

UNE NOUVELLE APPROCHE DE LA MATURATION

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 générale la texture de la viande, reste, encore aujourd'hui, la qualité la plus recherchée par les consommateurs. En effet, si la viande 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,...).

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 partie, qui proposent un processus multienzymatique impliquant ces systèmes et probablement d'autres dont la fonction, dans le muscle *post mortem*, 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.

Maturation des viandes

Une nouvelle donne pour la compréhension de la maturation des viandes

Les calpaïnes sont généralement considérées comme les principaux intervenants dans le processus enzymatique qu'est la maturation des viandes. Les auteurs suggèrent qu'un autre groupe de peptidases, les caspases, pourraient être impliquées ; *in vivo*, elles sont à la fois initiatrices de la mort programmée des cellules et actrices puisqu'elles sont spécialisées dans la dégradation des structures cellulaires. Cette nouvelle ouverture pourrait constituer l'explication d'observations jusqu'à là inexplicables.

OUALI A. ^{(1) (2)}, HERRERA-MENDEZ C-H. ⁽¹⁾,
BÉCILA 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

Science et technique

LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE OU L'APOPTOSE

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 œuf, 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. À 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 machine-rie 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 morphogenèse 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 (Sanmart N. 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.

UNE MORT CELLULAIRE ORDONNÉE

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.

LES CASPASES, UNE NOUVELLE FAMILLE DE PEPTIDASES

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).

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 sérine 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 liai-

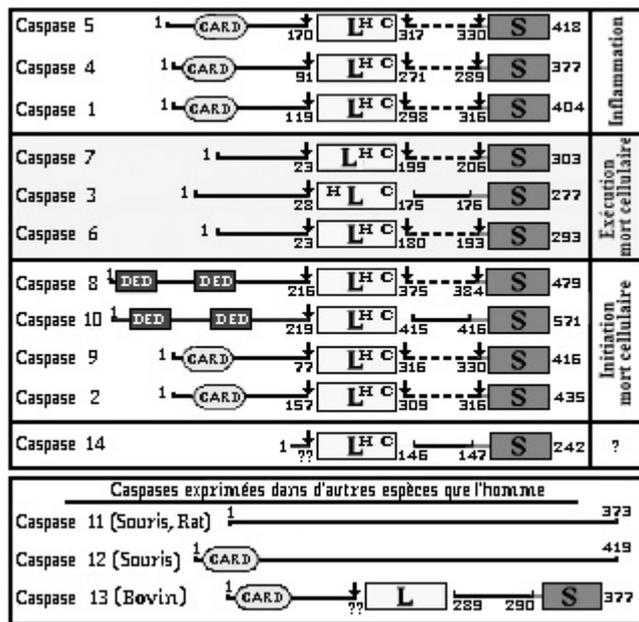


FIGURE 1

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 (L pur large) et d'une petite sous-unité (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.

son 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-1b-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.

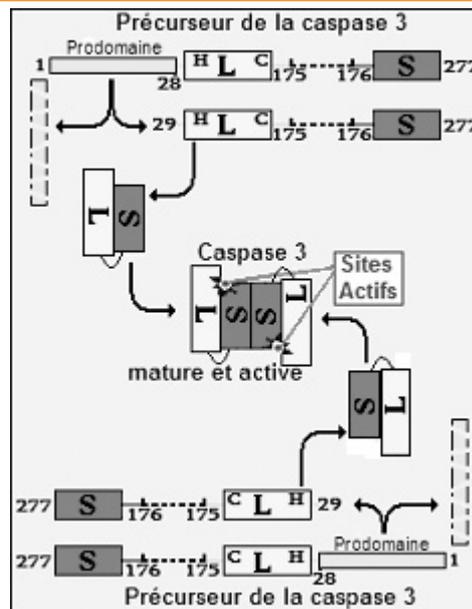


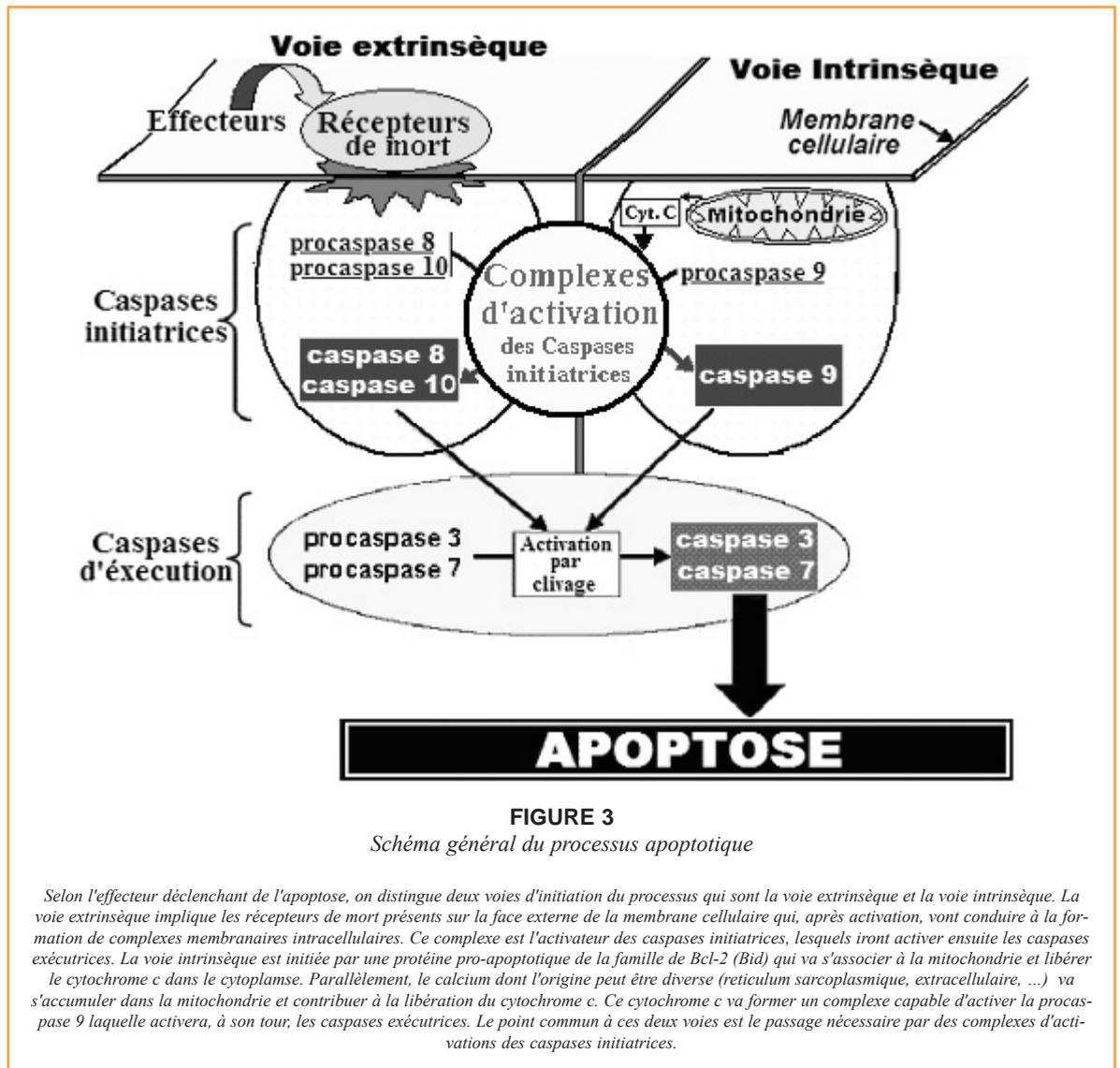
FIGURE 2

Schéma de maturation du précurseur de la caspase 3 en caspase 3 active, enzyme qui est un dimère avec deux sites actifs diamétralement opposés

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 (Death Effector Domains) ou CARD-CARD (Caspase Recruitment Domain).



On distingue trois classes de caspases :

- 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 pro-domaines de grande taille contenant souvent des régions essentielles pour leurs interactions avec d'autres protéines. Par exemple, les pro-domaines 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 pro-domaines de petite taille.

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.

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

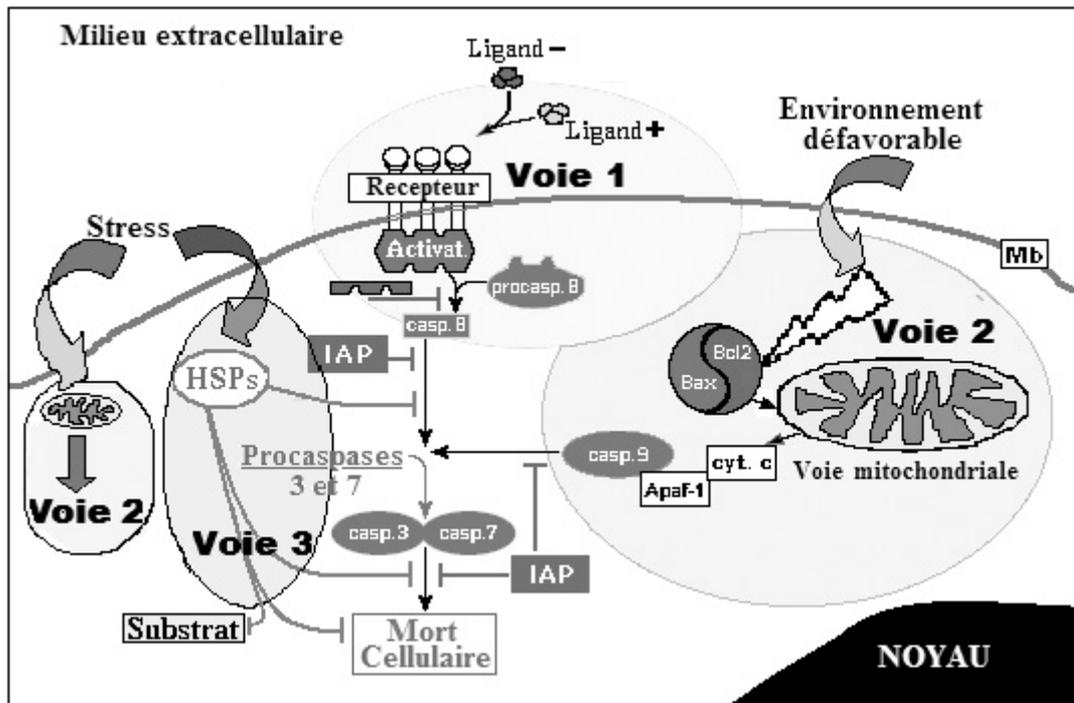


FIGURE 4

Régulation du processus apoptotique

Voie 1 aussi appelée extrinsèque : après activation du récepteur de mort par son effecteur proapoptotique, il y a activation du complexe membranaire intracellulaire associé au récepteur qui va fixer diverses protéines pour former un complexe capable d'activer la procaspase 8 par des interactions spécifiques. Cette voie est régulée par des inhibiteurs porteurs des mêmes motifs de liaison de la caspase 8 que ceux qui sont présents sur les complexes activateurs. Ces inhibiteurs vont venir en compétition avec les activateurs pour fixer les procaspases 8 et 10. Si les caspases initiateuses parviennent à être activées, la cellule possède des inhibiteurs d'apoptose (IAP) capables de ralentir voire stopper le processus en inactivant la caspase 8. Ces IAP seraient aussi capables d'inactiver les caspases effectrices (caspases 3 et 7).

Voie 2 aussi appelée intrinsèque : sous l'impulsion de Bax (partie en vert), une protéine proapoptotique, il y a formation d'un complexe qui va se fixer sur la membrane externe de la mitochondrie et altérer cette dernière avec une accumulation concomitante de calcium dans la mitochondrie. Cette altération va conduire à la libération de cytochrome c qui va contribuer à la formation, avec d'autres protéines, d'un complexe responsable de l'activation de la procaspase 9. Cette action de Bax peut être contrecarrée par Bcl-2, protéine à activité antiapoptotique. Si le complexe parvient à se former, le processus peut encore être bloqué par les inhibiteurs d'apoptose (IAP) qui vont s'associer à la procaspase 9 et empêcher son activation.

Voie 3 : cette voie constitue la conséquence primaire des différents types de stress que la cellule ou l'organisme va subir. Dans ce cas, la réaction des cellules se traduit par une synthèse intense d'HSP's (Heat Shock Proteins) dont l'action va globalement se traduire par un ralentissement du processus apoptotique. En parallèle, le stress peut conduire à une activation de la voie 2 ou voie mitochondriale et calcium dépendante.

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

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 initiateuses 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 (Inhibitors of APOptose). Dans le cas contraire, ces caspases vont être en mesure d'activer à leur tour les

caspases exécuteurs (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. À noter que Bcl2, une protéine de la même famille que Bax, quant à elle, a 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 (Inhibitors of Apoptosis).

- 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 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 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.

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, 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. 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,

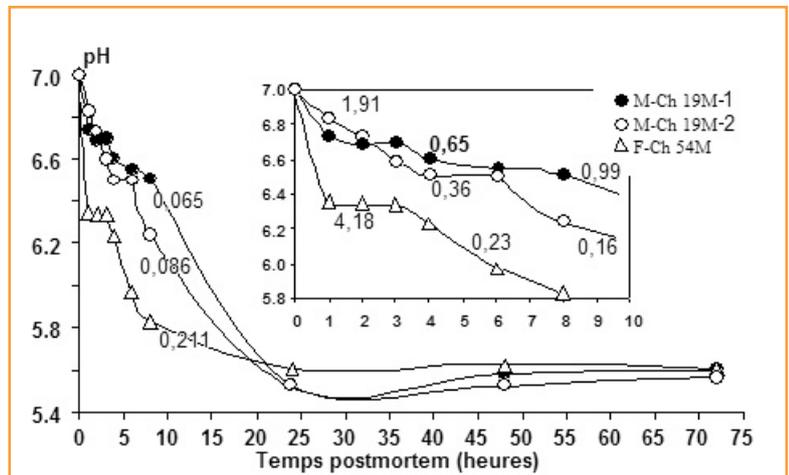


FIGURE 5

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 24 h, 48 h et 72 h. 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.

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.

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 électronégatifs, 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 *post mortem*, 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 8 h *post mortem*. Les mesures suivantes ont été réalisées à 24 h, 48 h et 72 h *post mortem*. 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 6 h 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 *post mortem* 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) et 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 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 5 h. Pour le premier animal (M-Ch-19M-1), un premier palier est observé entre 1 h et 3 h puis un second entre 4 et 8 h. Les vitesses de chute de pH estimées dans les plages 0-3 h, 3-8 h et 8-24 h 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 4 h et 6 h. Les vitesses de chute de pH estimées dans les plages 0-6 h et 6-24 h sont de 0,36 et 0,16 UpH h-1, respectivement. Pour le dernier animal, un seul palier est également observé entre 1 h et 3 h avec une vitesse de chute de pH de 4,18 UpH h-1, donc très rapide dans cette première phase (0-3 h), et de 0,23 UpH h-1 dans la seconde phase (3-24 h).

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 1 h et 8 h post mortem laisse penser que l'inversion de polarité de la membrane plasmique se produit durant les 8 premières heures *post mortem* alors que le pH est compris entre 6,4 et 6,8 environ. Cette constatation est confortée par les modifications de la conductivité du tissu musculaire, estimée par impédancemétrie, observées entre pH 6,4 et 6,8. (Damez et al., 2005).

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 attribue 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 *post mortem*, 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 organe ainsi qu'à la libération du cytochrome c. Le cytochrome c, élément moteur de la mort cellulaire, présente une activité proapoptotique et constitue un élément central de l'activation des caspases initiateurs. 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.

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 *post mortem* 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 inexplicable 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 événements associés à la mort cellulaire fournissent aujourd'hui une explication puisqu'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 *post mortem* 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 *post mortem*. 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 8-10 h post-abattage.

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,

post mortem, 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, ...).

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.

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 Orlowski (1980).

Les cathepsines furent le premier système enzymatique considéré 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 *post mortem* 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.

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 de maturation des viandes. Il est en effet clair que l'entrée des cellules musculaires en apoptose est un fait qu'il est difficile de contester compte tenu des conditions environnementales qui existent après la saignée de l'animal. C'est un passage obligé pour l'ensemble des cellules et des tissus de l'animal qui vient d'être abattu et, cela, quelle que soit l'espèce considérée. L'analyse des conséquences du processus apoptotique par rapport aux connaissances que nous en avons *in vivo*, apporte des réponses à de nombreuses questions posées, depuis longue date, par tous les scientifiques impliqués dans l'étude du processus de transformation du muscle en viande. Même si la participation de ces peptidases n'explique pas tout, il est probable que son intervention très précoce est un élément essentiel facilitant l'action des autres systèmes protéolytiques 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 prédictifs biologiques de la tendreté et des autres qualités de la viande est une nécessité absolue pour valoriser au mieux les carcasses en les orientant, rapidement après l'abattage, vers une utilisation optimale sur la base de leurs qualités potentielles. C'est aussi une nécessité absolue pour pouvoir incorporer les qualités de la viande dans les programmes de sélection génétique.

Dans le schéma traditionnel de transformation du muscle en viande (Figure 6), 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.

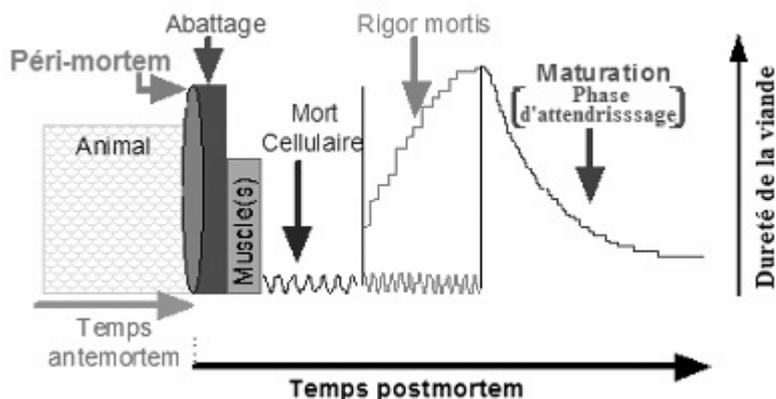


FIGURE 6

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.

B I B L I O G R A P H I E

- 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.
- BRAS M, QUEENAN B, SUSIN SA. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)*. 70, 231-239.
- 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., S. CLERJON, S. ABOUELKARAM (2005). Mesostructure assessed by alternating current spectroscopy during meat ageing, 51st International Congress of Meat Science and Technology, 2005, Baltimore, August 7-12 (Publication sur CD).
- DE DUVE C, PRESSMAN BC, GIANETTO R, WATTIAUX R. (1955). 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. (1964). 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 (1975). 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.
- SANMART?N 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. (2004). Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett*. 2004 Jun 1;567(1):111-5.
- THORNBERRY, 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. (1989). 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. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)*. 2005 Feb;70(2):231-9.
- WILK S. ET ORLOWSKI 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.