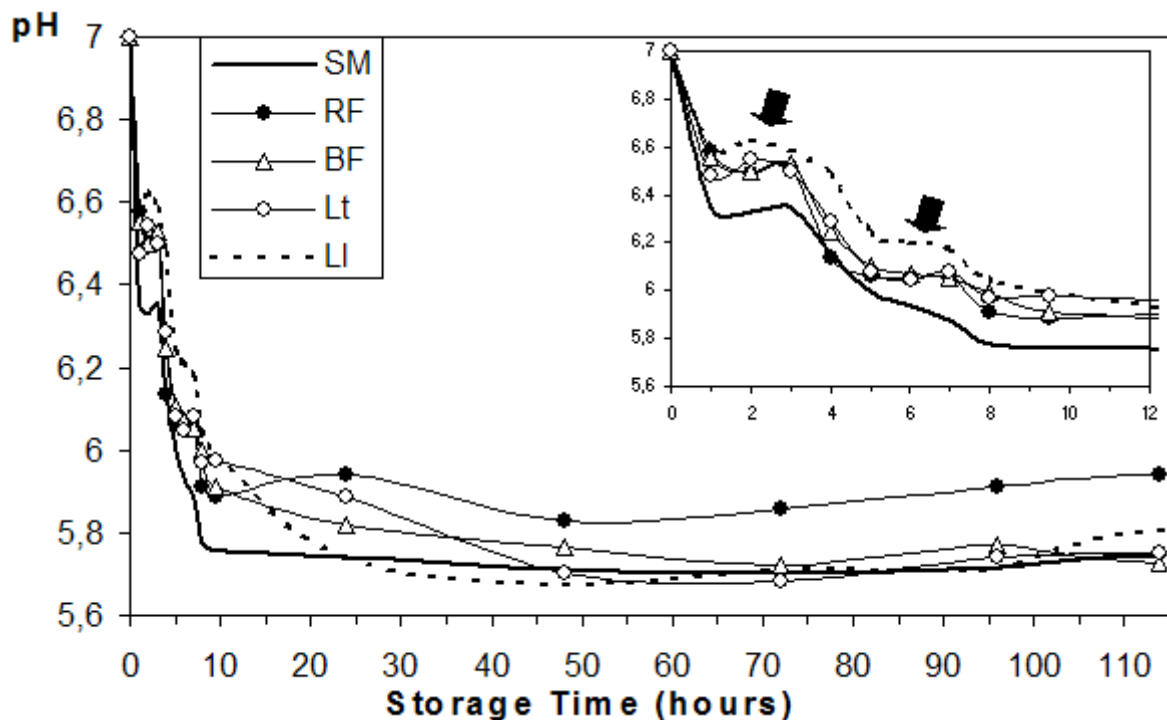
Figure 5



1.3 Profil de chute de pH dans différents muscles d'agneau

Tous les résultats présentés sur ce sujet concernaient jusque là la viande bovine. Il est intéressant de voir si ce phénomène de discontinuité de chute du pH existe dans d'autres espèces et pour cela, nous avons choisi la viande d'agneau, espèce très importante en Algérie. Dans le cas présent, nous avons choisi de suivre l'acidification de 5 muscles d'agneau tous considérés comme tendre. Il s'agit des muscles *Semimebranosus*, *Biceps femoris*, *Rectus femoris*, *Longissimus thoracis* et *Longissimus lombarum*.

Figure 21 : Profil de chute du pH de cinq muscles différents d'agneau incluant les muscles *Semimenbranosus* (SM), *Biceps femoris* (BF), *Rectus femoris* (RF), *Longissimus lombarum* (LI) and *Longissimus thoracis* (Lt).



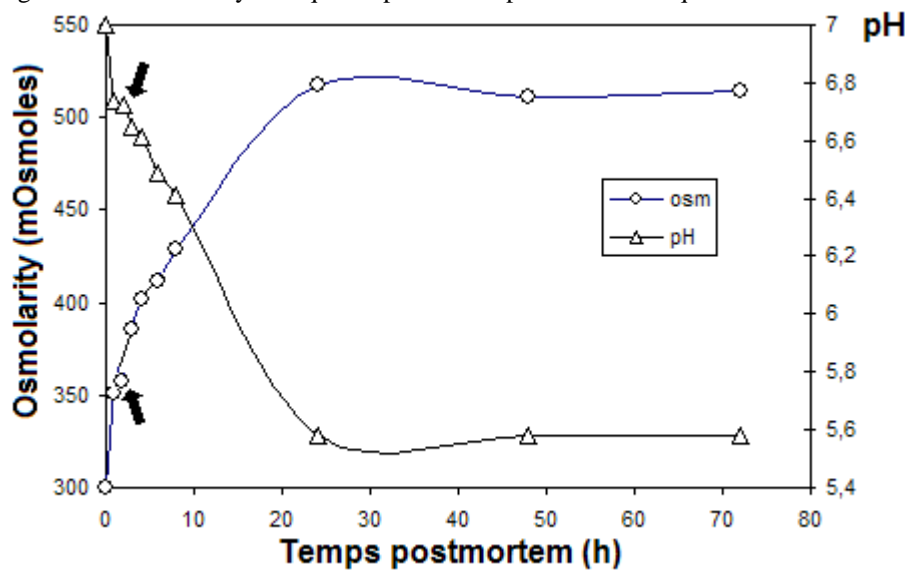
L'observation de la figure 21 montre la présence de 2 plateaux correspondant à une stabilité transitoire du pH (flèche noire) pour l'ensemble des muscles étudiés. Il apparaît en outre que ces phases de transition apparaissent de façon concomitante dans tous les muscles. Ces résultats laissent penser que pour un animal donné, le nombre de plateaux sera identique pour tous les muscles mais il s'agit là d'un animal isolé et une extension de l'étude à un lot représentatif d'animaux sera nécessaire. De la même manière, la relation entre nombre de plateaux et tendreté nécessitera un travail sur un nombre plus large d'animaux. Il est néanmoins clair que ces résultats confirment l'existence d'une discontinuité du profil de chute du pH chez l'agneau également.

2. La pression osmotique

Post mortem, la pression osmotique du tissu musculaire s'accroît progressivement pour atteindre, en fin de rigor, des valeurs deux fois plus élevées que la valeur physiologique qui est voisine de 300 mosmoles. Cette augmentation est liée à l'accumulation de métabolites et de sels libres dans la cellule musculaire, le métabolite quantitativement le plus important étant l'acide lactique.

Pression osmotique et chute du pH sont 2 variables interdépendante et fortement corrélées l'une à l'autre.

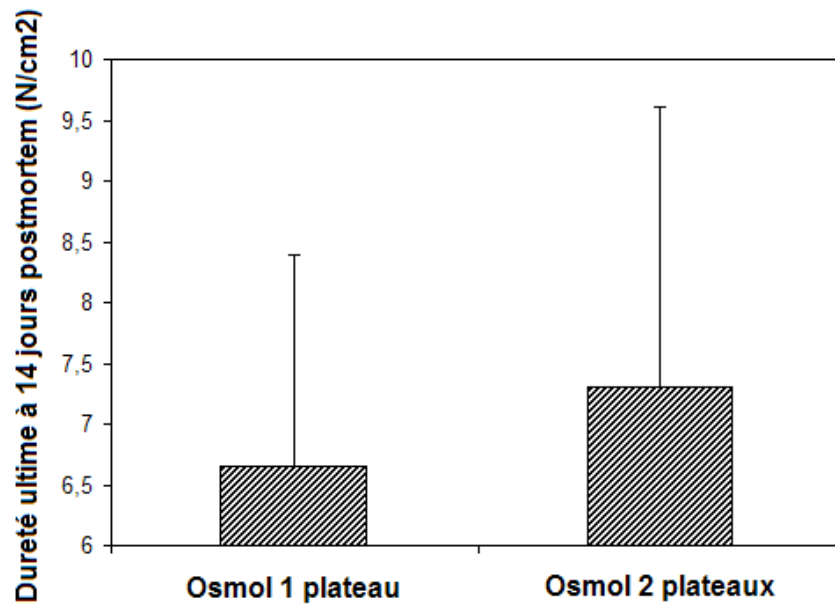
Figure 22: Evolution symétrique du pH et de la pression osmotique dans le muscle *Longissimus* de bovin



La discontinuité dans le profil d'acidification du muscle devrait donc conduire à une discontinuité de l'évolution de la pression osmotique. C'est ce que l'on observe sur la Figure 22. En effet, à la transition (plateau) dans le profil de pH notée entre 1 et 2h postmortem, correspond une transition similaire et concomitante dans le profil d'évolution de la pression osmotique. Ces deux transitions sont indiquées par des flèches sur cette figure.

Le nombre de ces transitions du profil d'évolution de la pression osmotique permet-il de distinguer des viandes de dureté différentes comme cela semble être le cas pour le pH? Une analyse d'un lot de 44 animaux bovins de race, d'âge et de sexe différent, semble indiquer que la discontinuité du profil d'évolution de la pression osmotique conduit aux mêmes conséquences sur la tendreté ultime.

Figure 23: Dureté ultime du muscle *Longissimus* de bovin présentant 1 ou 2 plateaux dans le profil d'évolution de la pression osmotique. Les valeurs indiquées sont les moyennes (\pm SD) pour 23 (1 plateau) et 21 (2 plateaux) animaux.



Comme le montre la figure 23, la présence d'un seul plateau dans ce profil conduit à des viandes moins dures que dans le cas des animaux présentant deux plateaux, observation tout à fait similaire à celle rapportée pour le pH. Notons toutefois que la différence de dureté entre les deux groupes n'est pas significative et cela tient au nombre réduit d'animaux analysés. Une extension de cette étape à l'ensemble du groupe d'animaux (n=153) devrait conduire à une différence significative comme cela a été observé pour le pH. Une conclusion similaire a été notée pour le profil de rétention d'eau, une autre variable fortement corrélée au pH et à la pression osmotique.

En conclusion, ces trois variables très interdépendantes que sont le pH, la pression osmotique et la rétention d'eau, présentent toutes un profil d'évolution discontinu qui ne peut pas être expliqué par les théories actuelles avancées pour expliquer l'acidification du muscle post mortem. Comme nous le verrons, ces transitions ne peuvent s'expliquer que si on admet la présence d'une activité anabolique et/ou catabolique intense dans les premières heures qui suivent l'abattage incluant la synthèse de protéines et de composé riches en énergie (ATP en particulier).

CHAPITRE III

Caractérisation de la maturation de la viande d'agneau

L'ensemble du travail réalisé est présenté dans la publication suivante

Publication N° 2

**Evolution des paramètres physicochimiques au cours de la maturation
de la viande d'agneau de race Ouled djellal**

A. Boudjellal¹, S. Becila¹, H. Ait Amar², A. Ouali³

¹ Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires Université
Mentouri de Constantine Algérie

² USTHB, Alger

³ Station de recherche sur la viande, INRA Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

**Dernières corrections en cours avant traduction
en anglais et soumission pour publication**

**EVOLUTION DES PARAMETRES PHYSICOCHEMQUES
AU COURS DE LA MATURATION DE LA VIANDE D'AGNEAU
RACE OULED DJELLAL**

A. BOUDJELLAL¹, S. BECILA¹, H. AIT AMAR², A. OUALI³

¹ Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires Université
Mentouri de Constantine Algérie

² USTHB, Alger

³ Station de recherche sur la viande, INRA Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

^aAddress correspondence to:

Abdelghani BOUDJELLAL,

INATAA,

Université de Constantine,

Route de Aïn El Bey,

25000, Constantine, Algérie

Tel : (213) 31 66 18 84

Fax : (213) 31 66 18 84

E-Mail : boudjellal@caramail.com

Résumé

Le but de cette étude est de connaître l'évolution des paramètres physico-chimiques au cours de la maturation de la viande d'agneau dans des conditions normales de réfrigération. Les muscles étudiés sont : le Semi Membranosus, le Semi Tendinosus, le Bicipitis Femoris et le Rectus Femoris. Les paramètres mesurés en cinétiques, ont été choisis parce qu'ils contribuent à la définition de la tendreté de la viande. Ceux sont : le pH, l'osmolarité, la rétention d'eau des protéines myofibrillaires. Les résultats obtenus montrent que, dans des conditions de réfrigération à 4°C, l'optimum de tendreté est atteint entre 24 et 48 h post mortem pour les quatre muscles étudiés. Nous avons également, mis en évidence de fortes corrélations entre les paramètres physico-chimiques mesurés. L'évolution de ces paramètres rend compte du phénomène de maturation de la viande.

Mots clés : viande d'agneau, maturation, tendreté, pH, osmolarité, capacité de rétention d'eau

Abstract

The aim of this study is to show the influence of the physicochemical parameters on tenderness of the meat of lamb under standard preservation at 4°C. The studied muscles are: *Semi Membranosus*, *Semi Tendinosus*, *Bicipitis Femoris* and *Rectus Femoris*. The kinetics parameters were chosen for their more or less important contribution to the definition of tenderness of meat are: pH, osmotic pressure, water-binding capacity of the myofibrillar protein. The result obtained show that, under conditions of refrigeration at 4°C of the meat of lamb, the optimum of tenderness is reached between 24 and 48 h *post mortem* for the four muscles studied. We also, underlined strong correlations between the measured physicochemical parameters. Evolutions of these parameters account for the phenomenon of ageing of the meat

Keys words : meat of lamb, ageing,, pH, osmotic pressure, water-binding capacity.²

INTRODUCTION

Les facteurs de variabilité du processus de maturation sont extrêmement divers et concernent aussi bien les méthodes zootechniques employées pour l'élevage que les méthodes de conservation de la viande ou les facteurs individuels liés à l'animal lui-même [1]. Si les deux premières causes sont assez difficilement contrôlables, une meilleure connaissance de la variabilité inter animal et son influence sur la tendreté finale, pourrait être d'un grand apport à la prédiction de la tendreté [2].

La maturation est l'étape qui permet d'obtenir une viande de texture acceptable par le consommateur. Pour ce dernier, la qualité la plus recherchée est sans doute la tendreté [4-5]. Le principal problème qui se pose aujourd'hui est la grande variabilité de cette qualité. Elle est fonction des animaux et des conditions de conservation des carcasses après abattage (condition de réfrigération et durée de stockage). Elle est, aussi, fonction de deux mécanismes qui agissent de manière synergique. Ces mécanismes sont l'un de nature enzymatique et l'autre de nature physico-chimique.

Cette étude, avait comme principal objectif de préciser, à travers les paramètres étudiés, la cinétique d'installation de la rigidité cadavérique et la cinétique d'attendrissage de la viande d'agneau de boucherie. Cette étude a été réalisée sur des échantillons qui ont été conservés dans des conditions de réfrigération aussi proches que possible des conditions qu'on retrouve dans le circuit de commercialisation des viandes. Ce travail permettra, ainsi, de définir un temps minimum de conservation de ces viandes avant leur commercialisation. Comme il nous permettra de déterminer les corrélations qui peuvent exister entre les différents paramètres.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Dix agneaux de race Ouled Djellal, âgés entre 11 et 13 mois, provenant de la ferme pilote BAARAOUIA-Khroub, ont été utilisés dans cette étude. Les poids des carcasses obtenues variaient entre 10 et 18 kg.

Plan expérimental

L'étude a été réalisée sur quatre muscles de la cuisse: le *Semimembranosus* (SM), le *Semitendinosus* (ST), le *Biceps Femoris* (BF) et le *Rectus Femoris* (RF). Les muscles ont été prélevés, à partir des cuisses gauche et droite, 30 minutes après l'abattage.

Immédiatement après le prélèvement, chaque muscle a été découpé en 07 tranches d'épaisseurs égales. Les échantillons ont été emballés dans des sachets en plastique et placés à 12°C pendant 24 h post mortem, puis à 4°C jusqu'à 72 h post mortem.

Mesure de la température

La température des échantillons est déterminée, au moment des mesures, à l'aide d'un thermomètre électronique (TESTO 720, Germany) à sonde pénétrante. La température est directement lue et exprimée en°C.

Mesure du pH

Pour la mesure du pH, 2 g de muscle sont préalablement broyés à l'ultraturax T25 (IKA Labortechnik) à 8 000 tours/minute et homogénéisés au polytron pendant 10 à 15 secondes dans 20 ml d'acide iodoacétique 5 mM. [6]. La mesure du pH est réalisée sur l'homogénat à l'aide d'un pHmètre de paillasse à microprocesseur de type HI8521 (HANNA instruments Singapour) équipé d'une électrode combinée en verre de même marque.

Estimation de la capacité de rétention d'eau des protéines myofibrillaires

Le pouvoir de rétention d'eau des muscles a été estimé au travers la quantité d'exsudat obtenue après centrifugation de 5g de muscle frais grossièrement haché à 10000 G pendant 30 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de type Centrikor T – 42K (KONTRO Instrument). Les résultats sont exprimés en gramme d'exsudat pour un gramme de muscle [7-8-9]

Mesure de l'osmolarité

Nous avons estimé l'osmolarité du muscle indirectement en mesurant la conductivité électrique du jus extrait de la viande. L'extraction du jus de viande a été réalisée dans les mêmes conditions décrites par. [9]

Le conductimètre utilisé était muni d'un microprocesseur type LF 196 (WTW, GERMANY) et d'une cellule de conductivité type TetraCon 96. L'appareil était 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. La limite de détection du conductimètre est égale à 0.20 µS/cm, cette valeur correspond à 0.0004 mOsmole/g.

Le résultat est déduit à partir d'une courbe d'étalonnage obtenue avec des solutions de NaCl pure pour analyse. Les concentrations de NaCl (mol/l) sont transformées en osmolarité par l'expression de [10]:

$$Os = M \times [1 + (p - 1) \times \alpha]$$

Os : Osmolarité (mOsmol/g)

M : Molarité de la solution (mol/l)

P : Le nombre d'ions formés par la molécule dissociée (2 pour NaCl)

α : Coefficient de dissociation α_{NaCl} = 1

L'osmolarité du muscle a été calculée à partir de l'équation:

$$Os = (0.002 \pm 0.0000075) \times \chi$$

l'osmolarité (Os) et la conductivité (χ) sont exprimées respectivement en mOsmol/g et µS/cm

Estimation de la tendreté de la viande

La tendreté de la viande a été estimée par pénétrométrie d'une part, méthode objective permettant de suivre en cinétique l'évolution de cette qualité organoleptique. Elle a par ailleurs été estimée par un jury de dégustation (jury de 10 membres entraînés après cuisson, au bain marie à 80°C, dans des sacs sous vide) en fin de maturation soit 72h postmortem.

Analyse statistique :

Les variables suivies en cinétique (pH, osmolarité, rétention d'eau des protéines myofibrillaires) ont une courbe d'évolution en fonction du temps post mortem caractérisée par une équation de la forme $Y = A - B e^{-C \times X}$. Dans cette équation Y représente le paramètre étudié, A représente la valeur de la variable mesurée à 72 h post mortem, B l'amplitude entre la valeur initiale à 1h post mortem et la valeur ultime à 72 h post mortem, C la vitesse d'évolution et X représente le temps post mortem. Les valeurs des paramètres de ce modèle sont présentées dans le tableau 01.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

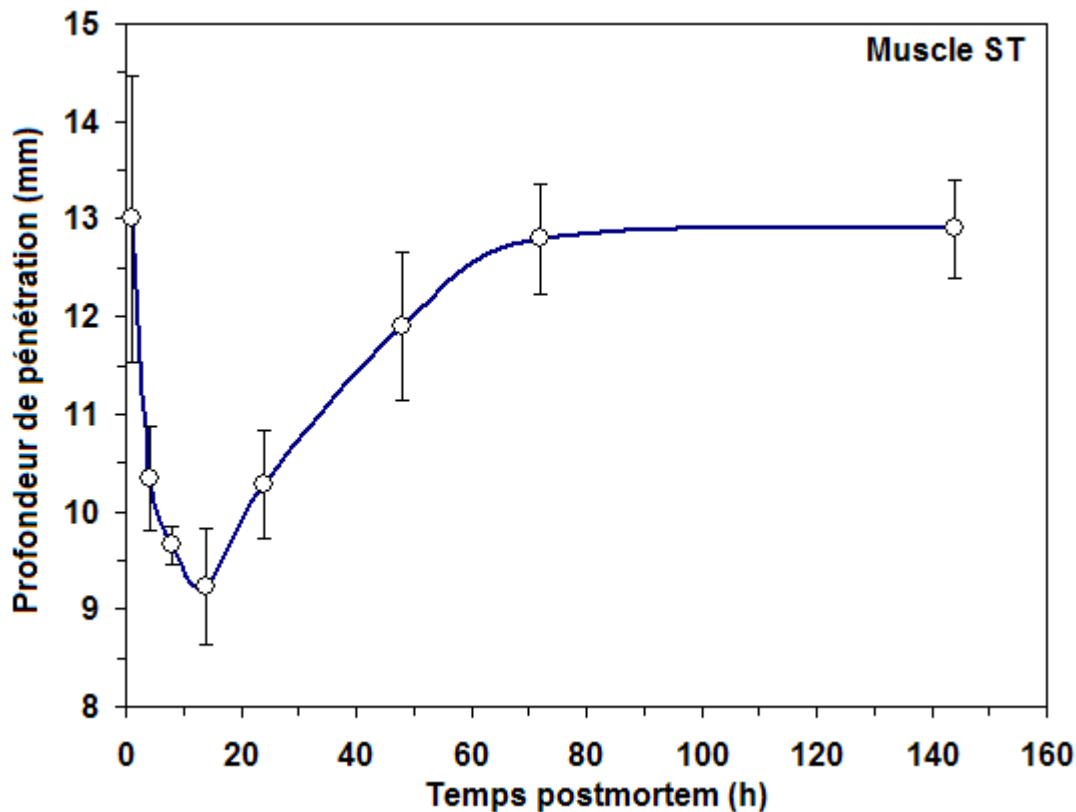
EVOLUTION GENERALE DES PARAMETRES EN FONCTION DU TEMPS POST MORTEM

Profil d'attendrissage des muscles d'agneau estimée par pénétrométrie

Une méthode pénétrométrique a été utilisée pour suivre la dureté de la viande ovine au cours de la maturation. Comme le montre la figures ci-dessous, l'optimum de tendreté est atteint au bout de 3

jours confirmant la vitesse élevée de maturation de l'agneau comparé au bovin et au porc. En effet le temps nécessaire à un bon attendrissage de la viande est de l'ordre de 14 jours pour le bovin et environ 5 jours pour le porc. Le durété estimée par cette méthode physique objective après 3 jours de conservation servira de référence pour l'ensemble du travail qui va être présenté dans cet article. L'utilisation de la pénétrométrie pour l'estimation de la tendreté de la viande ovine est rendue possible grâce au taux limité de collagène dans les muscles de ces jeunes animaux. Ce constituant est beaucoup plus abondant dans les muscle de bovin rendant ainsi inutilisable cette technique.

Figure 1: Attendrissage du muscle *Semitendinosus* d'agneau estimé par pénétrométrie.



Evolution de la température

La température de stockage des muscles est un facteur important dans l'évolution des paramètres mesurés. Elle intervient sur les modifications physico-chimiques et enzymatiques [11]. La température a une très forte influence sur le pH. Elle agit, en particulier, au niveau de la pompe à calcium du réticulum sarcoplasmique, mais également sur l'activité des enzymes musculaires endogènes [12]. Par conséquent, les quatre muscles utilisés dans notre étude sont soumis à un régime thermique identique. Le contrôle de ce facteur, température, n'intervient pas dans l'attendrissage et ne constitue pas un biais dans notre observation.

Les quatre muscles ont été placés immédiatement après l'abattage à 12°C, puis à 4°C à partir de 24 h *post mortem*. La température de 12°C a été choisie afin d'éviter le phénomène de contracture au froid des muscles [13].

La température de la viande est un paramètre que l'on contrôle dès lors que la température interne de la viande s'équilibre avec celle de l'environnement. Son évolution est illustrée par la Fig.1. On observe une variabilité entre la température des quatre muscles à 1 h *post mortem*. La température moyenne des quatre muscles suivie de son erreur-types à 1 h *post mortem* est de 29.04°C ± 1.20. Cette variabilité est due, d'une part à la position des muscles dans la cuisse ainsi qu'à l'importance du gras qui joue un rôle d'isolant et, d'autre part, aux difficultés de respecter le temps de prélèvement des quatre muscles à 1 h *post mortem*.

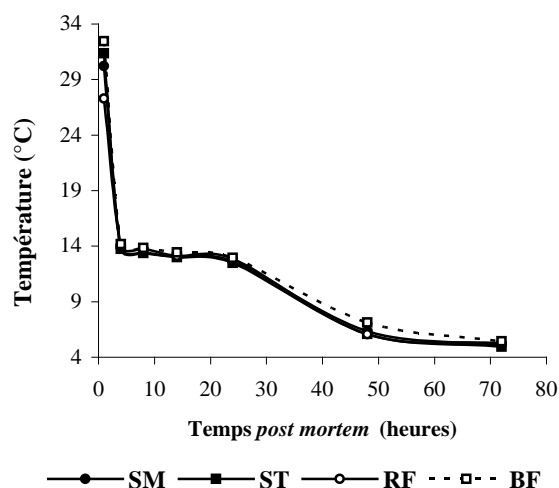


Figure 1

Profil d'évolution de la température (°C) en fonction du temps post mortem (heures)

Chaque point de la courbe correspond à la moyenne ($n = 04$) des moyennes ($n_i = 30$) des quatre muscles *Semi Membranosus* (SM), *Semi Tendinosus* (ST), *Bicipitis Femoris* (BF) et le *Rectus Femoris* (RF)

On remarque également que la variabilité de la température à 1 h post mortem pour tous les muscles est élevée comparativement aux autres intervalles de temps (tableau 11). Cette variabilité pourrait être la combinaison de trois facteurs : la température de l'animal au moment de l'abattage, qui ne peut expliquer qu'une partie de cette dispersion, la température de l'environnement et la résistance du muscle à la chute de température par effet de masse. A 8 heures *post mortem*, pour tous les muscles, la température de 13°C est atteinte. A 24 heures *post mortem* la température est de 12°C. Les morceaux sont par la suite conservés à 4°C, la température chute progressivement pour atteindre des valeurs moyennes de 4 à 5°C.

Evolution du pH et de l'osmolarité *post mortem*

Les quatre muscles étudiés (SM, ST, BF et RF) ont le même profil d'évolution. Ce profil se caractérise par une chute exponentielle rapide jusqu'à une valeur dite *ultime* (pH_u). Le pH_u moyen, pour les quatre muscles 5.44 ± 0.05 , est atteint à 24 h *post mortem* Figure 2.

Au delà de 24 heures le coefficient de variation se stabilise à environ 3 p. cent. Pour tous les muscles. Le muscle ST a le pH_u le plus élevé (5.50 ± 0.13) tandis que le muscle SM a le plus bas pH_u (5.29 ± 0.15). Au vu de ces coefficients de variations, il semble que l'échantillon étudié soit assez homogène du point de vue de l'évolution du pH et qu'aucune évolution anormale de type viande à pH_u élevé (> 6) dite viande à coupe sombre n'est à craindre.

Ce facteur est connu pour être corrélé de façon négative avec le pH [14]. Pour tous les muscles, on observe le même profil d'évolution de la pression osmotique. A 1 heure *post mortem* la valeur moyenne des quatre muscles est de 0.09 ± 0.01 mOsmol/g de muscle. Cette valeur augmente de façon exponentielle entre 14 et 24 heures *post mortem* jusqu'à une valeur maximale de l'ordre de 0.66 ± 0.05 mOsmol/g de muscle Fig.2.

La dispersion des mesures de l'osmolarité comme en témoignent les coefficients de variations 11 p. cent est la plus élevée à 1 heure *post mortem*, puis elle diminue pour atteindre des niveaux très faible au bout de 48 h. Cependant, à 72 heures *post mortem* les fluctuations redeviennent encore plus importantes. Cette variation peut s'expliquer par le fait, qu'à 1 heure *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 72 heures de conservation à 4°C, la viande exsude et il y a perte d'eau de la masse. L'osmolarité en diminuant montre la plus grande variabilité

ceci est à rapporter probablement à des différences de perte d'eau de la viande au cours de la conservation.

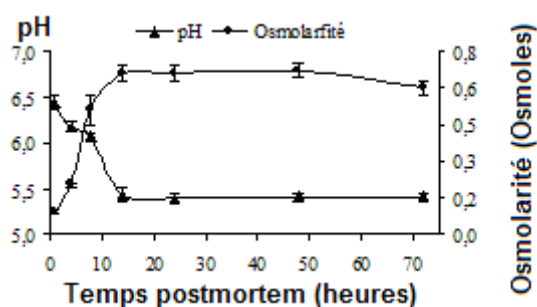


Figure 2: Evolution du pH et de l'osmolarité (mOsmol/g) en fonction du temps post mortem (heures)
Chaque point de la courbe correspond à la moyenne ($n = 04$) des moyennes ($n_i = 30$) des quatre muscles *Semi Membranosus* (SM), *Semi Tendinosus* (ST), *Bicipitis Femoris* (BF) et le *Rectus Femoris* (RF)

Evolution de la capacité de rétention d'eau

Outre son rôle essentiel dans la définition du caractère plus ou moins juteux des viandes, la capacité de rétention d'eau du muscle contribue aussi à la définition de la texture de celle-ci. Pour cette raison, nous avons évalué cette capacité de rétention d'eau selon une technique de centrifugation permettant d'estimer la résistance du muscle à exsuder son eau lorsqu'il est soumis à une force centrifuge constante.

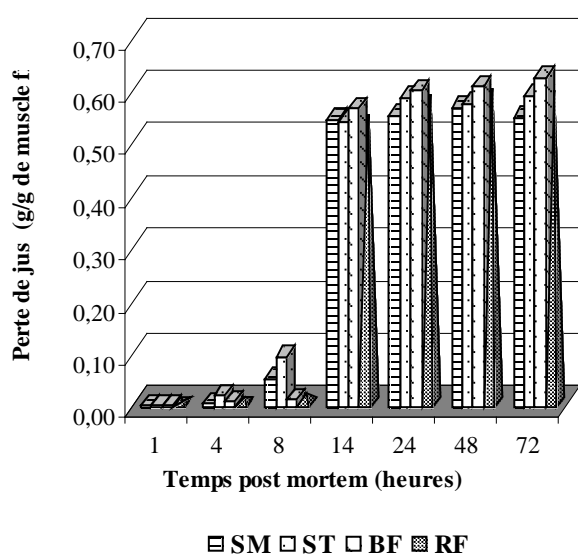


Figure 3: Evolution au cours du temps *post-mortem* de la quantité d'exsudat obtenu par centrifugation à partir des muscles *Semi Membranosus* (SM), *Semi Tendinosus* (ST), *Bicipitis Femoris* (BF) et le *Rectus Femoris* (RF)

L'évolution post mortem de la capacité de rétention d'eau des quatre muscles en gramme de jus perdu par gramme de muscle frais est présentée sur la fig. 2. Etant son inverse, la quantité d'eau exsudée évolue de façon tout à fait parallèle au pH et atteint son maximum à 24 heures *post mortem*. En effet, l'évolution du pouvoir de rétention d'eau résulte principalement de l'acidification du muscle au cours de la phase d'installation de la rigidité cadavérique.

A 1 heure *post mortem*, la valeur moyenne pour les 4 muscles est égale à 0.0035 ± 0.0005 g d'eau/g de muscle. A 8 heures post mortem, il y a une augmentation importante de la quantité d'eau relarguée par les muscles SM et ST (0.0959 et 0.969 g d'eau/g de muscle respectivement). Or pour les muscles BF et RF le relargage n'est que de l'ordre de 0.0145 et 0.0143 g d'eau/g de muscle respectivement.

Ainsi la rétention d'eau des protéines myofibrillaires, déduite par la quantité d'eau relarguée, diminue rapidement jusqu'à 24 h post mortem pour se stabiliser au delà de cette durée de conservation. Cette évolution est néanmoins assez fluctuante à 8 heures *post mortem*.

CARACTERISATION DES COURBES DES CINETIQUES DES PARAMETRES ETUDIES

Les valeurs initiales du pH (1 heure *post mortem*) sont relativement proches dans les deux muscles SM et BF, mais elles sont plus élevées que celles des muscles ST et RF (tableau 01). La vitesse et l'amplitude de chute varient en fonction du type de muscle. L'amplitude de chute du pH est plus élevée pour le muscle BF que les trois autres muscles. Cette même vitesse est plus grande dans le SM mais elle est la plus faible dans le muscle RF.

A 1 h *post mortem*, les muscles RF et ST ont les valeurs d'osmolarité les plus élevées que les muscles SM et BF (tableau 01). L'osmolarité dans le muscle RF a une vitesse d'évolution et une amplitude plus élevées, suivie de l'évolution des muscle SM, ST et BF. A 72 heures *post mortem* dans le muscle RF. L'osmolarité ultime est la plus élevée alors que dans le muscle BF elle est la plus faible.

Comparée aux autres muscles, la quantité de jus relarguée après centrifugation par le muscle SM est la plus faible à 1 heure et à 72 heures *post mortem* (tableau 01), Par contre, l'amplitude et la vitesse d'augmentation de la quantité d'eau relarguée par les protéines myofibrillaires, sont les plus élevées dans les muscles ST et RF.

Tableau 01. Paramètres des équations de l'évolution des variables mesurées des différents muscles

Paramètres		SM	ST	BF	RF		
pH	Initial	MOY	6.43	6.32	6.40	6.26	
		E.T	0.21	0.18	0.22	0.18	
	Amplitude (B)	MOY	-1.02	-0.81	-1.20	-0.81	
		E.T	0.29	0.24	0.25	0.20	
	Vitesse (C)	MOY	-0.0009	-0.0008	-0.0008	-0.0006	
		E.T	0.1263	0.1284	0.2283	0.1497	
	Ultime (A)	MOY	5.20	5.50	5.40	5.46	
		E.T	0.15	0.23	0.22	0.16	
	Osmolarité (mOsmol/g de muscle)	Initial	MOY	0.08	0.09	0.08	0.12
			E.T	0.03	0.01	0.01	0.01
Amplitude (B)		MOY	0.50	0.51	0.46	0.57	
		E.T	0.04	0.04	0.02	0.14	
Vitesse (C)		MOY	0.1321	0.1379	0.1283	0.1529	
		E.T	0.1131	0.1006	0.1178	0.1807	
Ultime (A)		MOY	0.58	0.60	0.54	0.67	
		E.T	0.22	0.21	0.24	0.23	
Jus extractible (g de jus/g de muscle)		Initial	MOY	0.0028	0.0040	0.0030	0.0036
			E.T	0.0008	0.0010	0.0009	0.0007
	Amplitude (B)	MOY	0.57	0.65	0.57	0.60	
		E.T	0.13	0.14	0.15	0.09	
	Vitesse (C)	MOY	0.0010	0.0012	0.0009	0.0011	
		E.T	0.0193	0.0171	0.0155	0.0132	
	Ultime (A)	MOY	0.5927	0.6546	0.5944	0.6036	
		E.T	0.0851	0.0930	0.0647	0.0559	

Comme rapporté par [15], nous observons que l'osmolarité augmente exponentiellement avec le temps *post mortem* de façon inverse à la chute du pH. A 1 heure *post mortem*, les muscles RF et ST ont l'osmolarité la plus élevée (0.12 et 0.09 mosmol/g respectivement) et le pH le plus bas (6.26 et 6.32 respectivement). Les muscles SM et BF ont l'osmolarité la plus faible et le pH le plus élevé à 1 h *post mortem* (tableau 01). Cela est confirmé par l'existence de corrélation entre ces deux paramètres.

La valeur maximale de l'osmolarité *post mortem* est très dépendante de la température et de la vitesse de chute du pH. Elle augmente avec la température et avec la rapidité de chute du pH [16]. Or pour le muscle SM la relation vitesse de chute du pH et augmentation de l'osmolarité n'est pas observée.

L'augmentation de la pression osmotique au cours du stockage a plusieurs conséquences au niveau de la structure musculaire : elle endommage sérieusement la structure en dissociant les protéines contractiles [17], et en facilitant l'action des protéases endogènes [18]. Le muscle RF a la valeur ultime de l'osmolarité la plus élevée (0.67 mOsmol / g de muscle) et le degré de protéolyse le plus important.

La capacité de rétention d'eau des protéines myofibrillaires est influencée par l'augmentation de la pression osmotique [19]. Les muscles ST et RF ont les valeurs ultimes de pression osmotique les plus grandes (0.65 et 0.67 mOsmol / g de muscle respectivement) et les quantités de jus extractible à 72 heures *post mortem* les plus élevées (0.65 et 0.60 g d'eau / g de muscle respectivement).

RELATIONS ENTRE LES DIFFERENTS PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES AU COURS DE LA MATURATION

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 utilisé la régression linéaire multiple. (Tableau 02) matrice de corrélation des variables étudiés au cours de l'attendrissage des muscles SM, ST, BF et RF.

Tableau 02. Matrice de corrélation des variables étudiés au cours de l'attendrissage des muscles SM, ST, BF et RF

SM	Temp_s	pH	Osmol	Q.E.R
Temp _s	1.000			
pH	-0.711*	1.000		
Osmol.	0.632	-0.980*	1.000	
Q.E.R.	0.718*	-0.972*	0.931*	1.000
ST	Temp_s	pH	Osmol.	Q.E.R.
Temp _s	1.000			
pH	-0.814*	1.000		
Osmol.	0.596	-0.899*	1.000	
C.R.E.	0.743	-0.952*	0.8843*	1.000
BF	Temp_s	pH	Osmol.	Q.E.R.
Temp _s	1.000			
pH	-0.774*	1.000		
Osmol.	0.642*	-0.951*	1.000	
Q.E.R.	0.751*	-0.985*	0.923*	1.000
RF	Temp_s	pH	Osmol.	Q.E.R.
Temp _s	1.000			
pH	-0.660	1.000		
Osmol.	0.603	-0.940*	1.000	
Q.E.R.	0.755*	-0.855*	0.876*	1.000

Osmol : Osmolarité ; Q.E.R. : Quantité d'Eau Relarguée ; * seuil de signification p<0.05.

La température n'est pas intégrée dans le modèle car les quatre muscles ont subi un même régime thermique. Cela évite que ce facteur ne soit à l'origine de différence d'attendrissage entre les muscles.

L'observation des coefficients de corrélation (**tableau 02**) montre, pour tous les muscles, que le pH est significativement ($P < 0.05$) corrélé au temps *post mortem*. Cependant, la pression osmotique n'est pas corrélée au temps.

Dans tous les muscles l'osmolarité et le pH sont fortement corrélés, mais de façon négative pour les quatre muscles ($r = 0.98$; $p < 0.05$), confirmant les observations d'autres auteurs [21-22-23-9].

L'augmentation de l'osmolarité dans la cellule musculaire a une influence sur la capacité de rétention d'eau. Le coefficient de corrélation est positif et hautement significatif ($r = 0.93$; $p < 0.05$) les résultats de ces deux paramètres ceux de [21] (1991) qui ont noté la même corrélation significative.

Nous observons également une forte corrélation négative entre le pH et la capacité de rétention d'eau (tableau 02). Le pH de la viande a une grande importance sur la capacité des protéines à retenir l'eau du muscle [25-26]. De même [27] ont observé chez le veau, une corrélation négative ($r = -0.87$) entre le pH ultime de la viande et la perte de jus à la cuisson.

Le degré de protéolyse est positivement corrélé aux différentes variables mesurées, à savoir pH, rétention d'eau des protéines myofibrillaires et osmolarité (tableau 03). L'action de ces derniers sur le phénomène d'attendrissage de la viande est connue. Le coefficient de corrélation est très significatif entre le degré de protéolyse et l'osmolarité. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'au cours du stockage l'augmentation de la pression osmotique a plusieurs conséquences au niveau de la structure contractile en dissociant les protéines contractiles [17], et en facilitant l'action des protéases endogènes [18].

Aucune relation claire n'est mise en évidence entre les paramètres mesurés et la tendreté ultime de la viande et cela indépendamment du muscle considéré. Pour finir, nous avons réalisée une analyse de variance pour identifier les meilleurs marqueurs de tendreté.

Effet animal sur la mesure sensorielle					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
ANIMAL	5	26,913	5,383	5,745	0,002

Effet amplitude de chute du pH sur la mesure sensorielle					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
amplitude pH	21	43,633	2,078	28,659	0,034

Les résultats rapportés dans le tableau ci-dessus montrent un effet très significatif du facteur animal sur la tendreté ultime estimée par le jury de dégustation mais pas sur la dureté estimée par pénétrométrie. Ceci confirme la meilleure sensibilité bien connue du jury par rapport aux méthodes mécaniques. On note également un effet très significatif de l'amplitude de chute du pH sur la tendreté ultime. Par contre aucun effet n'est observé pour le type de muscle et ce fait s'explique en grande partie par les capacités de maturation très similaires des différents muscles choisis pour cette étude.

CONCLUSION

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

Les résultats obtenus indiquent clairement que même dans les présentes conditions de réfrigération, très favorables au processus de maturation, les valeurs ultimes signe d'une bonne tendreté ne sont atteints qu'au bout de 24 à 48 heures de conservation et ce pour l'ensemble des animaux et muscles étudiés

En terme de tendreté, mettre sur le marché de la viande d'agneau quelques heures après abattage est donc néfaste pour la qualité organoleptique. Un temps de conservation de 24 h *post mortem* avant la mise sur le marché paraît donc être un minimum indispensable à l'amélioration des qualités organoleptiques de la viande. Ce délai de commercialisation devra cependant, être adapté aux conditions de réfrigération utilisée à l'échelle industrielle.

Nous avons également remarqué que les paramètres mesurés avant 24 heures *post mortem* sont les plus importants pour la définition de la dureté de la viande d'agneau. Il n'est, par conséquent, pas avantageux d'effectuer les mesures après 24 h *post mortem*.

Ces résultats ne seront certainement pas suffisants pour élaborer un modèle de maturation mais devraient permettre un choix plus circonscrit des variables à prendre en compte. Il est nécessaire de déterminer quelles variables biologiques sont susceptibles d'expliquer et de prédire la dureté de la viande.

REFERENCES

- ABBAS K., 2000. Viande rouge au Maghreb. *AgroLigne*, N°9, 7-12.
- BENDALL J. R., 1978. Variability in rates of pH fall and of lactate production in the muscles on cooling beef carcasses. *Meat Sci.*, 2, 91-104.
- BENDALL J. R., & SWATLAND H., 1988. A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Sci.*, 24, 85-126.
- SAUNDERS A. B., 1994. The effect of acidification on myofibrillar proteins. *Meat Sci.* 37, 271-280
- BIGNON J. L. & OUALI A., 1995. Animal and muscle variability in tenderness. In : Expression of tissue protéinases and regulation of protéine degradation as related to meat quality. Ouali A, Deneyer D. I. & Smulders F. J. M. (eds), ECCEAMST, Utrecht, Pays-Bas, 433-442.
- BONNET M., OUALI A. & KOPP J., 1992. Beef muscle osmotic pressure as assessed by differential scanning calorimetry (DSC). *Int. J. Food Sci.*, 27, 399-408.
- DEBITON E., 1994. Variation de la tendreté de la viande facteurs biologiques impliqués. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme d'étude approfondies. Option : Sciences des Aliments. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand II. France. 34p.
- DRANSFIELD E., ETHERINGTON D. J. & TAYLOR M. A. J., 1992. Modelling *post mortem* tenderization-II : enzyme changes during storage of electrically stimulated and non stimulated beef. *Meat Sci.*, 31, 75-84
- GEESINK G. H., OUALI A. & SMULDERS F. J. M., 1992. tenderisation, calpain/calpastatin activities and osmolality of 6 different beef muscle. Proc. 38th ICoMST. Clermont-Ferrand. France. 363-366.
- GUIGNOT F., TOURAILLE C., RENERRE M. & MONIN G., 1994. Relationship between ultimate pH and meat quality in veal. Proc. 38 th ICoMST. Clermont-Ferrand. France. 367-370.
- HONIKEL K. O., FISHER C., HAMID A. et HAMM R., 1981. Influence of *post mortem* changes in bovine muscle on the water-holding capacity of beef. *Post mortem storage at 20°C. J. Food Sci.*, 46, 1-6.
- MONIN G. & OUALI A., 1991. Muscle differentiation and meat quality. *Dev. Meat Sci.* 5, 89-157.
- OUALI A. & VALIN C., 1980-81. Effect of lysosomal enzymes and Ca-ANP (Calcium Activated Neutral Protéinase) on the myofibrillar ATPase activities. Relationship with the ageing changes. *Meat Sci.*, 5, 233-245.
- OUALI A., 1990a. La maturation des viandes : facteurs biologiques et technologiques de variation. *Viande prod. Carnés*, 11, 281-290.
- OUALI A., 1990b. Meat tenderness : possible causes and mechanisms. A review. *J. Muscle Foods*, 1, 129-165
- OUALI A., VIGNON X. & BONNET M., 1991. Osmotic pressure in *post mortem* bovine muscle : factors of variation and possible causative agents. Proc. 37 th ICoMST. KUMBACH. Allemagne, 1, 452-456.
- OUALI A., 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251-265.
- OUALI A., LEPETIT J., TOURAILLE C. & KOPP J., 1994. Cinétique d'attendrissage de la viande de veau. *Viandes Prod. Carnés*, 15 (3), 83-86.
- PENNY L. F., 1985. The enzymology of conditioning. In : *Developments in Meat Science*, Lawrie R., (ed), Elsevier, Applied science, Londres, Angleterre, 1, 115-143.
- 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.
- WU F. W. & SMITH S. B., 1987. Ionic strength and myofibrillar protein solubilisation. *J. Anim. Sci.*, 65, 597-608.
- ZAMORA F., DEBITON E., LEPETIT J., LEBERT A., DRANSFIELD E. & OUALI A., 1996. Predicting variability of ageing and longness in beef M. *Longissimus Lumborum* and *Thoracis*. *Meat Sci.* 43 (3-4), 321-333

Le travail présenté dans cette publication correspond à la première étude totalement réalisée à l'INATAA. Il est donc possible de réaliser un certain nombre d'études sur les qualités de la viande à l'INATAA et nous pourrons, donc, apporter notre contribution à l'amélioration des pratiques de la filière et son optimisation. Nous serons également en mesure de valoriser, en collaboration avec les producteurs et les services sanitaires, les richesses du pays en termes d'élevage et de sauvegarde des races, souvent rustiques et spécifiques de certaines régions du pays.

CHAPITRE IV

Maturation des viandes: Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes

La réflexion sur ce sujet a fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Viandes et Produits Carnés* en 2005.

OUALI A. (1) (2), HERRERA-MENDEZ C-H.(1), BECILA S.(2),BOUDJELLAL A.(2)
(1) QuaPA, BPM, INRA de Clermont Ferrand Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France
(2) INATAA, Université de Constantine, Route de Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie

Ref: Ouali A. , Herrera-Mendez C-H., Becila S.,Boudjellal A. (2005) : Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes *Viandes Prod. Carnés Vol 24 (6), 205-213*

Publication N° 3

Maturation des viandes: Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes

OUALI A. (1) (2), HERRERA-MENDEZ C-H.(1), BECILA S.(2),BOUDJELLAL A.(2)
(1) QuaPA, BPM, INRA de Clermont Ferrand Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France
(2) INATAA, Université de Constantine, Route de Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie

Viandes Prod. Carnés Vol 24 (6), 205-213

La Maturation des viandes : Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes

Ahmed OUALI^{*‡}, Carlos Hernan HERRERA-MENDEZ^{*}, Samira BECILA[§] & Abdelghani BOUDJELLAL[§]

(^{*}) QuaPA, BPM, INRA de Clermont Ferrand –Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

([§]) INATAA, Université de Constantine, Route de Aïn El Bey, 25000, Constantine, Algérie

‡Address correspondence to :
Ahmed Ouali,
QuaPA, BPM, INRA de Clermont Ferrand –Theix,
63122 Saint Genès Champanelle, France,
Tel : (33) 4 73 62 41 63,
Fax : (33) 4 73 62 42 68,
E-Mail : ouali@clermont.inra.fr

Résumé

L'attendrissage des viandes est un processus enzymatique impliquant les systèmes protéolytiques endogènes. Dans ce contexte, l'attention des chercheurs a été principalement focalisée sur deux systèmes enzymatiques connus depuis plusieurs décennies qui sont les cathepsines et les calpains. Une grande majorité des gens considèrent aujourd'hui que les calpains constituent le principal groupe de peptidases à être mis en cause dans ce processus et que ce système explique toute la variabilité de ce dernier. Malgré tout, aucune preuve formelle n'a été apportée à ce jour en ce sens. Partant du principe que l'attendrissage des viandes ne se résume pas à cela et pour essayer de redynamiser un peu la science de la viande, nous avons recherché d'autres hypothèses possibles. L'une d'entre elle qui aurait due nous sauter aux yeux depuis une dizaine d'année, est celle qui repose sur le fait que, une fois l'animal abattu et saigné, les cellules musculaires n'ont d'autre alternative que de s'engager sur la voie de la mort cellulaire ou apoptose. Si nous intégrons, dans la transformation du muscle en viande, une phase précoce correspondant à l'apoptose, nous nous apercevons que les conséquences attendues de ce processus apportent des réponses pour bon nombre d'observations jusque là encore expliquées. Cette revue entend, dans un premier temps, présenter la mort cellulaire et ses mécanismes de mises en place. Nos aborderons ensuite les analogies entre les conséquences de l'apoptose et l'évolution postmortem de certaines caractéristiques musculaires.

Mots clés : maturation des viandes, tendreté, muscle, pH, calcium, caspases, apoptose

Summary

Meat tenderisation is majoritarily enzymatic in nature and involves endogenous proteolytic systems. Up to date , scientists have focused their attention on two systems, i.e. the cathepsins and the calpains. Most of them actually considered that calpain system and especially calpain 1 are the most important and can explain a large part, if nor all, of the variability in meat tenderness. However this assumption has never been definitely proven. We therefore look at different new hypothesis susceptible to open a new door for a more dynamic research in meat science. One of them which would have appeared evident for our purpose since ten year deals with the fact that, after animal bleeding, muscle cells have no other alternative to only enter the programme cell death procedure or apoptosis. If we introduce a precoce phase corresponding to apoptosis, we will see that the known consequences of that process bring forward answers to numerous still unexplained observations. This revue intended to present in a first part what is the programmed cell death and its underlying mechanisms. We then described the strong analaogies between the known conséquence of apoptosis and the post mortem changes affecting a set of different muscle characteristics.

Key words : meat ageing, tenderness, muscle, pH, calcium, caspases, apoptosis

1. Introduction

La maturation des viandes, période pendant laquelle s'élaborent les qualités organoleptiques du produit final, prend en compte l'évolution positive et négative de ces caractéristiques et les mécanismes qui y contribuent. Parmi ces qualités, la tendreté et, de façon plus général la texture de la viande, restent, encore aujourd'hui, la qualité la plus recherchée par les consommateurs. En effet, si la tendreté est souvent considérée comme trop ferme pour la viande bovine et porcine, elle est parfois jugée comme n'étant pas assez ferme pour d'autres espèces (poissons, poulet, etc.).

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 systèmes enzymatiques connus depuis plusieurs décennies qui sont les cathepsines et les calpaïnes. Ceci a conduit à l'apparition de trois courants de pensées :

- ceux qui sont persuadés que les calpaïnes sont seules responsables du processus d'attendrissage des viandes
- ceux qui suggèrent que les deux systèmes cités participent à ce processus,
- et, enfin, un troisième groupe, dont je fais parti, qui proposent un processus multienzymatique impliquant ces systèmes et probablement d'autres dont la fonction, dans le muscle postmortem, est moins bien connue (proteasomes, caspases, ...).

Dans cette revue, nous nous proposons de reconsidérer les connaissances accumulées sur la maturation des viandes en intégrant une nouvelle donnée qui est la mort cellulaire ou apoptose dont les effets connus pourraient expliquer une bonne partie des observations et constats faits jusque là.

2. Apoptose ou mort cellulaire programmée

Dans les organismes vivants, les cellules ont une durée de vie limitée et toutes vont, à un moment donné, s'engager vers une mort inéluctable mais régulée de façon très précise. Ceci s'applique d'autant mieux aux cellules musculaires que l'activité métabolique intense de ce tissu persiste en raison de la nécessité de s'adapter en permanence au travail qu'il doit accomplir. La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale du vivant. Contrairement à la mort par nécrose, elle correspond à un "suicide" cellulaire génétiquement très contrôlé. Ainsi au cours des nombreuses mitoses et différenciations cellulaires qui permettront de créer un organisme à partir d'un oeuf, il est en permanence nécessaire d'éliminer les cellules superflues ou potentiellement dangereuses. Ce phénomène d'élimination sélective des cellules est assuré par un processus appelé **APOPTOSE**. Le mot apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne : *apo* pour éloignement et *ptose* pour chute.

La régulation très stricte de ce programme est essentielle pour s'assurer qu'il est activé uniquement dans la cellule concernée et au bon moment. A l'inverse, la dérégulation du processus apoptotique conduit, chez l'homme, à diverses pathologies comme, par exemple, le(s) cancer(s), les maladies auto-immunes et les maladies neurodégénératives.

L'apoptose fait appel à une machinerie très complexe qui commence à être bien connue dans le monde animal. Par contre, si tous les chercheurs sont d'accord pour dire que ce processus de mort cellulaire programmée existe aussi chez les végétaux, les différents intervenants sont, dans ce cas, encore relativement mal connus. Pourtant, son rôle dans le développement et la morphogénèse des plantes est considéré comme essentiel. En effet, il est bien admis que, dans le règne végétal, une dérégulation de l'apoptose est très souvent associée non seulement à des perturbations nombreuses et très diverses du développement mais aussi, à une forte létalité (Sanmartin et al., 2005).

Pour se convaincre du caractère ubiquitaire de ce processus, notons que les premières découvertes sur le rôle biologique des caspases, enzymes principalement responsables de la mort programmée des cellules, ont été réalisées sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (Yan et al., 1993). C'est chez ce nématode que le premier gène responsable de la mort cellulaire a été identifié, gène codant pour CED3, une cystéine protéase très homologue à ICE (Interleukin-1 Converting Enzyme), enzyme découverte chez l'homme peu auparavant (Thomberry et al., 1992 ; Cerretti et al., 1992). Ces découvertes constituent le point de départ des nombreux travaux développés par la suite sur ces peptidases et leurs régulateurs, travaux qui ont conduit très rapidement à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'apoptose.

2.1. Nécrose et apoptose

La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr et coll. pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique.

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire "désordonnée". En effet au cours de la nécrose, les cellules se gorgent d'eau au point que cela entraîne la lyse de leur membrane plasmique. C'est une véritable explosion cellulaire qui conduit à la libération, dans le milieu environnant, du contenu cytoplasmique. Les organites cellulaires eux aussi gonflent et se vident de leur contenu. L'ADN nucléaire est dégradé, de manière "aléatoire", par des endonucléases activées notamment par des sérine peptidases. La taille des fragments d'ADN ainsi générés est très hétérogène. La nécrose d'une cellule affecte les autres cellules par l'action des enzymes intracellulaires libérées et des macrophages qui viennent en renfort pour nettoyer le site (inflammation locale). Le résultat est que toute une région de l'organe devra être régénérée après destruction totale des cellules endommagées.

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire "ordonnée", procédant en différentes étapes.

- Tout d'abord, les cellules en apoptose s'isolent des autres par perte des contacts entre les cellules.
- On assiste ensuite à une importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire.
- Les mitochondries de la cellule apoptotique subissent plusieurs modifications majeures : libération du cytochrome c dans le cytoplasme, diminution du potentiel membranaire et altération de la perméabilité membranaire avec ouverture de pores spécialisés.
- Après condensation du noyau, la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases.
- Parfois, la membrane plasmique bourgeonne et forme des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule.
- Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule signale son état apoptotique à son environnement grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire.

La mort cellulaire programmée est un processus rapide (quelques minutes à quelques heures). Par rapport à la nécrose, l'un des points majeurs de l'apoptose est que la membrane plasmique n'est jamais totalement altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter le déversement du contenu cellulaire et ainsi de prévenir tout dommage infligé aux cellules voisines.

2.2. Les caspases

Pour plus d'information sur les caspases et leur régulation, les lecteurs pourront se reporter à la synthèse publiée récemment par Fuentes-Prior et Salvesen (2004).

- **Les caspases, une nouvelle famille de peptidases**

Rappelons que, pour une très grande majorité, les peptidases sont classées selon la nature de l'acide aminé qui participe à la réaction d'hydrolyse. Celui-ci peut être une sérine (peptidases à sérine ou serine peptidases), une cystéine (cystéine peptidases) ou un acide aspartique (aspartyl peptidases). Dans le cas des cystéine peptidases, le résidu cystéine est l'acide aminé qui catalyse la réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique avec l'aide d'autres acides aminés qui favorisent la liaison du groupement thiol (SH) de la cystéine avec la liaison peptidique. Il s'agit le plus souvent de résidus histidine (His ou H) et aspartyl (Asp ou D).

Les peptidases apoptogènes sont des peptidases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique (Asp ou D). Cette spécificité de clivage

n'est partagée qu'avec une seule autre peptidase, le granzyme B (une sérine peptidase présente dans les lymphocytes T cytotoxiques).

Une nouvelle nomenclature proposée par Alnemri et coll. en 1996, regroupe désormais les peptidases apoptogènes sous le nom de CASPASE. Le **C** du mot caspase représente la cystéine du centre actif ; "*asp*" définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de peptidases après un acide aspartique, l'ensemble étant suivi du suffixe "*ase*" qui est le suffixe commun à toutes les enzymes. L'ICE, (interleukin-1 β -converting enzyme) qui fut, chronologiquement la première caspase caractérisée, a donc été tout naturellement rebaptisée caspase 1. À ce jour 14 caspases ont été identifiées mais il ne fait aucun doute que cette liste n'est pas exhaustive. 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. La connaissance de la structure de ces dernières (Caspases 11, 12 et 13) est moins avancée que pour les autres (Caspases 1 à 10) hormis, peut-être, la caspase 13.

- **Structure schématique des caspases**

Dans le monde vivant, toutes les caspases ont une structure très conservée (Figure 1) 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. Puis, deux molécules d'enzyme s'associent pour former un dimère, possédant deux sites actifs en position tête-bêche (Figure 2). L'activation des sites actifs ne peut se faire qu'au niveau du dimère après association à des complexes activateurs par l'intermédiaire d'interaction DED-DED ou CARD-CARD.

- **Trois classes de caspases**

On distingue :

- les caspases impliquées dans les **processus inflammatoires** (caspases 1, 4, 5). La fonction précise de ces caspases est moins bien connue que celles des deux autres classes.

- les caspases impliquées dans la phase **d'initiation de l'apoptose** (caspases 8, 9, 10). 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 régulatrices (activateurs ou inhibiteurs) par le biais d'interactions CARD-CARD.
- les **caspases effectrices** qui déstructurent la cellule lors de la phase d'exécution (caspases 3, 6 et 7). Par rapport aux caspases initiatrices, celles-ci ont généralement des prodomaines de petite taille.

2.3. Schéma général de l'apoptose

Le processus apoptotique se déroule, en général, selon un programme relativement précis, caractérisé successivement par une phase d'initiation, dépendante de la nature du stimulus et du type de cellule, suivie d'une phase d'exécution *via* les caspases effectrices (Figure 3).

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. Dès lors, les caspases initiatrices vont être activées au niveau de complexes oligomériques et celles-ci vont à leur tour activer les caspases exécutrices qui vont prendre en charge la déstructuration des cellules.

2.4. 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 mort cellulaire (Figure 4).

- **La voie 1** 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 Apoptose Protein), sa fixation au récepteur va activer un complexe intracellulaire qui va

pouvoir 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 va détourner les caspases de leur complexe activateur cible.

La caspase 8 active, prise en exemple ici, ainsi que la caspase 10 peuvent, à ce stade, être rendues inactives par fixation, au voisinage de leur site actif, de protéines inhibitrices d'apoptose ou IAP (**I**nhibitors of **A**Poptose). 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 déstructuration de la cellule.

- **La voie 2** correspond à des situations particulières où la cellule n'a pas d'autres solutions que le suicide. C'est donc elle-même qui va déclencher l'apoptose. Ce processus implique une détérioration des mitochondries par des protéines proapoptotiques de type **Bax**. 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. Cette altération est liée à la fixation d'un complexe protéique incluant **Bax** au niveau de la membrane mitochondriale. A noter que **Bcl2**, une protéine de la même famille que **Bax** a, quant à elle, une activité antiapoptotique et tendra à préserver la membrane mitochondriale. Le rapport de concentration de ces deux protéines antagonistes définira la vitesse avec laquelle le cytochrome c sera libéré dans le cytosol.

Le cytochrome c libre va alors former un complexe appelé apoptosome, impliquant, entre autre, une protéine désignée sous le nom de **Apaf-1** (apoptotic protease activating factor-1) et la caspase 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 (caspases 3 et 7). Cette action peut être bloquée par des inhibiteurs de la famille des IAP (**I**nhibitors of **A**poptosis).

- **Cas particulier du stress qui constitue la voie 3** : quelle que 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 tous risques 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 vont contribuer 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.

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 subies 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 anti-apoptotique. Il pourra en outre, dans les cas de stress intense, induire une mort cellulaire par la voie impliquant les mitochondries (voie 2) et décrite précédemment.

3. La mort cellulaire et les qualités de la viande

Quelle que 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 et l'anoxie en particulier, 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 que nous avons vues. La question est de savoir s'il s'agit d'une nécrose ou d'une mort cellulaire programmée. En fait, la réponse est donnée par le comportement des cellules postmortem qui ont tendance à voir leur volume diminuer (augmentation de l'espace extracellulaire dès les premiers instants qui suivent l'abattage) alors que dans le cas d'une nécrose c'est l'inverse qui se produit. Cet argument plaide donc fortement en faveur d'un phénomène de mort cellulaire programmée de nature apoptotique.

Toutes les considérations qui vont suivre concernent la viande bovine même si les observations réalisées sur cette espèce peuvent s'étendre à toutes les espèces bouchères. L'objectif va être de prendre, un à un, les principaux changements cellulaires associés à l'apoptose et de faire le lien avec les modifications observées dans le muscle en cours de maturation en relation avec les qualités organoleptiques et plus particulièrement la tendreté, qualité majeure pour le

consommateur.

3.1. Inversion de la polarité des membranes

In vivo, les membranes cellulaires ont une polarité bien définie liée à la répartition des phospholipides. Les groupements phosphatidylserine, plutôt électronegatifs, sont sur la face intracellulaire de la membrane alors que les groupements phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine, électropositifs, sont extracellulaires. Lors de l'entrée en apoptose, on assiste à une inversion de cette distribution des phospholipides, les groupements phosphatidylserine passant sur la face externe de la membrane par un processus bien connu de flip-flop et inversement pour les autres phospholipides. Cette opération permet à la cellule de s'isoler des autres cellules et de signaler son engagement sur la voie de l'apoptose. Cela présuppose que la membrane reste imperméable, au moins pendant un certain temps, pour éviter la diffusion des constituants intracellulaires vers l'extérieur. Le transfert des groupements phosphatidylserine sur la face externe de la membrane constitue aussi un signe de reconnaissance par les macrophages qui vont participer à la dégradation de ces cellules. Mais, dans le muscle postmortem, l'intervention des macrophages n'est plus possible.

Ce processus n'est absolument pas coordonné de sorte que chaque cellule décidera du moment où elle va entrer en apoptose. Cela est d'autant plus vrai que, au sein d'un muscle, les fibres sont très hétérogènes et chacune réagira à sa propre vitesse.

Quelles conséquences cette inversion de polarité 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 une étude récente portant sur près de 180 animaux bovins d'âge, de sexe et de race différents, pour lesquels le pH a été mesuré toutes les heures jusqu'à 8h postmortem. Les mesures suivantes ont été réalisées à 24h, 48h et 72h postmortem. La très grande majorité de ces animaux présente un ou deux paliers dans la chute du pH, paliers qui apparaissent rapidement après l'abattage et persiste pendant une durée variable allant de 2 à 6h selon les cas. La figure 5 illustre, pour quelques animaux, ce phénomène.

Les animaux sélectionnés [(2 taurillons charolais de 19 mois (M-Ch-19M-1 et 2) et une vache de réforme charolaise de 5 ans environ (F-Ch-54M)] reflètent les différents cas de figure rencontrés pour une très grande majorité des animaux. Seuls quelques rares animaux ne présentent aucun palier dans le profil d'évolution postmortem du pH. Pour les trois profils présentés dans la figure 5, la vitesse globale de chute du pH varie entre 0,065 Unité pH /heure ($UpH\ h^{-1}$) à 0,21 $UpH\ h^{-1}$,

l'animal femelle ayant la chute de pH la plus rapide. L'analyse plus fine de l'évolution du pH pendant les 8 premières heures qui suivent l'abattage (insert Figure 5) montre une discontinuité de la chute de pH conduisant à la présence de un (F-Ch-54M, M-Ch-19M-2) ou deux paliers (M-Ch-19M-1) correspondant à une relative stabilité du pH pendant une durée variable allant de 2 à 5h. Pour le premier animal (M-Ch-19M-1), un premier palier est observé entre 1h et 3h puis un second entre 4 et 8h. Les vitesses de chute de pH estimées dans les plages 0-3h, 3-8h et 8-24h sont de 1,91, 0,65 et 0,99 UpH h⁻¹, respectivement. Pour le second taurillon (M-Ch-19M-2), un seul palier apparaît entre 4h et 6h. Les vitesses de chute de pH estimées dans les plages 0-6h et 6-24h sont de 0,36 et 0,16 UpH h⁻¹, respectivement. Pour le dernier animal, un seul palier est également observé entre 1h et 3h avec une vitesse de chute de pH de 4,18 UpH h⁻¹, donc très rapide dans cette première phase (0-3h), et de 0,23 UpH h⁻¹ dans la seconde phase (3-24h).

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 et 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 constituant à caractère acide (phosphatidylserine) par des constituants à caractère basique (phosphatidyl-choline et phosphatidyléthanolamine) dans le compartiment intracellulaire accompagné d'une redistribution des ions pourrait expliquer ces paliers transitoires de la courbe de chute du pH. La présence de ces paliers dans une plage comprise entre 1h et 8h postmortem laisse penser que l'inversion de polarité de la membrane plasmique se produit durant les 8 premières heures postmortem alors que le pH est compris entre 6,4 et 6,8 environ. Cette constatation est confortée par les modifications de la conductivité du tissu musculaire, estimée par impédancemétrie, observées entre pH 6,4 et 6,8. (REF jean louis)

3.2. Calcium et maturation de la viande

Depuis pratiquement les années 1960-70, nous savons que l'injection de calcium à la viande accélère le processus d'attendrissage (Khan and Kim, 1975). Tout le monde attribuait et attribue encore cette action du calcium à une activation des calpaïnes, peptidases calcium dépendantes. Aujourd'hui, il existe probablement une autre explication si nous considérons

qu'après l'abattage, les cellules n'ont d'autre alternative que de s'engager dans la voie du suicide ou apoptose. Ce cation est en effet un effecteur indispensable au déclenchement de l'apoptose et à son bon déroulement (Orrenius et al., 2003; Szabadkai et Rizzuto, 2004). Dans le muscle postmortem, le taux de calcium augmente progressivement dans le cytoplasme au cours de l'installation de la rigidité cadavérique et, cela, au dépend du réticulum sarcoplasmique qui se vide de son contenu (Vignon et al 1989). Nous savons aujourd'hui que ce cation est un élément central du processus apoptotique. Il va s'accumuler dans les mitochondries au dépend du réticulum sarcoplasmique et participer à la perte des fonctions de cet organite ainsi qu'à la libération du cytochrome c. Le cytochrome c, élément morteur de la mort cellulaire, présente une activité proapoptotique et constitue un élément central de l'activation des caspases initiatrices. Ce processus se termine par l'activation de la caspase 9 qui, à son tour, activera les caspases effectrices. Sachant que le processus d'apoptose est irréversible, il va, une fois enclenché, se poursuivre pendant toute la durée de conservation de la viande à l'état réfrigéré.

3.3. Variation des espaces intra- et extracellulaires dans le muscle post mortem

Au cours de ces dernières décennies, de nombreux travaux ont été consacrés à cette évolution postmortem des espaces intra- et extracellulaires en relation avec les mouvements de l'eau dans le muscle et la rétention d'eau (voir les synthèses de Offer et Knight, 1988a, b). Toutes les études menées admettaient que la principale cause de ces changements était la répartition de l'eau entre ces deux compartiments, eau qui est présente dans ce tissu à hauteur de 75% de son poids environ. L'acidification du muscle fait que la charge des protéines diminue et que celles-ci devenant progressivement plus hydrophobes vont fixer de moins en moins d'eau. Ceci est conforté par la corrélation très élevée observée entre l'augmentation de l'espace extracellulaire et le pH du muscle (Guignot et al., 1993). Le seul point qui demeurait inexplicé était le fait que l'augmentation de l'espace extracellulaire débutait dès la mort de l'animal alors que le pH était encore très proche de la neutralité. Les évènements associés à la mort cellulaire fournissent aujourd'hui une explication puisque une cellule entrant en apoptose se dissocie des autres et se rétracte. La conséquence va être une diminution de l'espace intracellulaire et une augmentation parallèle de l'espace extracellulaire.

Nous avons vu que l'évolution postmortem du pH était polyphasique et présentait un ou deux paliers dans les 8 premières heures qui suivent l'abattage. Par analogie, Guignot et al., (1993) montrent que l'espace extracellulaire atteint sa valeur maximale environ 10 heures postmortem. Cette observation indique que la rétraction des cellules liée au phénomène de

mort cellulaire coïncide avec la période où les paliers de pH sont présents et avec la phase d'augmentation progressive de l'espace extracellulaire. Tous ces résultats suggéreraient que la rétraction cellulaire et vraisemblablement aussi l'inversion de la polarité des membranes, deux conséquences majeures de la mort cellulaire, ont atteint leur point ultime environ 8-10h post-abattage.

3.4. Altération des mitochondries et oxydation cellulaire

Les mitochondries sont au cœur du processus de mort cellulaire et constituent un élément moteur majeur dans le bon déroulement de l'apoptose (Bras et al., 2005). Ceci est d'autant plus vrai que, postmortem, le stimulus déclencheur est la cellule elle-même et non un activateur agissant via les récepteurs de mort cellulaire. Outre la chaîne respiratoire qui perd sa capacité à oxyder l'oxygène moléculaire, la mitochondrie voit sa membrane externe devenir perméable à tous les constituants protéiques localisés dans l'espace intermembranaire dont le cytochrome c, un élément indispensable à l'activation de la caspase 9. D'autres protéines à activité proapoptotique sont également libérées dans le compartiment cytosolique. Parallèlement, le calcium contenu dans le reticulum endoplasmique va, via des chemins pas toujours clairement définis, être transféré vers les mitochondries. Celles-ci deviennent surchargées en calcium et vont voir leur membrane interne se détériorer. L'oxygène moléculaire, n'étant plus totalement oxydé par la chaîne respiratoire, va former des radicaux oxygène libres capables d'oxyder tous les constituants cellulaires (lipides, protéines,...).

3.5. Stress et apoptose

Il est bien admis que le stress conduit à une détérioration du processus de maturation de la viande conduisant généralement à une viande plus dure. L'exemple qui illustre le mieux ce phénomène est probablement le cas des porcs exsudatifs.

Face à n'importe quel type de stress, les organismes vivants réagissent par l'émission de signaux d'alerte vers les cellules en commençant par diverses hormones. Si le stress est particulièrement intense, les cellules recevront des messages déclencheurs d'apoptose via les récepteurs de mort cellulaire (ex : stress oxydatif). Dans le cas contraire, ces indications permettront aux cellules de préparer leur défense aussi rapidement que possible. Parmi les moyens dont disposent ces dernières, le plus connu est la synthèse de diverses protéines protectrices que sont les HSP (Heat Shock Proteins), protéines chargées de préserver les constituants et les structures intracellulaires contre tous risques de perte de leurs fonctions biologiques.

Par rapport au problème qui nous concerne ici, nous avons vu que les HSP ont une activité

anti-apoptotique. Cette fonction va donc ralentir le processus de mort cellulaire et constituer un obstacle au bon déroulement de la maturation. Encore une fois, le concept d'apoptose comme première étape du processus de maturation, fournit une réponse au moins partielle à la question relative au mode d'action du stress sur le processus d'attendrissage.

3.6. Peptidases et Protéolyse

L'attendrissage des viandes résulte de l'altération de la structure contractile par les enzymes protéolytiques endogènes. Les mécanismes sont donc en majorité de nature enzymatique et impliquent les peptidases endogènes (voir revue de Sentandreu et al., 2002). Parmi les systèmes les plus étudiés, notons :

- les cathepsines, système découvert vers les années 1950 par De Duve et col. (1955)
- les calpaïnes, peptidases calcium dépendantes mises en évidence pour la première fois dans le cerveau de rat par Guroff en 1964.
- le protéasome découvert vers les années 1980 par Wilk et Orłowski (1980).

Les cathepsines furent le premier système enzymatique considérée dans le cadre des études menées sur les mécanismes d'attendrissage des viandes. Vinrent ensuite les calpaïnes qui ont retenu beaucoup plus d'attention que les cathepsines en raison principalement de leurs capacités à altérer la densité de la strie Z, modification souvent observée postmortem mais néanmoins pas corrélée à la tendreté. Plus récemment, quelques travaux ont été consacrés au rôle potentiel du protéasome 20S dans ce processus. Certains résultats démontrent clairement que ce dernier système pourrait contribuer à l'attendrissage des viandes en cours de conservation (Dutaud 1998 ; Ouali, 1999 ; Sentandreu et al., 2002). L'analyse de l'ensemble de la littérature publiée à ce jour dans ce domaine indique que le processus d'attendrissage des viandes résulte très vraisemblablement de l'action synergique de plusieurs systèmes enzymatiques endogènes même si les principales peptidases au cœur du processus ne sont pas identifiées.

Si nous reconsidérons maintenant ce point essentiel qu'est l'attendrissage des viandes à la lueur des modifications associées aux conséquences de l'entrée des cellules musculaires en apoptose dès que l'animal a été abattu, on réalise que les premières peptidases à entrer en action seront, très certainement, les caspases. Ces peptidases sont beaucoup mieux placées que les autres pour déstructurer les structures cellulaires puisqu'il s'agit de leur fonction première. Enfin, une intervention immédiate de ces peptidases apporterait la réponse aux affirmations souvent entendues et attestant que les premières heures qui suivent l'abattage sont essentielles pour le bon déroulement de la maturation des viandes sans pour cela apporter des réponses

claires à cette interrogation encore d'actualité.

4. Conclusion

La mort cellulaire programmée, processus mis en évidence dans les années 1995, 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 d'attendrissage 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*, apportent 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 essentielle facilitant l'action des autres systèmes protéolytiques dont nous avons parlé auparavant.

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.

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.

Bibliographie

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell* 87, 171.

- Cerretti, 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., et al. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1~ converting enzyme. *Science* **256**, 97-100.
- Damez, J. L., J. Lepetit, L. Desneux, S. Clerjon, and R. Favier. (2002) ," Non destructive assessment of meat ageing using electrical impedance anisotropy." *48th ICOMST. Rome. Italie.*: pp. 802-803.
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1955 Aug;60(4):604-17.
- Dutaud D. (1998). Quantification et caractérisation du proteasome 20S de muscle de bovin en relation avec l'attendrissage de la viande bovine. Thèse d'Université, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
- Fuentes-Prior P. & Salvesen G.S. (2004). The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem. J.* **384**, 201–232;
- Guignot F.; Vignon X.; Monin G. (1993). Post mortem evolution of myofilament spacing and extracellular space in veal muscle. *Meat Sci.* 33, 333-347.
- Guroff G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem.* 1964 Jan;239:149-55.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- Khan,-A-W; Kim,-Y-K Effect of calcium on isometric tension, glycolysis and tenderness of poultry breast meat. *Journal-of-Food-Science.* 1975; 40(6): 1119-1121
- Offer, G. and Knight, P. (1988a). The structural basis of water-holding in meat. I. General principles and water uptake in meat processing, *Dev. Meat Sci.* 4, 63-171
- Offer, G. and Knight, P. (1988b). The structural basis of water-holding in meat. II. Drip losses *Dev. Meat Sci.* 4, 173-243
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552-65.
- 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. XIV European Symposium on the Quality of Poultry Meat (Bologna, Italy).* Vol. 1, 91-121.
- Sanmartin M., Jaroszewski L., Raikhel N.V., Rojo E. 2005. Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiology.* **137**, 841–847.

- Sentandreu M.A., Coulis, G. & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Fd. Sci. Technol.* 13(12), 400-21.
- Szabadkai G, Rizzuto R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett.* 2004 Jun 1;567(1):111-5.
- Thomberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R. and Aunins, J. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1~ processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774
- Vignon X, Beaulaton J, Ouali A. Ultrastructural localization of calcium in post-mortem bovine muscle: a cytochemical and X-ray microanalytical study. *Histochem J.* 1989 Jul;21(7):403-11.
- Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc).* 2005 Feb;70(2):231-9.
- Wilk S. et Orłowski M., 1980. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J. Neurochem.*, 35(5), 1172-1182.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. M. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin1~-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652

Figures et légendes

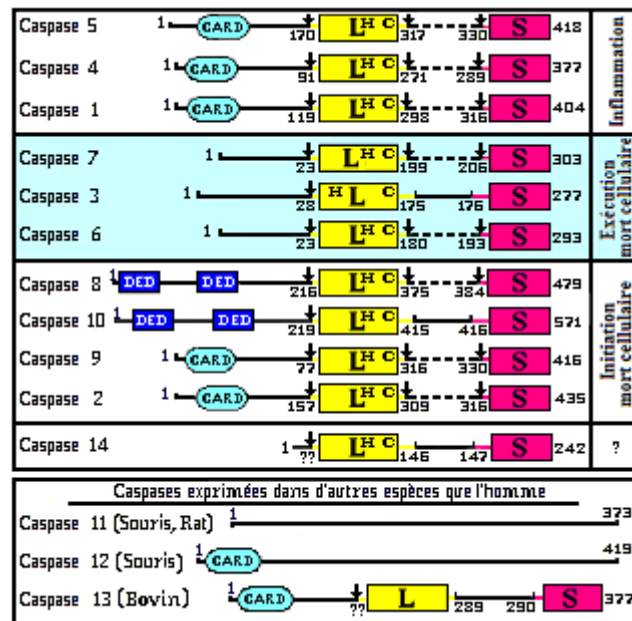


Figure 1 : Structure schématique des précurseurs des caspases identifiées chez l'homme et de quelques caspases exprimées uniquement dans quelques espèces animales mais pas chez l'homme. Les caspases humaines ont été groupées sur la base de leur similarité de séquence. Les homologies de séquence divisent 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.

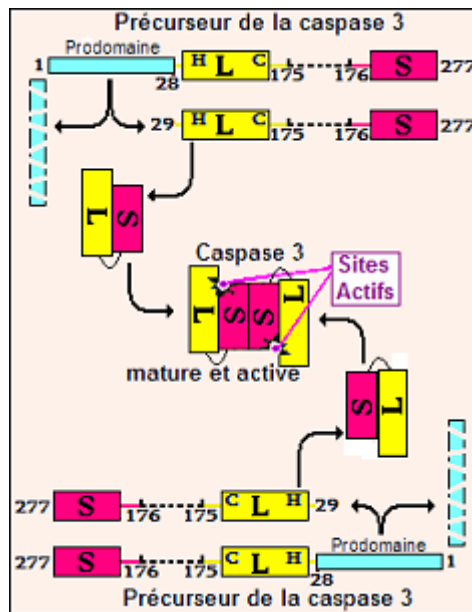


Figure 2 : Schéma de maturation du précurseur de la caspase 3 en caspase 3 active, enzyme qui est un dimère avec deux sites actifs diamétralement opposés.

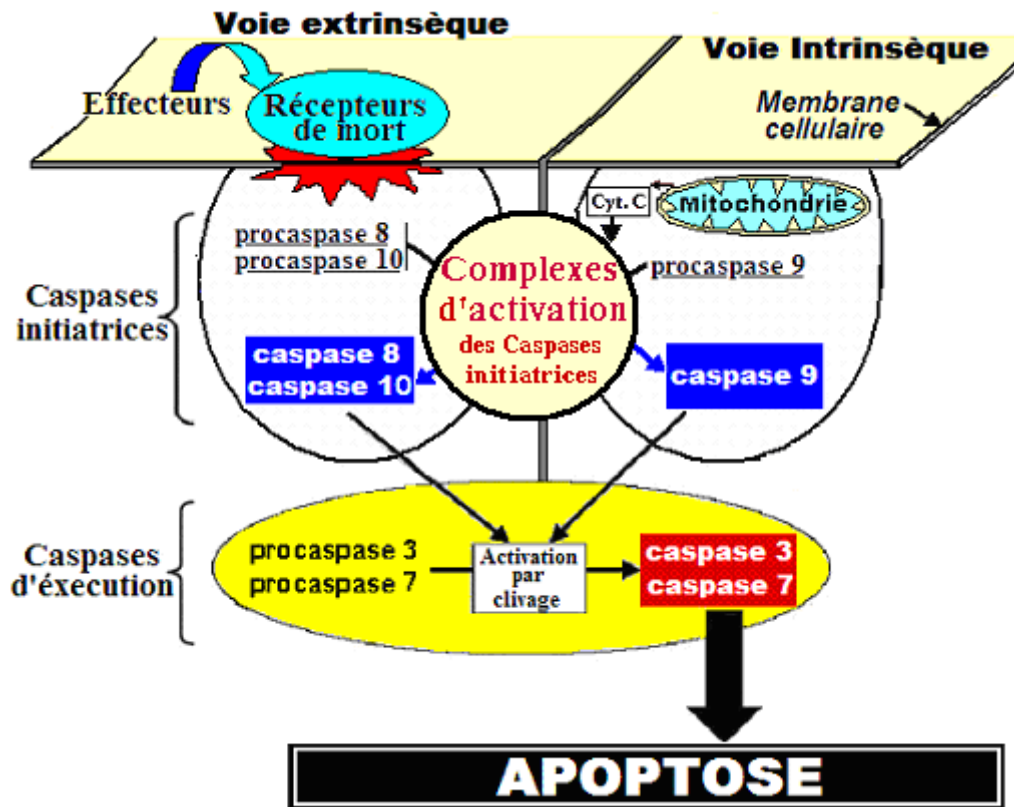


Figure 3 : Schéma général du processus apoptotique. Selon l'effecteur déclenchant de l'apoptose, on distingue deux voies d'initiation du processus qui sont la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La **voie extrinsèque** implique les récepteurs de mort présents sur la face externe de la membrane cellulaire 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 cytoplasme. 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 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.

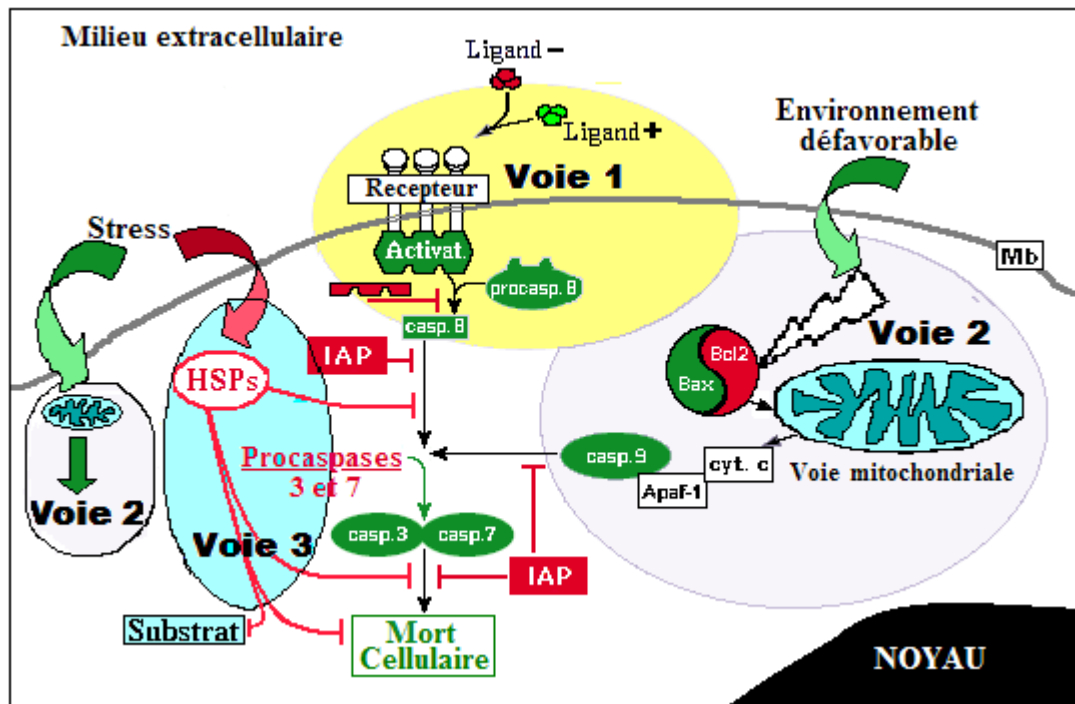


Figure 4 : Régulation du processus apoptotique. **Voie extrinsèque** : après activation du récepteur de mort par son effecteur proapoptotique, il y a activation du complexe membranaire intracellulaire associé au récepteur qui va fixer diverses protéines pour former un complexe capable d'activer la procaspase 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 initiatrices 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, 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 initiatrices ; Cyt c : cytochrome c ; HSP : heat shock proteins ou protéines du stress.

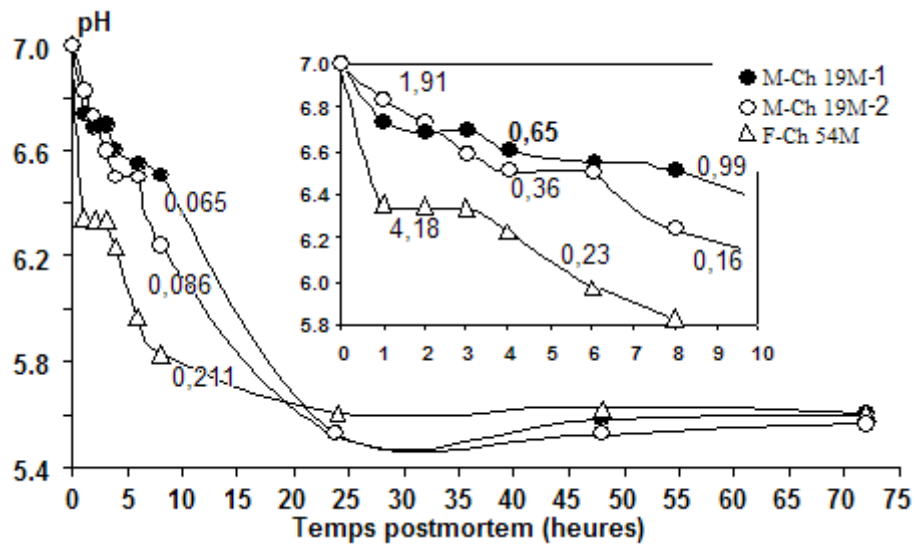


Figure 5 : Profil d'évolution du pH dans le muscle *Longissimus* d'un échantillon de 3 animaux charolais d'âge et de sexe différents. Les trois animaux sont 2 taurillons de 19 mois (M-Ch-19M-1 et -2) et une vache de réforme (F-Ch-54M) de 54 mois. Le pH est mesuré toutes les heures pendant les 8 premières heures qui suivent l'abattage puis à 24h, 48h et 72h. Le profil global est présenté pour chacun des animaux avec la vitesse moyenne de chute du pH indiquée sur chacune des courbes et exprimée en Unité pH par heure (UpH h⁻¹). Dans l'insert sont présentées les courbes d'évolution de ce paramètre au cours des 8 premières heures post-abattage. Comme pour les courbes globales, la vitesse de chute du pH est indiquée pour chacun des paliers observés.

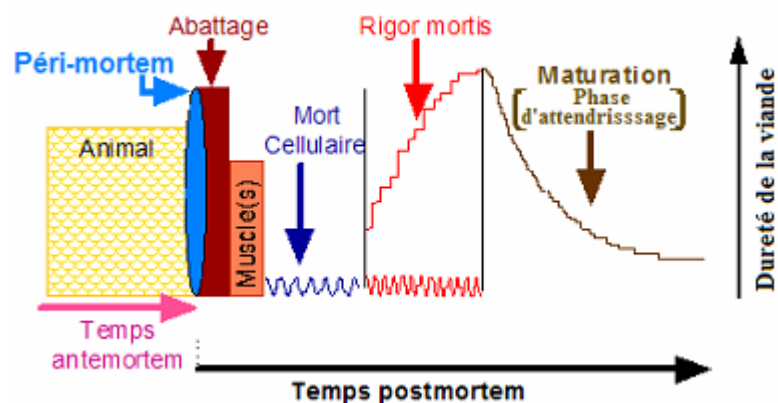


Figure 6 : Les différentes phases de transformation du muscle en viande à prendre en considération. En plus des phases connues de rigor et de maturation, il faudrait ajouter une phase précoce antérieure à la rigor qui correspondrait à la phase d'initiation du processus de mort cellulaire et ses conséquences biochimiques et structurales sur la cellule.

CHAPITRE V

**FORCES ET FAIBLESSES DE LA FILIERE VIANDE EN ALGERIE.
RESULTATS PRELIMINAIRES D'UNE ENQUETE QUI A PORTE SUR
PLUS DE 500 PROFESSIONNELS.**

1. FILIERE VIANDE

Parmi les facteurs déterminants de la filière nous tenons à souligner l'importance de deux d'entre eux :

- le facteur hygiénique tout au long de la filière
- le facteur satisfaction du consommateur à savoir la couleur.

1.1. Facteur hygiénique

La filière viande est la succession d'étapes au cours desquelles s'effectue le passage progressif des animaux de boucherie en viandes et produits carnés (Girard et Valin, 1988). La qualité de la viande dépend de la conduite de ces étapes.

1.1.1. Etapes nécessitant une surveillance

1.1.1.1. Transport et stabulation

Le transport et la stabulation sont des facteurs de stress et de fatigue pour les animaux. Les changements et les séparations agissent sur la physiologie de l'animal. Ces facteurs sont aggravés par le fait que, le plus souvent les animaux de boucherie transitent par des marchés à bestiaux (Lemaire, 1982). Lors de ces étapes, les animaux sont exposés à des risques de blessures (Rosset, 1982). Le stress et la fatigue sont extrêmement préjudiciables à la qualité du produit final, c'est-à-dire la viande.

La stabulation permet aux animaux de se reposer et de diminuer de leur stress. Pendant cette étape, les animaux sont maintenus en diète pour éviter qu'ils ne soient abattus au cours de la digestion et pour que les viscères soient les plus vides possible.

1.1.1.2. Abattage

Les animaux doivent être soumis à l'inspection ante mortem le jour de leur arrivée à l'abattoir. Cet examen doit être renouvelé immédiatement avant l'abattage si l'animal est resté plus de vingt quatre heures en stabulation. L'inspection doit permettre la détection d'une part des animaux atteints de maladies transmissibles à l'homme et aux animaux et d'autre part des animaux présentant des symptômes d'une maladie ou des signes de perturbations susceptibles de rendre la viande impropre à la consommation humaine.

L'abattage a pour but d'obtenir à partir d'animaux sains des carcasses dans des conditions techniques, sanitaires et économiques les meilleures possibles (Frayssé et Darre, 1990). La saignée de l'animal met fin à la respiration et provoque une série de modifications biochimiques et physico-chimiques complexes qui sont le début de la transformation des muscles en viande. La saignée

permet, aussi, l'élimination du sang qui peut constituer un milieu de transport et de prolifération des bactéries.

La dépouille qui consiste à séparer la peau de la carcasse est une opération très délicate et nécessite une main d'œuvre qualifiée. En effet, si cette opération est mal conduite, on obtient des carcasses souillées et donc contaminées par les microorganismes se trouvant sur la peau (Froin et Joneau, 1982).

Lors de l'éviscération les précautions à prendre sont celles qui consistent à éviter que les abats ne soient endommagés et que leur contenu ne souille la carcasse. Tous les viscères doivent être clairement identifiés avec les carcasses correspondantes pour permettre une inspection post mortem correcte et vigilante.

L'inspection post mortem est systématique et doit garantir l'obtention de viandes et d'abats sains et conformes aux règles sanitaires. Les carcasses salubres sont estampillées, celles qui présentent des anomalies sont soit consignées soit saisies. La consigne permet à l'agent du service vétérinaire d'observer ou d'effectuer des analyses avant de prendre la décision d'estampiller ou de saisir la carcasse.

La douche des carcasses a pour but de faire disparaître les souillures et les taches de sang et donc améliorer l'aspect des carcasses. L'eau utilisée pour ce lavage doit être propre.

Le ressuage consiste en l'abaissement partiel de la température des carcasses (12°C). C'est un compromis qui permet à la viande d'entrer en rigidité cadavérique sans provoquer choc thermique et de limiter la prolifération des mésophiles qui sont responsables de l'altération des viandes. Après le ressuage, les carcasses doivent être réfrigérées et maintenues ainsi pendant le transport et le circuit de commercialisation.

1.1.2. Microbiologie de la viande

La plupart des aliments et la viande et les produits carnés en particuliers constituent des substrats propices à l'implantation de nombreuses espèces bactériennes (Hurst, 1973). La grande diversité des microorganismes et leur capacité d'adaptation peuvent altérer et rendre impropres à la consommation les produits qu'ils contaminent. Mais leur présence est facilement décelable par les altérations qu'ils engendrent en attaquant les constituants de leur environnement, surtout dans le cas où ils sont en très grand nombre (Ingram et Dainty, 1971). Ces microorganismes peuvent être

dangereux par le fait que dans certaines conditions, ils déclenchent des toxi-infections graves (Lebert et *al.*, 1984).

1.1.2.1. Origine des contaminations

Dans la filière viande, la contamination du produit a lieu essentiellement lors de l'abattage et des différentes phases qui la suivent (Fournaud, 1982). A la sortie de l'abattage, les carcasses sont contaminées par des bactéries banales, d'altération, des bactéries « test d'hygiène » et très rarement par des bactéries d'intoxications alimentaires (Fournaud et Goussault, 1979). Ces contaminations sont de deux formes :

Les contaminations de surface

Les contaminations de surface interviennent principalement lors de la dépouille et donc par la peau de l'animal qui est la cause de présence de bactéries et notamment les psychrotrophes sur la viande (Gill et Newton, 1979). Comme les contaminations peuvent intervenir accidentellement lors de l'éviscération. Elles ont également, très fréquemment, comme origine le sol, l'air et le contact des mains des manipulateurs avec les carcasses (Raccach et Baker, 1978). Les niveaux de contamination par les psychrotrophes, déjà élevés au moment de l'abattage, augmentent légèrement lors du stockage en chambre froide et dans des proportions considérables lors du transport jusqu'au point de vente (Stringer et *al.*, 1969).

Les contaminations dans la masse ou profonde

Elles peuvent être, soit d'origine endogène (contamination *in vivo*), c'est le cas des animaux en état d'infection souvent cliniquement inapparente, soit consécutives à une infection lors de l'abattage (contamination agonique). Dans ce dernier cas, elle est due à une bactériémie d'origine digestive ou causée par l'introduction de germes dans la circulation sanguine lors de la saignée car le couteau même s'il est stérile, peut entraîner des microorganismes dans les tissus profonds de l'animal et des accidents peuvent, aussi, survenir lors de l'éviscération (Raccach et Baker, 1979).

1.1.2.2. Espèces microbiennes rencontrées dans la viande

Bien que la contamination initiale de la viande soit très variée et que celle-ci constitue un milieu très favorable à la croissance des microorganismes, les germes se développent sélectivement en fonction des caractères physiques (surface d'exposition à l'air, découpe), chimiques (pH, teneur en eau). Comme les viandes sont généralement entreposées à basses températures, les dégradations vont être provoquées par les germes psychrotrophes (Lebert et *al.*, 1984). Les viandes sont en

général contaminées par deux types microbiens : les espèces microbiennes d'altération et les espèces microbiennes pathogènes.

1.1.2.3. Altérations dues aux microorganismes

La viande étant, au moins avant l'achat par le consommateur, conservée à des températures peu supérieures à 0°C, on peut considérer que seules les bactéries psychrotrophes peuvent être néfastes pour la qualité du produit. Ces bactéries, en métabolisant les composés de faibles poids moléculaires de la viande peuvent entraîner des dégradations de la qualité organoleptique.

Chronologiquement, ce sont les glucides qui sont les premiers composés attaqués par le processus de la glycolyse. Normalement l'oxydation aérobie des glucides conduit à la production de CO₂ et H₂O, ce qui ne provoque ni goût ni odeur particuliers. Mais, parfois lors de croissance rapide des germes, on peut voir apparaître un enduit muqueux. De même certaines bactéries lactiques, dites homofermentaires, convertissent en anaérobiose les sucres en acide lactique ; ce qui peut donner par abaissement anormal du pH, une saveur aigre et indirectement agir sur les pigments de la viande et donc sur sa couleur. Mais ce type d'inconvénient n'apparaît que lorsque ces germes sont en grand nombre. D'autres bactéries lactiques, dites hétérofermentaires, produisent l'acide lactique, certains composés gazeux tel que CO₂ qui sont à l'origine de défauts.

Lorsque les glucides sont épuisés, ce qui survient souvent assez rapidement, les bactéries psychrotrophes du type *Pseudomonas* peuvent attaquer les protéines et éventuellement les lipides de la viande. Ce qui au bout de quelques jours provoque l'apparition de goûts et d'odeurs désagréables. D'après Newton et Gill (1979), les *Pseudomonas* sont responsables des odeurs putrides lorsque leur nombre est supérieur à 10⁶ par cm² et ceci résulte de la dégradation des acides aminés. Ces bactéries produisent des protéases extracellulaires qui dégradent les protéines en acides aminés et le plus souvent elles continuent le processus de dégradation et produisent diverses substances à odeur désagréables tel que H₂S. De plus, elles entraînent un verdissement de la viande (Rosset et Roussel-Cicquard, 1978).

Price et Schweigert (1971) rapportent d'autres anomalies rencontrées sur les viandes et produits carnés tels que la rancidité qui apparaît sous l'action des lipases bactériennes, la putréfaction, le dégagement gazeux et les colorations anormales.

1.1.2.4. Contaminations par les germes pathogènes

A différentes températures, on peut rencontrer des bactéries dites pathogènes, c'est-à-dire responsables de toxi-infections alimentaires. Les plus répandues sont *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, les *Salmonella* et *Escherichia coli*. Dans certaines conditions, ces germes

peuvent produire des toxines qu'ils libèrent dans leur environnement. Malheureusement, l'élimination de ces microorganismes ne supprime pas toujours le risque d'intoxication car certains d'entre eux tels que les staphylocoques sécrètent des toxines thermostables, ou d'autre comme les bactéries du genre *Clostridium*, produisent des spores, forme de résistance beaucoup plus difficiles à détruire que les cellules végétatives dont elles proviennent. Des températures inférieures à 10°C permettent de ralentir considérablement le développement des bactéries pathogènes, pour la plupart mésophiles (Ingram, 1962).

La limite du risque dû aux bactéries pathogènes ou toxynogènes est déterminée comme étant à 3,3°C, correspondant au seuil de toxigénèse de *Clostridium botulinum* type E. Elle est de 6,7°C pour les salmonelles et les staphylocoques et de 13°C pour *Clostridium perfringens* (Rosset et Roussel-Ciquard, 1978). Pour les viandes, il est statistiquement établi que le principal danger pour le consommateur résulte dans la présence des salmonelles (Lebert et al., 1984). En conclusion on peut dire que des températures de réfrigération correctes permettent d'éliminer quasi-totalement le danger de multiplication des bactéries responsables de toxi-infections (Dumont, 1982).

1.2. Facteur satisfaction du consommateur : la couleur

La couleur de la viande est, pour le consommateur un des principaux indicateurs de la qualité de la viande. L'industrie de la viande risque donc de subir des pertes économiques si la couleur des produits est différente de celle qui est la plus acceptable et/ou si la viande est décolorée en surface (Quilichini, 1986).

La couleur de la viande dépend de la quantité globale de myoglobine et des pourcentages relatifs en myoglobine réduite, oxygénée et oxydée. Le temps et la température de stockage, comme la qualité de la viande déterminent largement les proportions des trois formes de myoglobine (Renerre, 1982). Chu et al. (1988) estiment que la pression partielle d'oxygène, les ions métalliques et chimiques, la température, la lumière, le pH, l'oxydation du tissu adipeux et la microflore peuvent provoquer une décoloration de la viande. La couleur est aussi influencée par les phénomènes d'auto-oxydation, de réduction et consommation d'oxygène (Renerre et Labas, 1986).

2. ENQUETE

Hormis la viande de volaille qui reste de loin la plus accessible aux consommateurs, les autres viandes d'origine principalement ovine et bovine sont très onéreuses et peu accessibles au consommateur. Elles sont consommées occasionnellement lors des repas de fêtes traditionnelles. Cet état de fait est probablement à l'origine de la faible structuration de la filière qui reste très archaïque et peu organisée.

Pour identifier les points faibles de cette filière, un questionnaire, présenté en annexe, a été élaboré et utilisé pour caractériser la filière de distribution des viandes. Le questionnaire comprenait 26 questions ayant trait aussi bien à l'approvisionnement, aux conditions d'abattage, aux conditions de transport et de stockage et à l'aspect hygiénique et sécuritaire. Les enquêtes menées dans différentes régions du pays par des étudiants de l'INATAA ont été analysées et les premiers résultats rapportés ci-après.

2.1. ANALYSE DES REPONSES

Faute d'avoir pu faire une analyse statistique très détaillée des réponses, nous nous sommes contentés de mettre en évidence pour quelques questions présélectionnées le pourcentage des réponses à chacune des options proposées.

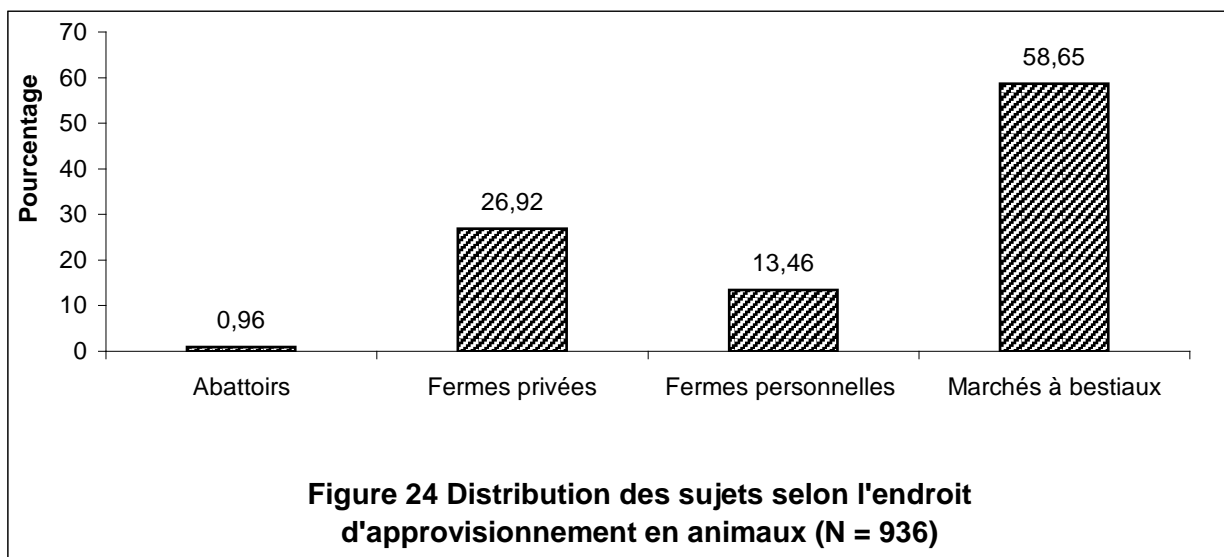
A partir des enquêtes réalisées, auprès des bouchers, par des étudiants en fin de cycle nous avons choisi quelques réponses qui nous semblent donner un aperçu sur le circuit de distribution et sur la qualité des viandes commercialisées en Algérie. Cette enquête concerne les Wilaya de M'Sila, Annaba Tissemsilt, El Bayadh et Batna et a couvert le maximum de communes. Le nombre de boucheries visitées par les enquêteurs est de 816. Les principales questions que nous avons prises en considération renseignent deux aspects, le premier décrivant la chaîne approvisionnement - conduite de l'abattage (items 1 à 12) et le deuxième tend à apprécier les connaissances du boucher en matière de qualité hygiénique et organoleptique de la viande (items 13 à 19).

- 1 Endroit d'approvisionnement
- 2 Critères d'achat des animaux
- 3 Distance entre le lieu d'abattage et le lieu d'approvisionnement
- 4 Transport des animaux
- 5 Stabulation
- 6 Inspection *ante mortem*
- 7 Abattage à l'abattoir ou non

- 8 Inspection post mortem
- 9 Douche des carcasses
- 10 Transport des carcasses
- 11 Estampillage
- 12 Ressuyage
- 13 Qualités organoleptiques de la viande
- 14 Attendrissage de la viande
- 15 Age des bouchers
- 16 Apprentissage du métier
- 17 Etat de propreté de la boucherie
- 18 Etat de propreté du personnel
- 19 Equipement en froid des boucheries

2.1.1. Endroit d’approvisionnement

Globalement, près de 60% des bouchers s’approvisionnent aux marchés à bestiaux. Le regroupement des animaux de plusieurs vendeurs au marché avec le manque de contrôle vétérinaire constitue un risque de transmission de maladies.

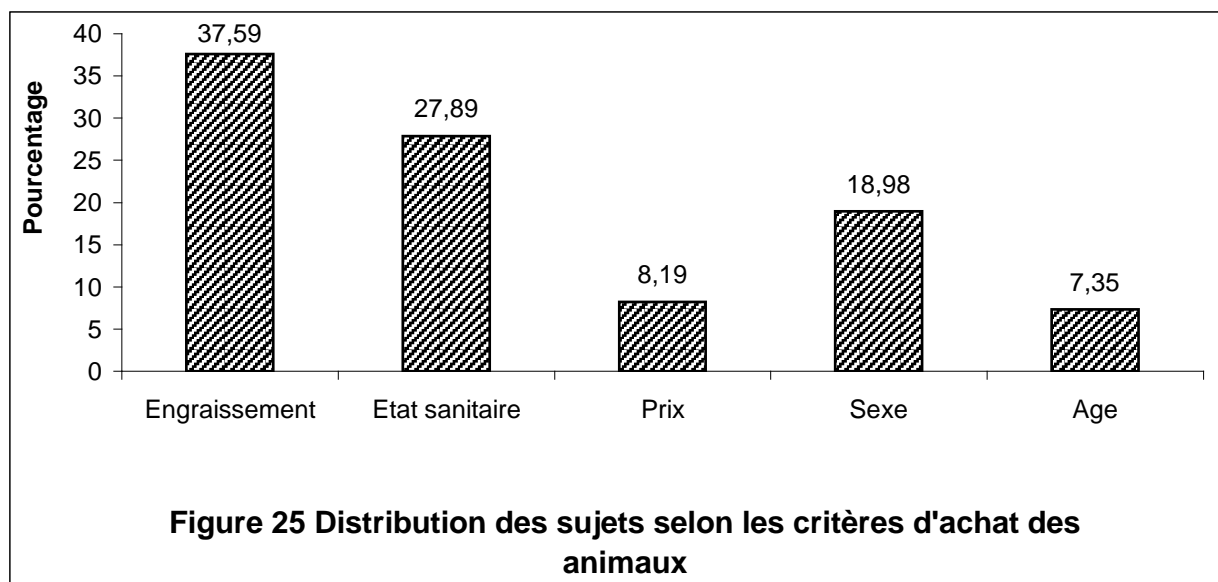


2.1.2. Critères d’achat des animaux

- 2.1. Etat d’engraissement
- 2.2. Etat sanitaire
- 2.3. Prix
- 2.4. Sexe
- 2.5. Autres

Près de 38% des bouchers considèrent l'état d'engraissement comme critères d'achat. Ce critère renseigne en effet sur la qualité de la conduite de l'élevage de la qualité de la viande.

Les autres critères (état sanitaire, prix, sexe, âge) sont peu considérés. En fait le boucher s'intéresse avant tout à la rentabilité financière faisant fi de la qualité hygiénique et organoleptique.



2.1.3. Distance entre le lieu d'abattage et le lieu d'approvisionnement

Les bouchers n'ont pas pu répondre exactement à cette question. En effet, sur les 815 enquêtés seuls 292 ont pu donner une réponse approximative, les autres (498) ont utilisé le terme « distance variable ». Les 25 restants ont déclaré qu'ils ne transportaient pas l'animal car l'abattage a lieu sur place. La distance moyenne de transport des animaux déclarée par les 292 sujets est de $13,30 \pm 7,92$ km.

2.1.4. Transport des animaux

Un pourcentage de 89 % de bouchers déclarent transporter les animaux. Une proportion non négligeable (11 %) d'animaux sont acheminés vers le lieu d'abatage à pieds. Dans les deux cas ce déplacement engendre une fatigue aux animaux influençant ainsi négativement la qualité de la viande.

2.1.5. Stabulation

Sur les 747 réponses, 619 sujets, soit 83%, procèdent à l'abattage dès l'arrivée des animaux, les autres (128, soit 17%), seulement, laissent les animaux se reposer avant l'abattage. La durée de stabulation moyenne est très variable. Elle va de quelques heures à trois jours. Chez les bouchers qui

la pratiquent, elle est en moyenne de 32 ± 21 heures et seulement 76 alimentent et donnent à boire aux animaux.

Plus de 80% des bouchers ne pratiquent pas la stabulation et abattent des animaux stressés abaissant ainsi de la qualité de la viande.

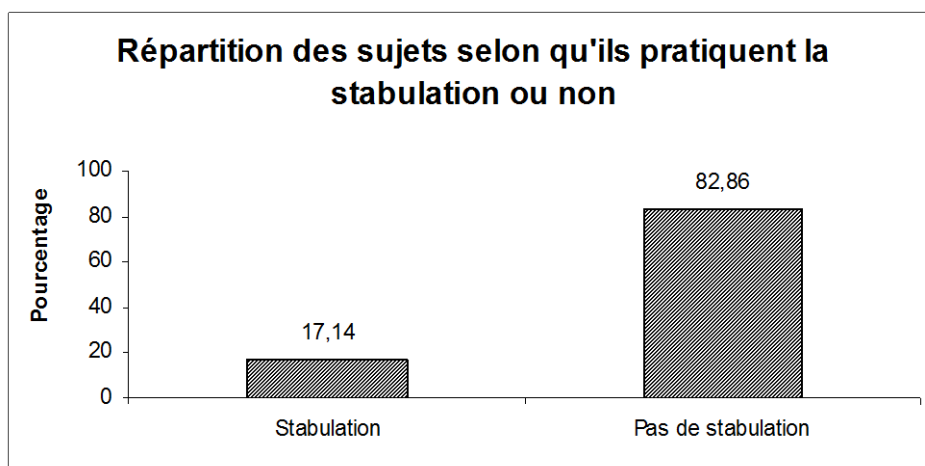


Figure 26 Répartition des sujets selon qu'ils pratiquent la stabulation ou non

2.1.6. Inspection *ante mortem*

Près de 78% des bouchers ne procèdent pas à l'inspection *ante mortem*. Cela constitue un risque de transmission de pathologies déjà en amont de l'abatage.

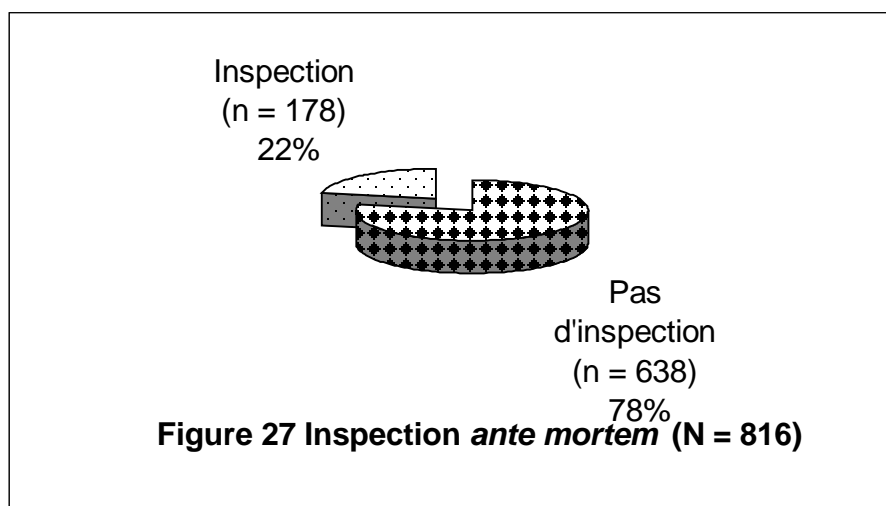
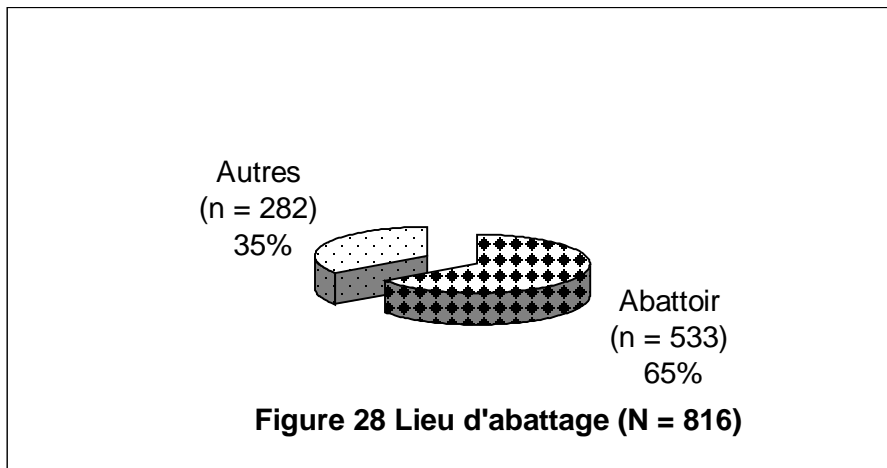


Figure 27 Inspection *ante mortem* (N = 816)

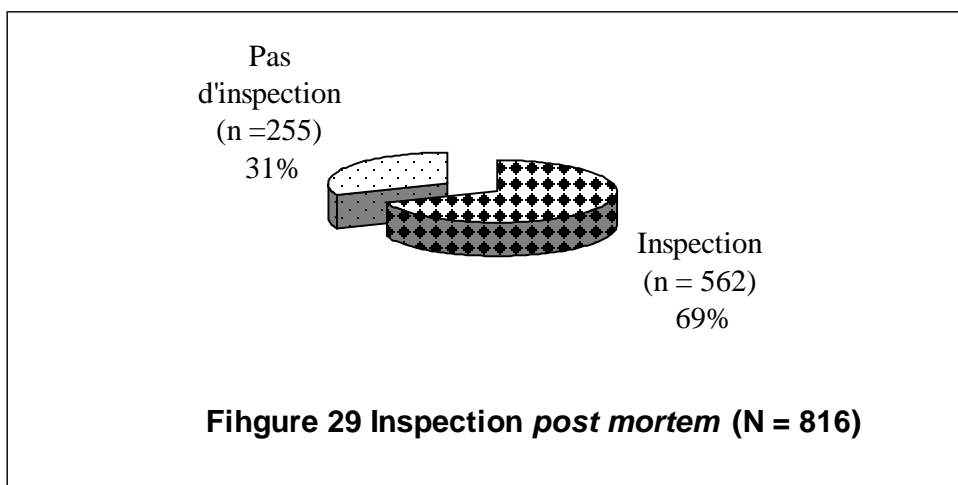
2.1.7. Abattage à l'abattoir ou non

L'abattage hors abattoir se fait dans une proportion assez élevée (35%), échappant ainsi à tout contrôle sanitaire constituant un autre risque pour le consommateur.



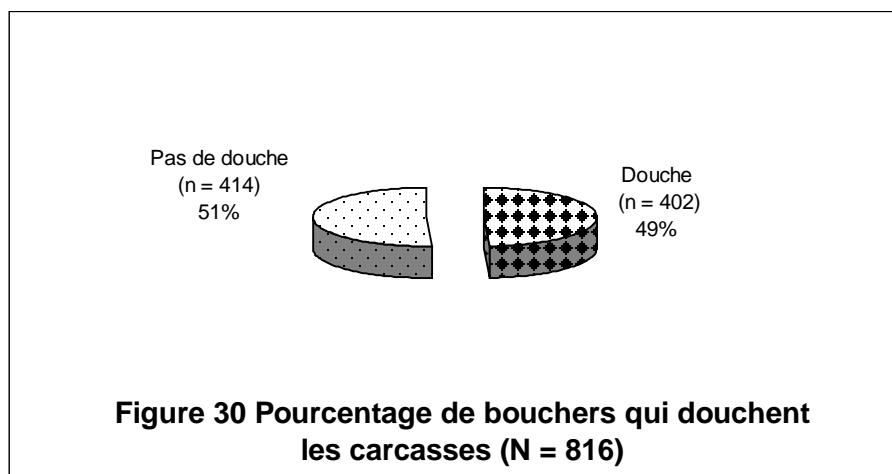
2.1.8. Inspection *post mortem*

L'inspection *post mortem* se fait à 69%. Cependant, 31% des abattages ne sont pas contrôlés. Il s'agit probablement des bouchers effectuant l'abattage anarchique hors abattoir. La consommation de cette viande non contrôlée est un risque potentiel pour la santé du consommateur.



2.1.9. Douche des carcasses

La douche des carcasses dans le but est de diminuer la charge microbienne initiale et améliorer ainsi la qualité hygiénique de la viande n'est effectuée qu'à 50%.

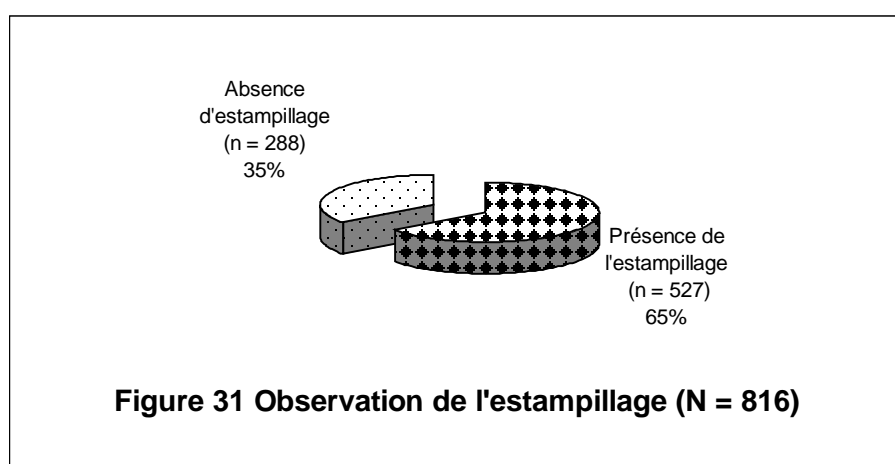


2.1.10. Transport des carcasses

Le transport des carcasses se fait par manutention (19%) à l'air libre sur les épaules (n= 87 ; 11%) et par brouette (n= 64 ; 8%). Le transport par véhicule (camion, fourgonnette) sans aucune précaution particulière d'hygiène et de protection contre les poussières se fait à 39 % (n= 316). Par ce type de transport seulement 42% (n=347) est frigorifique.

2.1.11. Estampillage

Un taux de 35% des carcasses ne sont pas estampillées. Ce sont des viandes commercialisées sans aucun contrôle sanitaire et donc sans garantie hygiénique pour le consommateur et porte atteinte à la santé publique.



2.1.12. Ressuyage

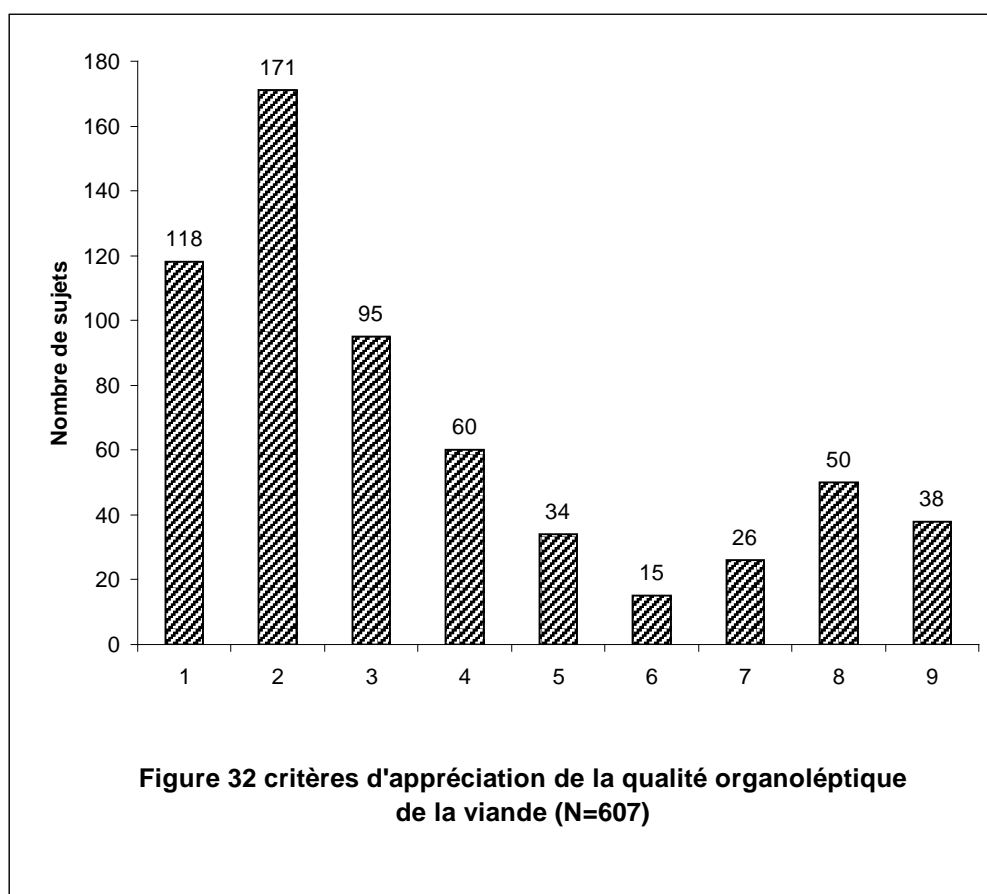
106 bouchers commercialisent la viande juste après l'abattage et 708 la conservent soit par réfrigération soit la laisse à l'air libre. En général, cette étape très importante dans la maturation n'est

pas respectée et est mal connue. Les bouchers parlent plus de « séchage » que de ressuyage. La durée de ce séchage varie de deux à vingt quatre heures.

2.1.13. Qualités organoleptiques de la viande

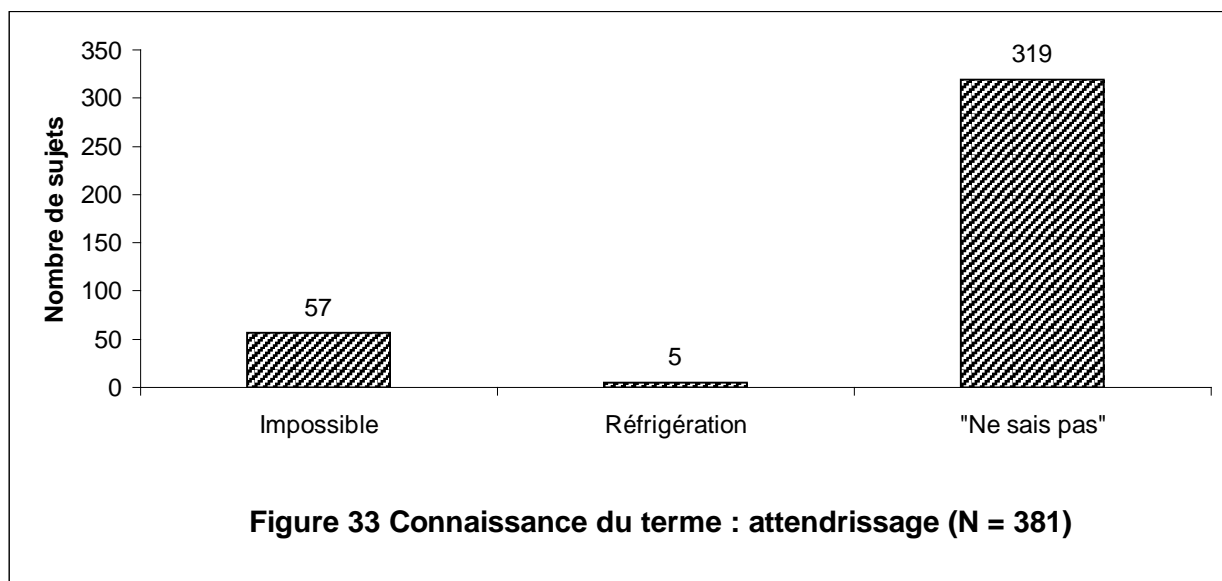
Le boucher ne reconnaît pas une bonne viande. Les principaux critères de la qualité de la viande ne sont pas ou peu fréquemment cités : tendreté, jutosité, flaveur, ...

- | | |
|-------------------------|------------------------|
| 1 Couleur | 2 Apparence générale |
| 3 Expérience | 4 Fraîcheur |
| 5 Tendreté | 6 Importance du muscle |
| 7 Importance du gras | 8 Goût |
| 9 Couleur et tendreté i | |



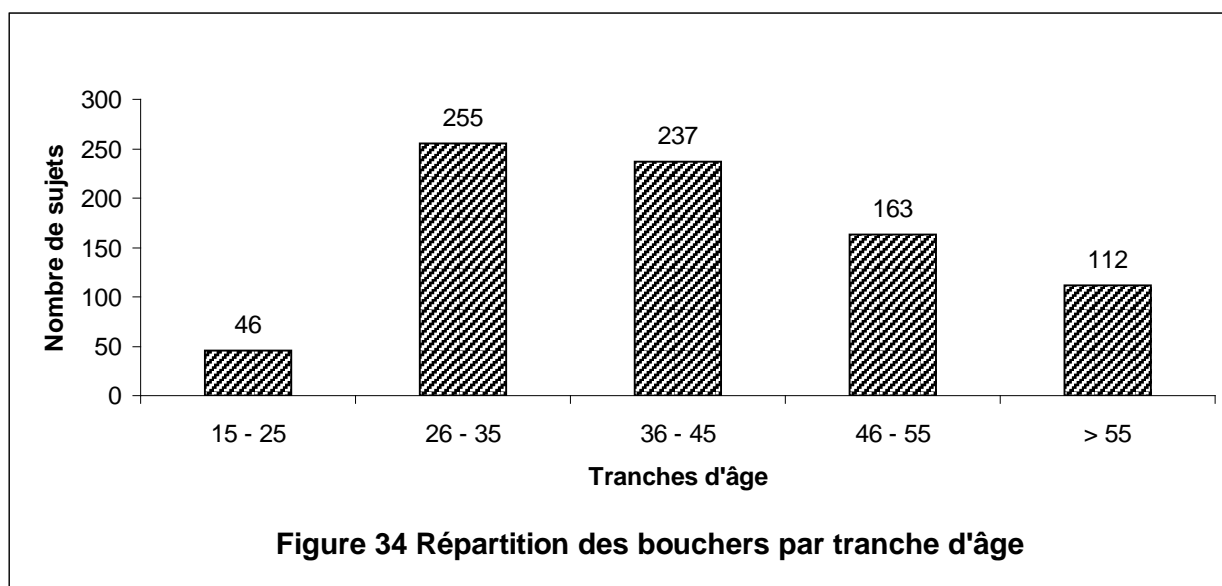
2.1.14. Attendrisage de la viande

Le boucher ne sait pas ce qu'est l'attendrisage de la viande.



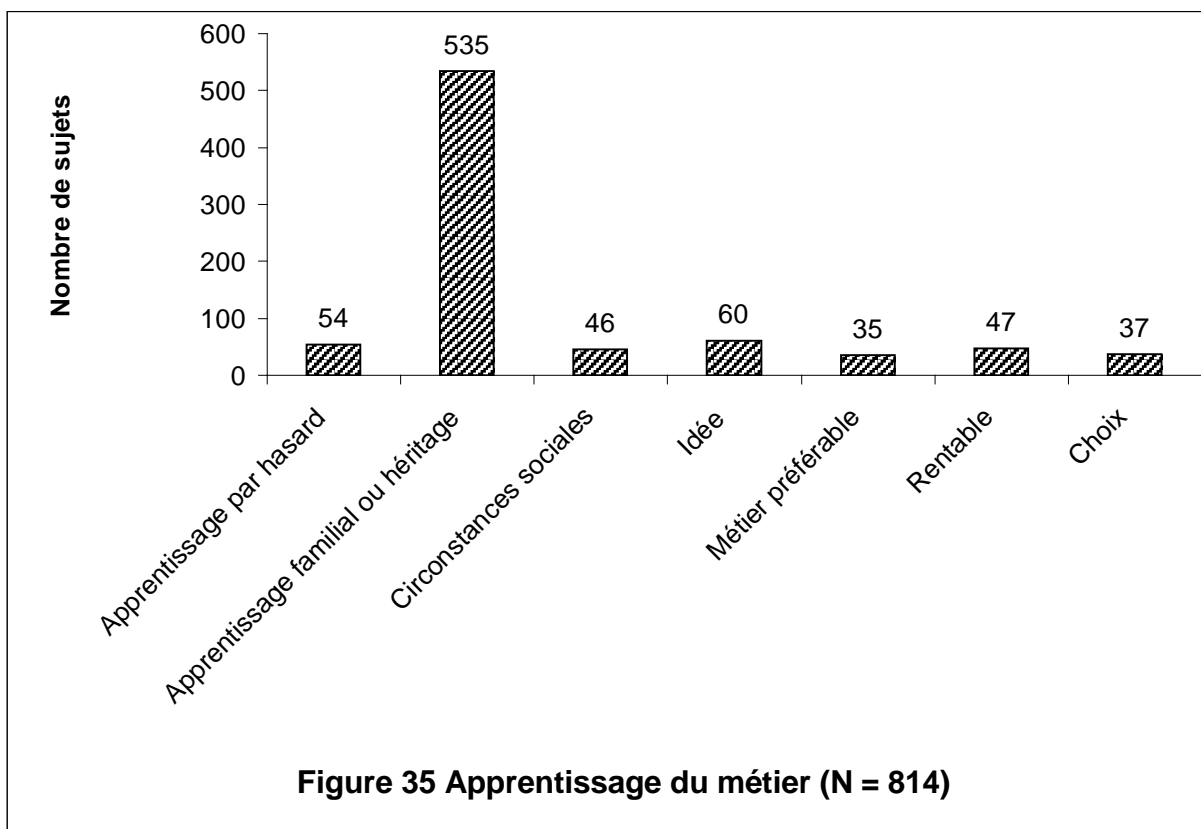
2.1.15. Age des bouchers

Les bouchers sont âgés en majorité (60%) entre 30 et 40 ans, il est possible donc de les former.



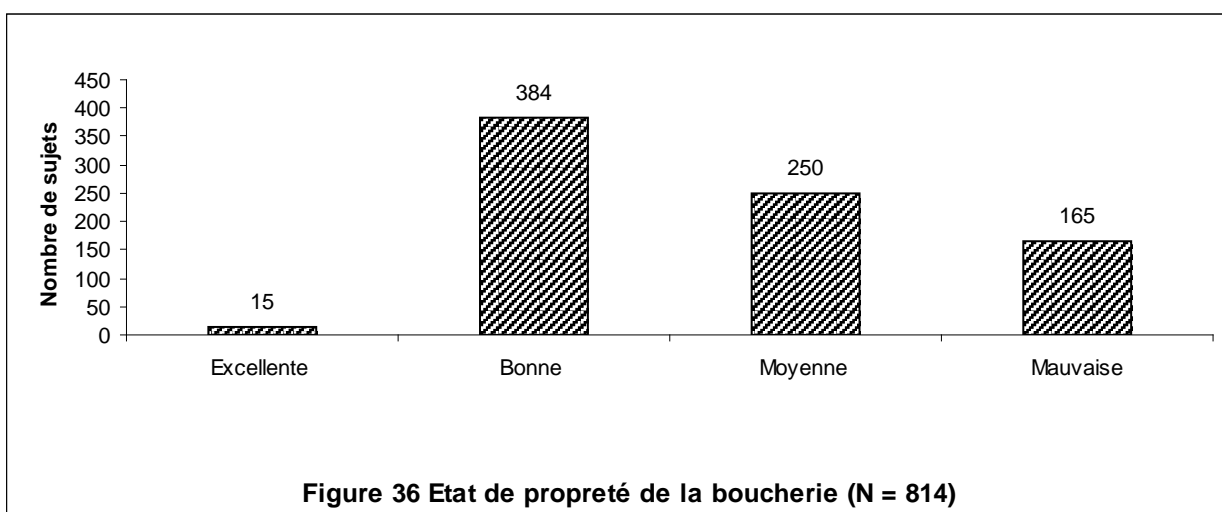
2.1.16. Apprentissage du métier

Le métier de boucher n'existe pas dans la formation professionnelle. Comme la plupart des métiers artisanaux l'apprentissage se fait au niveau familial.



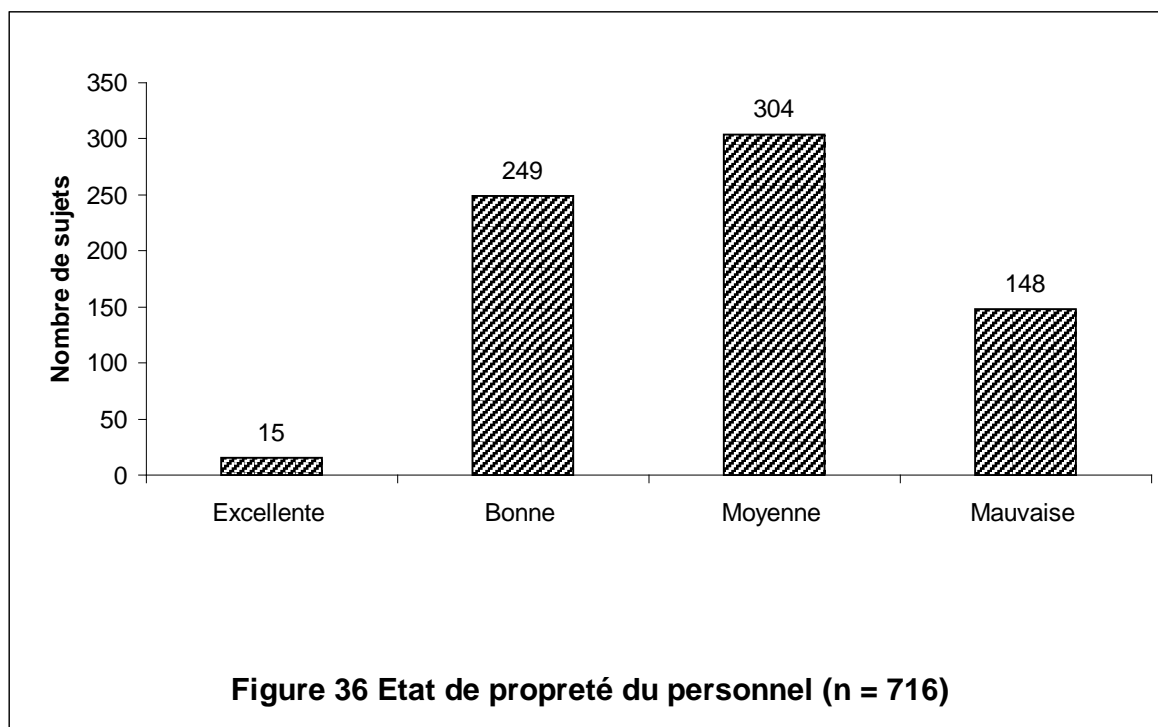
2.1.17. Etat de propreté de la boucherie

Seulement 49% des boucheries sont dans un état de propreté bon à excellent. La moitié des locaux de vente présentent plutôt un état de propreté insuffisant. Là encore, l'hygiène des lieux n'est pas respectée et aura certainement des conséquences néfastes sur la qualité de la viande et sur la santé du consommateur.



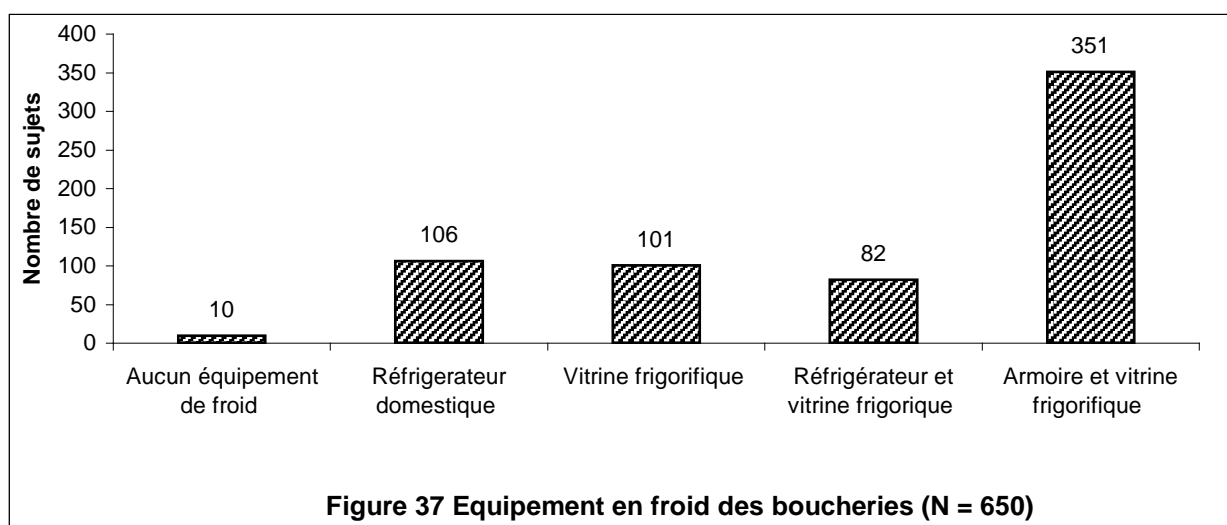
2.1.18. Etat de propreté du personnel

Uniquement 37% du personnel de boucherie sont respectueux de la propreté corporelle et des règles d'hygiène. Ceci rajoute au constat de propreté général ce qui affecte encore une fois la qualité de la viande.



2.1.19. Equipement en froid des boucheries

En général, la conservation de la viande en boucherie se fait en conditions réfrigérées. Cependant, 1,5% ne possèdent pas d'équipement de froid ce qui constitue un délit.



SYNTHESE

L'enquête réalisée auprès des bouchers fait ressortir que la filière viande est caractérisée par la recherche de la rentabilité financière à tous les niveaux.

Il y a un manque flagrant de professionnalisme et de formation chez les bouchers.

Une méconnaissance quasi-totale de la qualité hygiénique et organoleptique de la viande.

L'abattage hors abattoir est courant. Le contrôle ante mortem est très faible. Le contrôle post mortem concerne 65% des carcasses uniquement.

Une carence notable de la chaîne de froid est constatée. Le transport, par brouette et à l'air libre qui constitue un risque important

Le contrôle sanitaire insuffisant serait dû à la crainte d'augmentation des coûts et le risque de saisie ou de consignation des carcasses par le vétérinaire.

Ainsi, la filière exige plus de contrôle sanitaire à tous les niveaux et une mise à niveau par une formation des bouchers qui semblent être inaptes à apprécier la qualité de la viande.

L'objectif premier de ce travail est la mise en place d'une structure permettant, au sein de l'INATAA, d'aborder en termes de recherche, l'analyse des qualités de la viande. Bien sûr, seules les techniques de bases sont actuellement disponibles et les collaborations avec l'INRA de Clermont Ferrand nous ont permis d'introduire progressivement de nouvelles méthodes comme l'électrophorèse, les westerns blot, l'immunochimie, l'histologie, la chromatographie, etc.

Les exigences des consommateurs, en termes de qualité des viandes, sont de plus en plus précises et de plus en plus incontournables au moins dans les pays européens. Même si ces exigences ne sont pas aussi marquées en Algérie, nous devons être conscients que cela viendra plus vite que nous le pensons. Nous devons, donc, préparer l'avenir et réfléchir aux moyens à mettre en œuvre pour répondre à l'attente des consommateurs. Les qualités recherchées par les consommateurs sont, pour la viande, élément central du repas, les suivantes :

- A tout moment, ils recherchent une qualité nutritionnelle adaptée à leurs désirs et l'attention se focalise tout particulièrement, aujourd'hui, sur le taux de lipides intramusculaires.
- Dans les circuits de distribution non traditionnels de la viande (supermarchés), mode de distribution qui se développe rapidement dans notre pays, celle-ci est présentée sous forme de portions unitaires préemballées et, à ce stade, la qualité qui sera prise en compte est la couleur. Une couleur rouge-vif est considérée comme un signe de fraîcheur et de qualité, alors qu'une couleur brune est souvent assimilée, même si ce n'est pas le cas, à une viande plus ou moins avariée.
- Au moment de sa consommation, les qualités qui seront recherchées seront dans l'ordre décroissant d'importance : la tendreté, la jutosité et la flaveur. Si la viande est dure, les autres qualités organoleptiques (jutosité et flaveur) ne seront pas prises en considération.

Notre attention s'est, donc, naturellement portée sur la tendreté, qualité organoleptique la plus recherchée par les consommateurs. Pour développer des travaux sur cette qualité, il nous a, d'abord, été nécessaire de mettre en place une méthode physique d'appréciation de cette qualité afin de nous permettre d'analyser un nombre d'échantillons.

Nous avons, ainsi, pu mettre en place une méthode physique objective d'appréciation de l'état de maturation de la viande d'agneau par référence à sa tendreté. Cette technique a été validée par la mise en place d'un jury de dégustation qui devait confirmer les résultats obtenus par cette méthode.

Cette technique, faisant appel à la pénétrométrie, est applicable sur des viandes peu riches en collagène, principale protéine du tissu conjonctif. Les données de la littérature ont, en effet, clairement démontré l'impossibilité d'appliquer cette technique à une viande bovine qui contient, en moyenne, selon les sources, 3 à 5 fois plus de collagène.

Notre travail de recherche nous a conduits à la réalisation de toute une étude sur la qualité de la viande d'agneau, qui a abouti à une publication qui devant être soumise à une revue scientifique internationale.

Par ailleurs, la collaboration avec l'INRA de Clermont Ferrand et les résultats obtenus dans ce contexte, nous ont amené à reconsidérer le concept actuel du processus d'attendrissage des viandes en incluant une nouvelle étape dans ce processus, qui pourrait correspondre au stade pré-rigor, stade jusque-là très énigmatique. Cette nouvelle étape qui précède et chevauchent plus ou moins la hase d'installation de la rigor mortis, correspond à la mise en place du processus de mort cellulaire ou apoptose. Cette hypothèse est confortée par certains travaux mettant en évidence une synthèse de protéines dans les premières minutes qui suivent l'abattage (Jia et al. 2006a & b). Parmi ces protéines, plusieurs sont des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique indispensable pour augmenter la production d'ATP nécessaire à la mise en place du processus apoptotique, qui implique une dégradation des structures cellulaires par un groupe d'enzymes dédiées à cette fonction et qui sont les caspases, cystéine proteases capable de dégrader toute l'ossature de la cellule portée par le cytosquelette. Ce cytosquelette est un ensemble de structures filamenteuses transversales et longitudinales sur lesquelles viennent se fixer les filaments d'actine et de myosine ainsi que toutes les protéines régulatrice de la contraction.

Enfin, la réalisation d'une enquête auprès des professionnels de la viande nous a permis de révéler les faiblesses de cette filière et devrait nous inciter à réfléchir tous ensembles aux solutions pour améliorer la situation tant au niveau des qualités de la viande que des conditions de production et de préservation de nos richesses en termes d'espèces animales de grande qualité, qui s'exportent trop facilement. Le monde actuel est, en effet, engagé dans une guerre économique très dure et il nous appartient de préserver nos richesses agricoles.

Ces premiers efforts devraient être poursuivis pour développer une recherche de haut niveau dans le domaine des productions agricoles et de leur qualité.

- A -

- Abbas K., 2000.** Viande rouge au Maghreb. *AgroLigne*, N°9, 7-12.
- Abbot, M. T., Pearson, A. M., Price, J. F. & Hosper, G. R (1977).** Ultrastructural changes during autolysis of red and white porcine muscle. *J. FoodSci.*, 42, 1 185-1 188.
- 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 Bioscience*, 6, D1-D11.
- Adrian, C. & Martin, S. J. (2001).** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 390-397.
- Agarkova, I., Ehler, E., Lange, S., Schoenauer, R. & Perriard, J. C. (2003).** M-band: a safeguard for sarcomere stability?. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 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. *Journal of Comparative Neurology*, 397, 572-579.
- Akaaboune, M., Verdiere-Sahuque, 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*. *Journal of Cell Physiology*, 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. *Journal of Cellular Biochemistry*, 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. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 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. *Biochemical J.*, **354**, 25-30.

Azuma, T., Pals, G., Mohandas, T. K., Couvreur, J. M. & Taggar, R. T. (1989). Human gastric cathepsin E. Predicted sequence, localization to chromosome 1 and sequence homology with other aspartic proteinase. *J. Biol. Chem.*, **264 (28)**, 16748-16753.

- B -

Baba, T., Watanabe, K., Kashiwabara, S & Arai, Y. (1989). Primary structure of human proacrosin from its cDNA sequence. *Febs. Letters*, **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. 34th ICoMST, Brisbane, **8**, 152-160.

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. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **425**, 239-245.

Barnier, V. M. H. (1995). *Determinants and predictors of beef tenderness*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

Barret, 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.

- Barret, A. J. (1980).** Fluorimetric assay for cathepsin B and cathepsin H. *Biochem. J.*, **187**, 909-912.
- Barret, A. J. (1980).** Mammalian proteases. A glossary and bibliography. In *Protein breakdown in health and disease*. Edited by D. Evered & J. Whelan.
- Barret, A. J. (1986).** The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences*, **12**, 193-196.
- Barret, A. J. (1987).** The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed. Biochim. Acta.*, **45**, 1363-1374.
- Barret, A. J. (1994).** Classification of peptidases. *Methods Enzymol.*, **244**, 1-15.
- Barret, 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.
- Barret, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. (1998).** *Handbook of proteolytic enzymes*. London: Academic Press.
- Beatty, K., Bieth, J. & Travis, J. (1980).** Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized α -proteinase inhibitor and α -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.
- 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. *Journal of Cell Science*, **117**, 2641-2651.
- Beere, H. M. (2005).** Death versus survival: Functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *The Journal of Clinical Investigation*, **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 Journal of Cancer*, **84**, 1135-1140.

- Bendall, J. R. & Swatlan, 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.
- Bennet, 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^{ème} 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. Tschesche, L. J. Greene & E. Truscheit. Germany: Bayer-Symposium 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. *Biomedical Medicine*, **32**, 387-397.
- Bige, L., Ouali, A. & Valin, C. (1985).** Purification and characterization of a low molecular weight cysteine proteinase inhibitor from bovine muscle. *Biochimica Biophysica 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 Neuropathologica*, **100**, 618-626.
- Bird, J. W. C. & Carter, J. (1980).** Proteolytic enzymes in striated and non striated muscle. In *Degradation processes in heart 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. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **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 specificity 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 Pecker, 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. *Journal of Animal Science*, **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.
- 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.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, **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. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **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 *gastrocneius*. *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.

Busch, W. A., Stromer, M. H., Goll, D. E. & Suzuki, A. (1972). Ca⁺²- specific removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **52** (2), 367-381.

- C -

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 Physiologica*, **171**, 341-348.

Carrell, R. & Travis, J. (1985). α -1-antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 20-24.

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. *Advances in 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'-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'-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.

- 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. *Advances in Meat Research.*, **1**, 73-119.
- 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 *prerigor* frozen ovine muscle due to variations in *post mortem* incubation temperatures. *J. Food Sci.*, **31**, 801-806.
- Corrie, 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.
- Cory, S. & Adams, J. M. (2002).** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, **2** (9), 647-656.
- Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. (1996).** Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, **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.

- D -

- Dahlman, B., Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S. & Kluetzel, P. M. (2000).** Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *Journal of Molecular Biology*, **303**, 643-653.
- Dahlmann, B., Ruppert, T., Kluetzel, P. M. & Kuehn, L. (2001).** Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie*, **83**, 295-299.
- 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⁺² 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. *Biochemical, Journal*, **60**, 604-617.
- De Tullio, R., Sparatore, B., Salamino, F., Melloni, E. & Pontremoli, S. (1998).** Rat brain contains multiple mRNAs for calpastatin. *FEBS Lett.*, **422**, 113-117.
- 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. *Journal of Animal Science*, **79**, 398-412.
- Devlin, G. L., Chow, M. K. M., Howlett, G. J. & Bottomley, S. P. (2002).** Acid denaturation of alpha1-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 Medicine*, **35**, 473-483.
- Doumit, M. E., Lonergan, S. M., Arbona, J. R., Killefer, J. & Koohmaraie, 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. (1992).** Modelling *post mortem* tenderisation. III: Role of calpain I in conditioning. *Meat Sci.*, **31**, 85-94.
- Dransfield, E. (1992).** Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. Proc. 38th 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 Produits 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 -

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 μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **1077** (2), 197-208.

Eilers, 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. *Journal of Animal Science*, **74**, 790-798.

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.

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 essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in investigation of neuromuscular disease. *Neurology*, **12**, 778-784.

Ervasti, J. M. & Campbell, K. P. (1991). Membrane organisation of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, **66**, 1121-1131.

Essén-Gustavsson, B. & Fjelkner-Mudig, S. (1985). Skeletal muscle characteristics indifferent breeds of pigs in relation to sensory properties. *Meat Sci.*, **13**, 33-47.

Essén-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.

Essén-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. *Journal of Cell Physiology*, **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. *Laboratory Investigation*, **81**, 27-39.
- Fidzianska, A., Kaminska, A. & Glinka, Z. (1991).** Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. *Neuropatologia 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. *Molecular Biology*, **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*. 1st Edn. Zaragoza : Acribia, 364
- 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.
- Fuentes-Prior, P. & Salvesen, G. S. (2004).** The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochemical Journal*, **384**, 201-232.

- G -

- Gaboriaud, C., Serre, L., Guy-Crotte, O., Forest, E. & Fontecillacamps, J. C. (1996).** Crystal structure of human trypsin 1 : an expected phosphorylation of Tyr 151. *J. Mol. Biol.*, **259**, 995-1010.

- Gaillard, O. (2002).** Les troponines. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, **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. *Journal of Cell Biology*, **119**, 493-501.
- Geesink, G. H., Nonneman, D. & Koohmaraie, M. (1998).** An improved putification 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.
- 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 α -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). Acceleration 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?. *Current Opinion Cell Biology*, **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 NH₂ terminus of titin spans the Z-disk: its interaction with a novel 19-kDa ligand (T-Cap) in 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. 38th 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.

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 Journal of Medicine*, **91**, 14s-22s.

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^{ème} 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.

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).

Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Boudjellal, A. & Ouali, A. (2006). Meat ageing : Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology, Article in Press*.

- 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.
- 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. *Biology of the 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 enscende: alanine insertion and abolition of plasmin inhibitory activity. *Science*, **238**, 209-211.
- 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.
- 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 μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in *post mortem* bovine muscle. *Journal of Animal Science*, **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 α -actinin degradation in bovine *semitendinosus* muscle. *J. Food. Sci.*, **54**, 1426-1430.

Hwang, S., Steineckert, B., Yasothronsrikul, 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.

- I -

Im, H., Seo, E. J. & Yu, M. H. (1999). Metastability in the inhibitory mechanism of human α 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.*, **274**, 11072-11077.

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.

- J -

Jeremiah, L. E. (1982). Factors affecting consumption, selection and acceptability of meat purchases. *Journal of consumer studies and home economics*, **6**, 137-154.

Jiang, S. T. (2000). Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. *Food Science and Agricultural Biology*, **2**, 55-74.

Jin, H., Wu, Z., Tian, T. & Gu, Y. (2001). Apoptosis in atrophic skeletal muscle induced by brachial plexus injury in rats. *Journal of Trauma*, **50**, 31-35.

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.

- K -

Karlsson, A. H., Klont, R. E. & Fernandez, X. (1999). Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Liv. Prod. Sci.*, **60**, 255-269.

Kastner C.L., Koohmaraie M., (2003). Chilling and cooking rate effects on some myofibrillar determinants of tenderness of beef. *J. Anim. Sci.*, **81**, 1473-1481.

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. Kaminami.

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 Journal of 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.

Kiessling, 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. (1984). 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.

Kirshke, H., Barret, A. J. & Rawlings, N. D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein 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 μ -calpains. *Journal of Animal Science*, **70**, 3697-3706.

Koohmaraie, M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation process 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. *Journal of Animal Science*, **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. *Journal of Animal Science*, **69**, 617-624.

Kosteliansky, U. E. & Gneushev, G. H. (1983). Vinculin localization in cardiac muscle. *Febs Letters*, **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. *Annual Review of Physiology*, **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 Ca⁺²-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted and denervated rat skeletal muscle. *Anat. Rec.*, **232**, 60-77.

Kumamoto, T., Kleese, W. C., Cong, J. Y., Goll, D. E., Pierce, P. R. & Allen, R. E. (1992). Localization of the 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.

- L -

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 μ -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. (1988).** Evlution *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*, 6th 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, Biological Sciences and Medical Sciences*, **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. *Current Rheumatology Report*, **3**, 325-333.
- Liu, X. S., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. D. (1997).** DFF, a heterodimeric potein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, **89**, 175-184.
- Locker, R. H. & Hagyard, C. J. (1963).** A cold shortening effect in beef muscles. *J. Sci. Food Agric.* **14**, 787-793.
- Locker, R. H., and N. G. Leet. (1975).** Histology of highly stretched beef muscle. I. The fine structure of grossly stretched fibers. *J. Ultrastruct. Res.* **52**:64.

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.

Mac Bride, M. A. & Parris, F. C. (1977). The 30 000 Dalton component of tender bovine *longissimus* muscle. *J. Food Sci.*, **42** (6), 1627-1629.

- M -

Machlin, L. J. & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, **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.

Maigolius, H. S. (1996). Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes*, **45** (suppl. 1), 514-519.

Majino, G. & Jons, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, **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.

Margolius, H. S. (1996). Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes*. 45 Suppl 1 : S14-9.

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. (1996). Studies in meat tenderness. III. The effects of cold shortening on tenderness. *J. Food Sci.*, **31**, 450-459.

Martin, S. J., Reutelingsperger, 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. *The Journal of Experimental Medicine*, **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, and Takaito, O. (1974),** M-Protein *J. Biochem*, Vol. 75, No. 2 367-380 King D.A., Dikeman M.E., Wheeler T.L.,
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1736**, 181-188.
- Matsuura, T., Kimura, S., Ohtsuka, S. & Maruyama, K. (1991).** Isolation and characterization of a 1200 kDa peptide of a connectin. *J. Biochem.*, **110**, 474-478.
- Mattews, 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. & Verdiere-Sahoque, M. (1999).** Protease nexin I expression is upregulated human skeletal muscle by injury-related factors. *Journal of Cell Physiology*, **179**, 305-314.
- Meier, P., Finch, A. & Evan, G. (2000).** Apoptosis in development. *Nature*, **407**, 796-801.
- Meynier, A. & Gandener, G. (1994).** La saveur des viandes cuites: relations avec l'oxydation des phospholipides. *Viandes et Produits Carnés*, **15**, 179-182.
- 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.
- Mishra, N. C. & Kumar, S. (2005).** Apoptosis: A mitochondrial perspective on cell death. *Indian Journal of Experimental Biology*, **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 du porc. *J. Rech. Porcine Fr.*, **20**, 201-214.

Monin, G. (1988). Evolution *post mortem* du tissu musculaire et conséquences pour 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.

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.

Nahamura, F. & Takahashi, K. (1985). Paratropomyosin: A new myofibrillar protein that modifies the actin-myosin interactions in *post rigor* skeletal muscle. *J. Biochem.*, **97**, 1053-1059.

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. (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 -

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.

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) *Biochemistry* 20, 4942-4950.

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 porcine 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. (1990). La maturation des viandes: facteurs biologiques et technologiques de variation. *V. P. C.*, **11**, 281-290.

Ouali, A. (1990). Meat tenderisation: possible causes and mechanisms. A review. *Journal of 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. 14th 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. *Reproduction Nutrition Développement*, **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., 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. 37th ICoMST*, Kumbach, Allemagne, **1**, 452-456.

Ouchterlony, O. (1948). Antigen-Antibody reactions in gels. *Acta Path.*, **26**, 507-514.

- P -

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. *Journal of Structural Biology*, 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.

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.

- 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. *Annals de cardiologie et de angéologie*, **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 ans 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. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **174**, 185-188.
- Pette, D. & Staron, R. S. (1990).** Cellular and molecular diversites of mammalian skeletal muscle fibers. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **116**, 1-76.
- Pfeiffer, N. E., R. A., Varnell, T. R., Kruggel, W. G. & Kaisser, I. I. (1972).** Effects of *post mortem* aging 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*. 3th Edn. Seattle: Ebner and Suns. 300 pp.
- Potempa, J., Enghild, J. J. & Travis, J. (1995).** The primary elastase inhibithor (elastasin) and trypsin inhibitor (contrapsin) in the goat are serpins related to human α 1-antichymotrypsin. *Biochem. J.*, **306**, 191-197.
- Potempa, J., Korzus, 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 Journal of Applied Physiology*, **27**, 349-395.

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.

- Q -

Quilichini, Y. (1986) Le réflèmetre retrolux 1 1 pour apprécier la couleur de la viande de veau V.P.C. 7,1,19-23.

- R -

R.W. Currie and F.H. Wolfe , Rigor(1980), related changes in mechanical properties (tensile and adhesive) and extra-cellular space in beef muscle. *Meat Science* **4** pp. 123–143.

Rami, A., Agarwal, R., Botez, G. & Winckler, J. (2000). μ -calpain activation, DNA fragmentation and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain Research*, **866**, 299-312.

Rawlings, N. D. & Barret, A. J. (1994). Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.*, **244**, 461-486.

Rawlings, N. D. & Barret, A. J. (1994). 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. *The Febs Journal*, **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.

Renner, M. (1984). Variabilité entre muscles et entre animaux de la stabilité de la couleur des viandes bovines. *Sci. Aliment.*, **4**, 567-584.

Renner, M. (1999). Biochemical basis of fresh meat color. *Proc. 45th ICoMST, Tokyo*, **1**, 344-353.

Renner, M. 1984. Variabilité entre muscles et entre animaux de la stabilité de la couleur des viandes bovines. *Sci. Aliment.* **4**:567-584

Richards, G. P., Chao, L. & Chao, J. (1997). Distribution of tissue kallikreins in lower vertebrates: potential physiological roles for fish kallikreins. *Comparative Biochemistry and Physiology-C- Pharmacology and Toxicology and Endocrinology*, **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., Hartzer, 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 element in maintenance of muscle integrity. *J. Food Biochem.*, **8**, 1-24.

Roncalés, P., Jaime, I., Beltran, J. A., Geesink, G. H., Laack, H. L. J., Barnier, V. M. H., & Smulders, 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.

- S -

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: Portlands 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. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **31**, 1373-1390.
- Sandri, M. (2002).** Apoptotic signaling in skeletal muscle fibers during atrophy. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic 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?. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **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. (1984).** Three myosin heavy chain isoforms 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).** Cross-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.
- 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. *Journal of Food Science*, **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.** 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. 42st 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. *Seminars in Cancer Biology*, **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., Ishiura, S. & Suzuki, K. (1997).** Structure and physiological function of calpains. *Biochemical Journal*, **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.
- Starr, R, Offer, G. (1971)** Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations. *FEBS Lett.* 1971 Jun 2;15(1):40-44.

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.

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.

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. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.

- T -

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. Edite 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. *Neuromuscular Disorders*, **12**, 613-622.
- Tews, D. S. (2005).** Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle and Nerve*, **32**, 443-458.
- 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.
- 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 measuring 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 electrically 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. *Biomedica Biochimica 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 dépolymérase*s. Pp. 279-312. Edited by A. Mouranche & C. Costes. Paris: Gauthier-Villars.

Valin, C. (1988). Differentiation du tissu musculaire conséquences technologiques pour la filière 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., Touraille, C., Vigneron, P. & Ashmore, C. (1982). Prediction of meat quality traits based on muscle biopsy fibre typing. *Meat Sci.*, **6**, 257-263.

Van Gurp, 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. *Experimental Cell Research*, **222**, 70-76.

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.

- W -

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. & Snger, 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. & Wright, J. (1988). Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z-line. *J. Cell Biol.*, **107**, 2199-2212.

Wang, K., Mc Clure, J. & To. A. (1979). Major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 3698-3702.

Warriss, P. D. and Leach, T. M. (1978). The influence of slaughter method on residual blood content of meat. Meat Research Institute Memoir No.845.

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). Neutrophyl 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.

Weiderander, 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.

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.

Whisstoch, J., Skinner, R. & Lesk, A. M. (1998). An atlas of serpins conformations. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 63-67.

Wiederanders B, Bromme D, Kirschke H, von Figura K, Schmidt B, Peters C. (1992). Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. *J Biol Chem.*; 267: 13708-13.

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. *Human Molecular Genetics*, **10**, 1563-1569.

Yamanoue, M. & Takahashi, K. (1988). Effect of paratropomyosin on the increase in sarcomere length of *rigor* shortened skeletal muscles. *J. Biochem.*, **103**, 843-847.

Youle, R. J. & Karbowsky, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **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.

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. *Clinics in Sport Medicine*, **22**, 693-701.

- Z -

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, 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.

ANNEXE

1. LE QUESTIONNAIRE

Numéro de l'enquête :

Date de l'interview :

Adresse de la boucherie :

- Commune :
- Secteur :
- Nom du commerce :
- Type de viande vendue :

1. Quel type de viande commercialisez-vous ?

- 1.1. Bovine
- 1.2. Ovine
- 1.3. Caprine
- 1.4. Volaille
- 1.5. Cameline

2. A quel endroit vous approvisionnez-vous ?

- 2.1. Abattoir lui-même
- 2.2. Ferme privée
- 2.3. Ferme personnelle
- 2.4. Marché
- 2.5. Autres

3. Quels sont les critères d'achat, de l'animal vivant, que vous exigez ?

- 3.1. Etat d'engraissement
- 3.2. Etat sanitaire
- 3.3. Prix
- 3.4. Sexe
- 3.5. Autres

4. Eloignement du lieu d'approvisionnement en animaux par rapport au lieu d'abattage ?

- estimation de la distance en km.....

5. Comment transportez-vous l'animal vivant ?


- A pieds
- Transporté


6. Estimation de la distance séparant le lieu d'abattage de l'étal en km.....

7. Comment transportez-vous la carcasse ?

.....

8. Abattez-vous l'animal juste après son arrivée ?

- Non 

- Oui 

8.1. Combien de temps attendez-vous
pour abattre l'animal ?
.....heures

8.2. Pourquoi ?
.....
.....

9. Alimentez-vous l'animal jusqu'à l'heure d'abattage ?

- Oui
- Non

10. Donnez-vous de l'eau à l'animal ?

- Oui - Non
11. Avant l'abattage, l'animal subit-il une inspection vétérinaire ?
- Oui -Non
12. Effectuez-vous l'opération d'abattage au niveau de :
- 12.1. La boucherie - 12.2 La ferme - 12.3. Abattoir agréé
- 12.4. Autres
13. Les carcasses subissent-elles une inspection vétérinaire ? - Oui
-Non
14. Les carcasses sont-elles douchées ?
- Oui -Non
15. Les carcasses sont-elles pesées ?
- Oui -Non
16. Absence ou présence de l'estampillage (observations de l'enquêteur)
.....
17. Vendez-vous la viande juste après l'abattage ?
- Oui -Non
18. Comment conservez-vous la viande ?
- 18.1. Réfrigération - 18.2. Congélation - 18.3. Autres
19. Selon vous, quels sont les critères de qualité d'une viande ?
.....
20. Comment faites-vous pour attendrir la viande ?
.....
21. Depuis combien de temps êtes-vous établis ?.....
22. Votre âge ?.....
23. Comment avez-vous appris le métier ?.....
24. Le nombre d'employés dans la boucherie ?.....
25. La surface de la boucherie ?.....
26. Observations des enquêteurs sur l'état de propreté de :
- 26.1. Etal - 26.2. Personnel - 26.3. Equipement

Résumé :

Parmi les qualités organoleptiques de la viande, la tendreté reste la qualité la plus recherchée par le consommateur. Pour atteindre cet objectif, il faudra mettre en place tous les outils nécessaires à l'appréciation des qualités de la viande. Il est bien sur évident que la première des qualités à mettre en place est la qualité hygiénique qui, aujourd'hui, souffre principalement de l'absence d'une chaîne de froid fiable entre l'abatteur et le consommateur. Concernant la tendreté de la viande, le principal problème rencontré dépend de sa grande variabilité, qui est liée à plusieurs facteurs plus ou moins liés à l'animal.

La première partie de cette thèse a porté sur les ovins. Deux lots d'agneaux ont été utilisés. Le premier, composé de 6 animaux, a servi à la recherche d'une relation entre la mesure sensorielle et instrumentale de la tendreté, l'autre, composé de 10 animaux, pour la recherche de relations entre les paramètres physico-chimiques et la tendreté. Les muscles étudiés sont : le *Semimembranosus*, le *Semitendinosus*, le *Biceps femoris* et le *Rectus femoris*. Les paramètres mesurés en cinétiques, choisis sur la base de leur contribution plus ou moins importante à la définition de la tendreté de la viande sont : le pH, l'osmolarité, la rétention d'eau des protéines myofibrillaires et le degré de protéolyse. La tendreté de la viande a été mesurée au pénétromètre. Les résultats obtenus montrent clairement que la méthode d'estimation de la dureté de la viande d'agneau par pénétrométrie donne des valeurs fortement corrélées aux notes de tendreté estimée par un jury de dégustation. Par ailleurs, les 3 variables très interdépendantes que sont le pH, la pression osmotique et la rétention d'eau présentent toutes un profil d'évolution discontinu. Cette discontinuité ne peut pas être expliquée par les théories actuelles avancées pour expliquer l'acidification du muscle *post mortem*.

L'autre volet de la thèse est lié à la mort cellulaire programmée ou apoptose. Ce processus mis en évidence dans les années 1995, est maintenant relativement bien connue. L'analyse des conséquences du processus apoptotique par rapport aux connaissances que nous en avons *in vivo*, apportent des réponses à de nombreuses questions posées, depuis de longue date, par tous les scientifiques impliqués dans l'étude du processus de transformation du muscle en viande et spécialement l'étape de la maturation. Même si la participation des peptidases n'explique pas tout, il est probable que son intervention, très précoce, est un élément essentiel facilitant l'action des autres systèmes protéolytiques.

L'enquête réalisée auprès des bouchers fait ressortir que la filière viande est caractérisée par la recherche de la rentabilité financière à tous les niveaux. Il y a un manque flagrant de professionnalisme et de formation chez les bouchers. De plus, une méconnaissance quasi-totale de la qualité hygiénique et organoleptique de la viande est constatée. L'abattage hors abattoir est courant. Le contrôle *ante mortem* est très faible. Le contrôle *post mortem* ne concerne que 65% des carcasses. Le contrôle sanitaire insuffisant serait dû à la crainte d'augmentation des coûts et le risque de saisie ou de consigne des carcasses par le vétérinaire. Au final, la filière viande exige plus de contrôle sanitaire à tous les niveaux et une mise à niveau par une formation des bouchers qui semblent être inaptes à apprécier la qualité de la viande.

Mots clés : viande, qualités, ovin, maturation, tendreté, enquête, apoptose.

Abstract

Among the sensory qualities of meat, tenderness still the most quality searched by consumers. To achieve this goal, it should put in place all the necessary tools for the assessment of meat quality. It is of course obvious that the first quality to establish is the hygienic one, which today mainly suffers from the lack of a reliable cold chain between the cutter and the consumer. Concerning the meat tenderness, the main problem depends on its strong variability, which is in relation to several factors related or no to the animal.

The first part of this thesis focused on sheep. Two batches of lambs were used. The first, consisting of 6 animals was used to search for a relationship between sensory and instrumental measures of tenderness. The second, consisting of 10 animals in order to search the relationships between physicochemical properties and tenderness. The muscles studied were: *Semimembranosus*, *Semitendinosus*, *Biceps femoris*, and *Rectus femoris*. The kinetic characteristics measured, selected on the basis of their contribution to the definition of meat tenderness are: pH, osmolarity, water holding capacity and the degree of proteolysis. The meat tenderness was measured by penetrometry. The results obtained show clearly that the method of estimating the toughness of the lamb by penetrometer gives values highly correlated with tenderness scores estimated by a sensory panel. In addition, three variables are highly interdependent as pH; osmotic pressure and water holding capacity, all have a discontinuous pattern of change that cannot be explained by current theories advanced to explain the acidification of *postmortem* muscle.

The second part of the thesis is related to the programmed cell death or apoptosis. This process highlighted in 1995, is now relatively well known. The analysis of the consequences of the apoptotic process in relation to the knowledge we obtained *in vivo*, provide answers to many questions, since a long time, still unclear for all scientists involved in the study of the meat tenderizing process, specifically the step of the maturation. While the involvement of these peptidases does not explain everything, it is likely that its very early intervention is essential to facilitate the action of other proteolytic systems.

The investigations of the survey revealed that butchers meat industry is characterized by the search of profitability at all levels. There is a lack of professionalism and training among butchers. In additions, an almost total ignorance of the hygienic quality and taste of the meat is found. The slaughter outside of the slaughterhouse is commonly operated. The *ante mortem* inspection is very low. The *postmortem* control concerns 65% only of the carcasses. The low sanitary control is due perhaps for fear of an increase in costs and the risk of seizure or set of carcasses by the veterinarian. In the end, the meat industry requires more sanitary control at all the levels and upgrade training of butchers who seem to be unable to appreciate the quality of the meat.

Keywords: meat, quality, ovine, maturation, tenderness, survey, apoptosis.

ملخص:

من بين مميزات اللحم المؤثرة بللحواس ، تبقى الطراوة هي أكثر ميزة يبحث عنها المستهلك، ولتحقيق هذا المطلب كان من الواجب توفير جميع الأدوات اللازمة لتقدير نوعية اللحم . ومن الجلي بما كان أن أولى هذه الخاصيات الواجب توفيرها هي خاصية النظافة التي تعاني اليوم أساسا من غياب سلسلة تبريد موثوق بها بين القائم على الذبح والمستهلك . أما بالنسبة لطراوة اللحم، فإن المشكلة الرئيسية التي تصادفها منوطة بقابليتها الكبيرة للتغير والمرتبطة بعدة عوامل لها صلة بالحيوان إلى حد ما.

قام الجزء الأول من هذه الرسالة على الأغنام، أين استعملت مجموعتان من الخرفان، الأولى مكونة من 06 حيوانات استخدمت للبحث عن علاقة بين القياس الحواسي والأدوي للطراوة، وتكونت الأخرى من 10 حيوانات جاء البحث فيها عن علاقة بين المعايير الفيزيوكيميائية والطراوة.

وقد تناولت الدراسة العضلات التالية : غشائية النصف (Semimembranosus)، وترية النصف (Le Semitendinosus)، ذات الرأسين الفخذية (Biceps femoris)، المستقيمة الفخذية (Rectus femoris)

إن المعايير التي تم قياسها حركيا والتي اختيرت على أساس إسهامها الكبير إلى حد ما في تحديد طراوة اللحم وهي: درجة الحموضة (PH)، الضغط التناظفي، احتباس ماء بروتينات الليبي ف العضلي ودرجة التحلل البروتيني، تم قياس طراوة اللحم بمقياس النفوذية . تبين النتائج المتحصل عليها بوضوح أن الطريقة المتبعة مرتبطة ارتباطا وطيدا بنقاط الطراوة التي قدرتها لجنة التدوق.

من جهة أخرى، تعرض المتغيرات الثلاثة الشديدة الترابط، ألا وهي درجة الحموضة والضغط التناظفي واحتباس الماء، جميعها وجه تطور متقطع لا يمكن تفسيره بالنظريات الحالية المقدمة لشرح تحمض العضلة ما بعد الموت.

أما الشق الثاني من الرسالة فهو مرتبط بالموت الخلوي المبرمج (أو Apoptose)، وقد جاء توضيح هذه العملية في سنوات 1995 وصارت اليوم معروفة نسبيا. تقدم نتائج تحليل عملية الموت الخلوي المبرمج، مقارنة بالمعارف التي لدينا عن الجسم الحي، أجوبة لعديد من الأسئلة التي طرحها منذ زمن بعيد علماء مختصون عنوا بدراسة عملية تحول العضلة إلى لحم وبالأخص مرحلة النضج، وحتى وإن كانت مساهمة البيبيدات لا تشرح كل شيء، فمن المحتمل أن تدخلها المبكر جدا يعد عاملا جوهريا من شأنه أن يسهل نشاط أنظمة التحلل البروتيني الأخرى.

ولقد أسفر التحقيق الذي أجري لدى الجزائريين أن شعبة اللحم يميزها السعي وراء المردودية المالية على جميع المستويات، إذ هناك نقص فادح في المهنية ونقص في تكوين الجزائريين فضلا عن ما تم تسجيله من الجهل الشبه تام بميزة النظافة ومؤثر حواس اللحم، فالرقابة ما قبل الموت ضعيفة جدا، إذ لا تمس الرقابة بعد الموت إلا 65 % من أبدان الحيوانات. والرقابة الصحية الغير كافية مردها إلى التخوف من زيادة التكاليف وخطر مصادرة أو حجز الأبدان من قبل الطبيب البيطري.

في الختام، تتطلب شعبة اللحم مزيدا من الرقابة الصحية على جميع المستويات مع التمهيد لها بتكوين للجزائريين الذي يبدو عليهم أنهم غير أكفاء لتقدير نوعية اللحم