

ISOLEMENT D'UNE FRACTION PROTÉIQUE A ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DU MUSCLE DE BOVIN

C. VALIN

avec la collaboration technique de Joséphine ROUSSEL et A. OBLED

*Laboratoire de Recherches sur la Viande,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique*

SOMMAIRE

Une technique d'isolement d'une fraction protéique à activité protéolytique du muscle de bovin est décrite.

A partir des protéines sarcoplasmiques du muscle et par précipitation en milieu acide, relargage dans le sulfate d'ammonium et chromatographie sur DEAE-cellulose, une fraction active qui hydrolyse l'hémoglobine à pH 3,5, a été isolée.

La protéolyse *post mortem* dans le muscle, son rôle pendant la maturation, ont fait l'objet de nombreuses investigations. La méthode classique de détermination de l'intensité de la protéolyse par le dosage de l'azote soluble ou des acides aminés libres (ZENDER *et al.*, 1958; LOCKER, 1962; SHARP, 1963; DAVEY, 1966; GARDNER et STEWART, 1966), n'a montré qu'une augmentation relativement faible de ces fractions dans les conditions habituelles de maturation. Cependant cette technique ne peut pas rendre compte d'une action protéolytique limitée libérant des fractions protéiques de poids moléculaire élevé et qui, sans provoquer une apparition notable d'acides aminés libres, pourrait entraîner une désorganisation importante des éléments de structure de la fibre musculaire. En fait l'appréciation de l'importance exacte de la protéolyse *post mortem* nécessiterait la connaissance du mode d'action des cathepsines, endopeptidases actives en milieu acide, sur les différentes fractions protéiques du muscle. Or l'importance quantitative de ces enzymes dans le muscle est faible, comparée à celle d'autres organes tels que le foie, la rate ou le rein (BOUMA

et GRUBER, 1964 ; NAGET et WILLY, 1965) ce qui en rend l'extraction difficile et n'a pas permis jusqu'à présent d'aborder cette étude.

Cinq cathepsines sont actuellement connues. L'utilisation de substrats synthétiques a permis de distinguer trois d'entre elles, les cathepsines A, B et C de spécificité semblable respectivement à celle de la pepsine, de la trypsine et de la chymotrypsine. PRESS et PORTER (1960) ont mis en évidence la cathepsine D qui hydrolyse l'hémoglobine à pH 3,5, mais n'agit pas sur les substrats spécifiques de trois précédents enzymes. Enfin, LAPRESLES et WEBB (1962) ont isolé la cathepsine E active sur l'hémoglobine à pH 2,5.

Dans le muscle, l'existence des cathepsines A, B, C et D a été démontrée par LANDMAN (1963), BOUMA et GRUBERT (1964), BODWELL et PEARSON (1964) et PARRISH et BAILEY (1966), ces derniers réalisant la purification partielle d'un enzyme du muscle de porc, présentant certaines analogies avec la cathepsine D. Plus récemment, IODICE *et al.*, (1966) ont isolé les cathepsines D et A du muscle de poulet.

La présente note rapporte les premiers résultats que nous avons pu obtenir dans la mise au point d'une méthode simple d'isolement d'une fraction protéique à activité protéolytique du muscle de bovin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour cette étude, nous avons utilisé la partie charnue du diaphragme (m. diaphragma) prélevée sur des génisses de race française *Frisone Pie Noire* trente minutes après l'abattage.

L'extraction des protéines et l'isolement d'une fraction active ont été réalisés suivant les étapes indiquées au tableau 1. Toutes les opérations ont été effectuées à une température comprise entre 0 et + 5°C, sauf mention contraire.

Mesure de l'activité protéolytique

Une adaptation de la méthode de ANSON a été utilisée. Le mélange comprenant 2 ml de la solution à tester, 2 ml d'acide acétique 0,2 M et 2 ml de substrat, est mis à incuber pendant une heure à + 37°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 3 ml d'acide trichloracétique 15 p. 100 (TCA). Après précipitation par le TCA, le mélange est laissé en repos trente minutes à la température ambiante, puis est centrifugé. L'activité protéolytique est mesurée sur le surnageant par l'accroissement de densité optique à 280 m μ par heure corrigé des blancs substrats et enzymes. Nous appelons activité spécifique la variation de densité optique à 280 m μ par heure et par mg de protéine de la fraction testée.

Le substrat utilisé est une solution d'hémoglobine à 3 p. 100 de l'acide acétique 0,2 M.

Lors de l'utilisation de Fe⁺⁺ comme activateur, l'oxydation en Fe⁺⁺⁺ survenant pendant l'incubation, se traduit par un accroissement de DO à 280 m μ qui doit être retranché de l'accroissement dû à l'activité protéolytique.

Électrophorèse en gel d'amidon

L'électrophorèse en gel d'amidon est faite selon la méthode discontinue de POULIK (1957).

Dosage des protéines

Ce dosage est réalisé par la méthode du biuret et par la méthode de FOLIN LOWRY, les gammes sont faites avec la sérumalbumine bovine fraction V de NBC.

TABLEAU I

Méthode d'isolement d'une fraction active hydrolysant l'hémoglobine à pH 3,5

Traitements	Étapes de fractionnement				
Extraction des protéines	homogénéisat. 1' au biorex de 100 g de muscle dans 400 ml d'acétate de sodium 0,1 M ↓ homogénat ¼ h d'extraction ↓ Centrifugation 3 000 g pendant 20' ↓ Culot rejeté	surageant filtré ↓ fraction I			
Précipitation pH 5		fraction I + CH ₃ COOH 0,2 M ↓ Centrifugation 3 000 g 15' → ↓ culot rejeté	surageant fraction II ↓		
Relargage dans SO ₄ (NH ₄) ₂			Protéines précipitées entre 30 et 60 % de saturation ↓ Centrifugation 3 000 g 15' → ↓ surageant rejeté	Culot fraction III ↓	
Chromatographie DEAE-cellulose				Fraction III dans tampon phosphate 0,02 M pH 8 ↓ élution gradient de concentration →	Fraction IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. *Spectre d'activité autolytique des protéines sarcoplasmiques en fonction du pH*

Le spectre d'activité autolytique des protéines sarcoplasmiques du muscle en fonction du pH est réalisé en incubant ces protéines à différents pH pendant une heure à 37°C et sans ajouter de substrat au milieu d'incubation. Les pH sont obtenus par des tampons acide citrique-phosphate 0,2 M de pH 2,6 à 6 et par des tampons phosphates de même molarité au-delà de pH 6.

Comme l'indique la figure 1 et ainsi que l'avait montré KOZALKA et MILLER (1960) sur le muscle de rat, il existe deux groupes d'enzymes distincts par leur pH optimum d'activité. L'optimum en zone acide est atteint pour des pH compris entre 3,4 et 4. Par la suite, nous ne nous intéresserons qu'à l'activité protéolytique en zone acide, aussi les mesures effectuées pour suivre les degrés de purification obtenus seront faites à pH 3,5, l'hémoglobine substrat étant dissoute dans une solution d'acide acétique 0,2 N et le pH du milieu ajusté avec ce même acide.

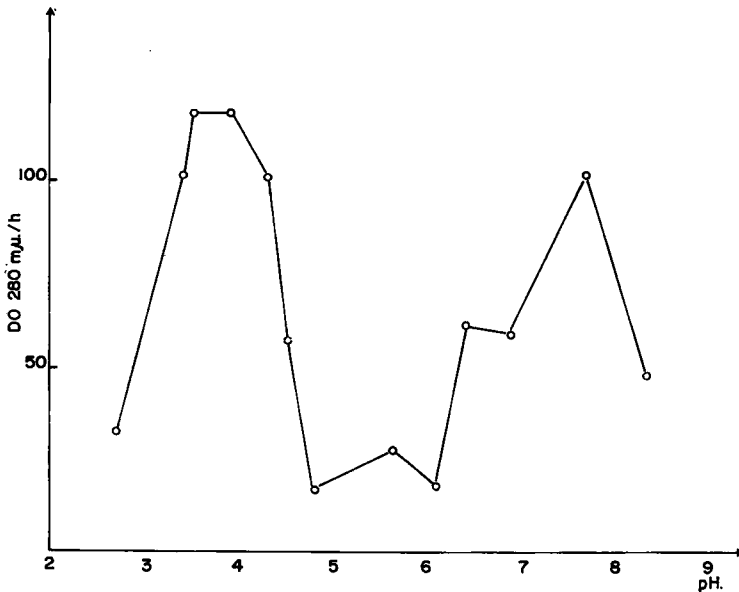


FIG. 1. — *Spectre d'activité autolytique des protéines sarcoplasmiques du muscle de bovin en fonction du pH*

2. *Isolement d'une fraction protéique hydrolysant l'hémoglobine à pH 3,5*2. 1. *Extraction des protéines.*

Les enzymes mis en jeu dans ces processus protéolytiques sont en majorité sous forme liée dans la cellule et leur activité est fonction de leur libération. W. NAGET

et F. WILLIG (1965) ont montré que la cathepsine D du muscle de rat est liée pour plus de 90 p. 100 à différents organites intracellulaires et l'homogénéisation du muscle dans du saccharose 0,25 M, à l'aide d'un appareil du type Waring Blendor, ne libère pas les fractions liées. La libération de ces dernières formes peut être obtenue par l'extraction dans des solutions salines de faible concentration et par des variations du pH, la stabilité de la liaison étant maximum pour des pH compris entre 6,8 et 7,2 (SAWANT *et al.*, 1964).

L'extraction est faite dans quatre volumes d'acétate de sodium 0,1 M. Après quatre heures d'extraction, l'homogénat atteint pH 6.

2. 2. Précipitation pH 5.

Une partie importante des protéines sarcoplasmiques de muscle précipitent à pH 5, la quantité précipitée variant avec la température (SCOPES). Cette précipitation est réalisée à 0°C par addition d'acide acétique 0,2 M.

2. 3. Fractionnement au sulfate d'ammonium.

Des aliquotes du surnageant de la précipitation pH 5 sont placées à 0°C pendant 16 heures dans une gamme de concentration croissante de sulfate d'ammonium et l'activité spécifique des protéines précipitées est mesurée (tabl. 2).

TABLÉAU 2

Relargage dans le sulfate d'ammonium des protéines de la fraction II

P. 100 de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Activité spécifique
0	0,97
0 à 20	0
0 à 30	0,22
0 à 40	5,8
0 à 60	9,4
0 à 80	5,9

La fraction la plus active représentée par les protéines précipitées entre 30 et 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est chromatographiée sur DEAE-cellulose après avoir été mise en solution, puis dialysée dans le tampon servant à équilibrer la DEAE-cellulose.

2. 4. Chromatographie sur DEAE cellulose.

Les protéines sarcoplasmiques du muscle peuvent être fractionnées par chromatographie sur DEAE-cellulose à pH neutre (MOHASSEB, 1963). Dans ces conditions, la fraction protéolytique active précipitée entre 30 et 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium reste fixée et pour en rendre l'élution possible, il faut opérer à pH supérieur, pH = 8, pour lequel la capacité de rétention de la DEAE-cellulose est moindre. Mais la diminution de la capacité de rétention s'accompagne d'une limitation de la charge en protéine possible.

Pour pallier cet inconvénient, on peut introduire une étape supplémentaire de purification en utilisant une chromatographie sur CM-cellulose à pH = 6 qui permet de fixer une partie des protéines inactives (PRESS, PORTER, 1960), puis de procéder à la chromatographie sur DEAE-cellulose. Il est possible aussi de procéder directement à la chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 8 en utilisant au mieux la capacité de rétention de l'échangeur à ce pH par l'emploi de colonne de forte section et en déterminant pour le tampon d'équilibrage à pH 8 la molarité maximum compatible avec la fixation sur la DEAE-cellulose de la fraction active.

Sur des colonnes de 10 cm × 7 cm² équilibrées par un tampon phosphate 0,02 M pH 8, 100 mg de protéine sont appliqués et l'élué est réalisé par un gradient de concentration discontinu en ClNa à température ambiante (fig. 2) Quarante

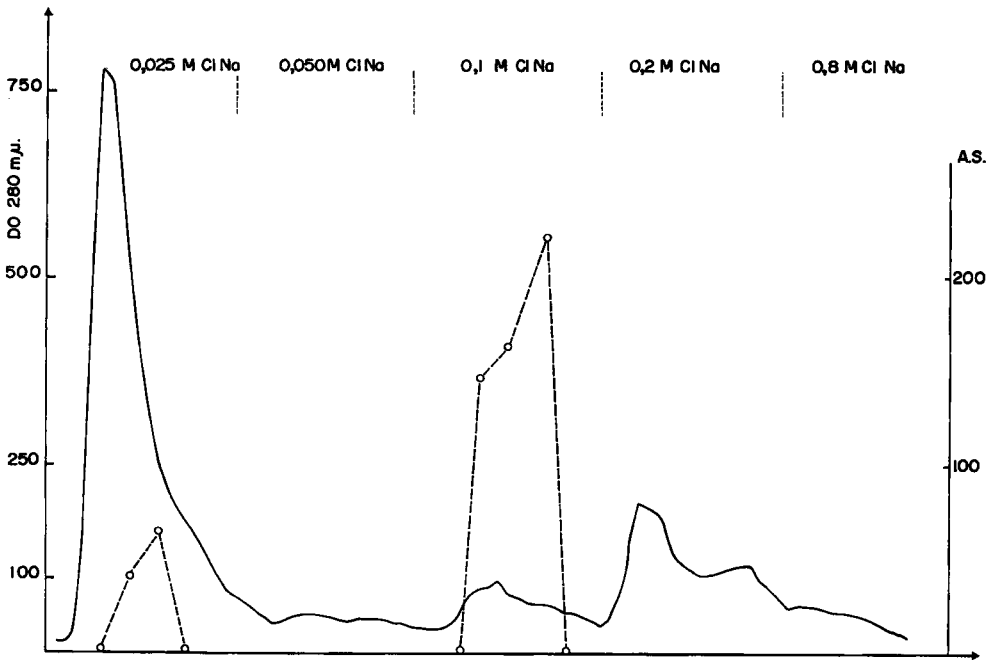


FIG. 2. — Chromatographie sur DEAE-cellulose des protéines de la fraction III.

Colonne équilibrée par un tampon phosphate 0,02 M Ph 8 ; élué par gradient de concentration discontinu de chlorure de sodium, débit de 1 ml/mn dt fraction de 8 ml

— DO 280 mμ de l'effluent
 - - - - - A.S. des fractions éluées.

pour cent des protéines ne sont pas ou sont peu retenues et sont éluées en un seul pic par ClNa 0,025 M, il s'agit des protéines qui migrent vers la cathode dans l'électrophorèse faite à pH 8,2 (fig. 3), ainsi que celles faiblement chargées à ce pH. Les protéines actives sont éluées lorsque la concentration de ClNa dans le tampon est de 0,1 M, mais une partie a été entraînée avec les protéines non retenues ; enfin, pour une concentration en ClNa de 0,2 M, est éluée une fraction qui n'hydrolyse pas l'hémoglobine, mais qui possède une activité autolytique.

2. 5. *Électrophorèse en gel d'amidon.*

La fraction active obtenue par chromatographie est dialysée contre le tampon phosphate 0,02 M pH 8, puis concentrée par pervaporation à + 5°C avant d'être analysé par électrophorèse pour apprécier le degré d'isolement obtenu (fig. 3).

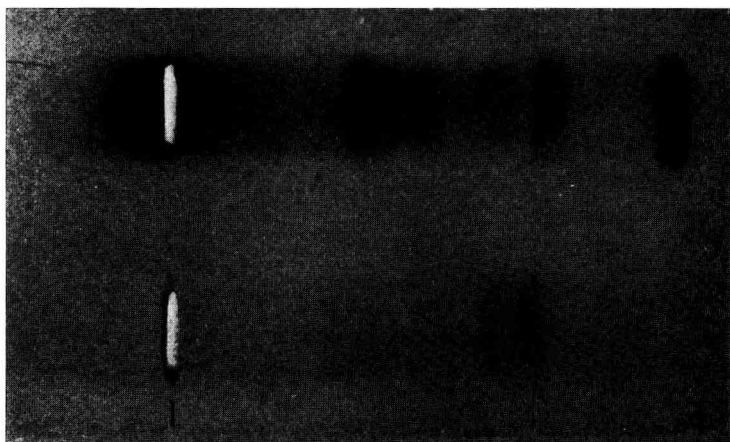


FIG. 3. — *Électrophorèse en gel d'amidon des protéines de la fraction III (en haut) et des protéines de la fraction IV (en bas)*

Par la coloration à l'amidoschwartz, il est possible de mettre en évidence au moins trois bandes (deux très nettes) qui migrent vers l'anode. La bande qui a le plus migré présente une mobilité égale à celle de la myoglobine précipitée entre 30 et 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, mais le test négatif à la benzidine a montré qu'elle n'est pas contaminée par de la myoglobine résiduelle, en outre, cette bande se retrouve dans tous les électrophorégrammes de fractions actives.

2. 6. *Résultats.*

Le tableau 3 résume les différentes étapes du processus de purification mis en œuvre et indique le gain d'activité obtenu.

TABLEAU 3

Activité spécifique des différentes fractions obtenues au cours de la purification

Fractions	Protéines mg/ml	Activité spécifique
I.....	12	1,24
II.....	8	1,88
III.....	9,6	9,8
IV.....	0,09	222

La fraction purifiée isolée présente certaines propriétés similaires à celles de la cathepsine D isolée par PRESS et *al.* (1960) de la rate de bœuf :

- activité optimum envers l'hémoglobine à pH compris entre 3,5 et 4 ;
- aucune activation par la cystéine.

Par ailleurs, plusieurs auteurs, SNOKE et NEURATH (1950), KOZALKA et MILLER (1960), PARRISH et BAILEY (1966) ont observé une activation par le fer ferreux de l'activité protéolytique dans le muscle à pH acide par un mécanisme inconnu, puisqu'aucune des cathepsines A, B, C et D n'est activée par Fe^{++} . Nous avons testé l'action de Fe^{++} dans le cas du muscle de bovin au niveau des fractions I et III (tabl. 4).

TABLEAU 4

Activation par le fer ferreux des fractions I et III

Animal	Fractions	Activité spécifique	
			Fe^{++} $2.10^{-1} M$
1	I	1,25	24
	III	13,2	13,1
2	I	1,67	44
	III	15,7	18,4
3	I	1,35	32,4
	III	9,8	18,2
4	I	2	29,6
	III	8,5	14,9

Nous constatons que Fe^{++} active considérablement (plus de 20 fois) l'activité protéolytique de l'extrait brut ou fraction I, ce qui est analogue au résultat obtenu par PARRISH et BAILEY sur le muscle de porc. Par contre, la fraction III n'est activée que 1,5 fois. La diminution du pouvoir activateur de Fe^{++} est peut-être un indice de purification.

CONCLUSION

La méthode simple que nous venons de décrire permet l'obtention d'une fraction protéolytique 150 à 200 fois plus active que l'extrait brut total des protéines sarcoplasmiques. Ces résultats nous permettent d'envisager un développement de ce travail, afin de pouvoir étudier les propriétés et l'action de la fraction isolée sur les protéines du muscle.

Reçu pour publication en juillet 1967.

SUMMARY

ISOLATION OF A PROTEOLYTIC FRACTION OF BOVINE MUSCLE

This investigation was undertaken in order to determine an isolation technique for a catheptic protein fraction of Bovine muscle.

The isolation was carried out on sarcoplasmic proteins by means of the following techniques :

precipitation, pH 5,
refractionation in ammonium sulphate,
DEAE-cellulose chromatography, pH 8.

The proteolytic activity on hæmoglobin at pH 3.5 of the isolated fraction was 150 times greater than in the full extract of sarcoplasmic proteins.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BODWELL C. E., PEARSON A. M., 1964. The activity of partially bovine catheptic enzymes on various natural and synthetic substrates. *J. Food Sci.*, **29**, 602-607.
- BOUMA J. M. W., GRUBER M., 1964. The distribution of cathepsins in rat tissues. *Bioch. Biophys., Acta*, **89**, 545-547.
- DAVEY C. L., GILBERT K. V., 1966. Studies in meat tenderness. II. Proteolysis and the aging of beef. *J. Food Sci.*, **31**, 135-140.
- GARDNER G. A., STEWART D. J., 1966. Changes in the free amino and other nitrogen compounds in stored beef muscle. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 491-495.
- IODICE A. A., LEONG V., WEINSTOCK I. M., 1966. Separation of cathepsins A and D of skeletal muscle. *Arch. Bioch. Biophys.*, **117**, 477-486.
- KOZALKA T. R., MILLER L. L., 1960. Proteolytic activity of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **235**, 660-665.
- LANDMAN W. A., 1963. Enzymes and their influence on meat tenderness. *Proc. Meat Tenderness Symposium*. Campbell Soup Co, 87.
- LAPRESLE C., WEBB T., 1962. The purification and properties of proteolytic enzyme rabbit cathepsin E. *Biochem. J.*, **84**, 455-462.
- LOCKER R. H., 1960. Proteolysis in the storage of beef. *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 520-525.
- MOHASSEB Z. S., 1963. *Fractionation of bovine muscle proteins by cellulose ion exchange chromatography*. Ph. D. thesis, Oregon, State University.
- PARRISH F. C., BAILEY M. E., 1966. Physicochemical properties and partial purification of porcine muscle cathepsin. *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 232-237.
- POULIK M. D., 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, **180**, 1477-1479.
- PRESS E. M., PORTER R. R., CEBRA J., 1960. The isolation and properties of proteolytic enzyme cathepsin D from bovine spleen. *Biochem. J.*, **74**, 501-514.
- SAWANT P. L., DESAI I. D., TAPPEL A. L., 1964. Factors affecting the lysosomal membrane and availability enzymes. *Arch. Bioch. Biophys.*, **105**, 247-253.
- SCOPES R. K., 1964. The influence of post mortem conditions on the solubilities of muscle proteins. *Biochem. J.*, **91**, 201-207.
- SHARP J. G., 1963. Aseptic autolysis in rabbit and bovine muscle. *J. Sci. Food Agric.*, **14**, 468-479.
- SNOKE J. E., NEURATH H., 1950. The proteolytic activity of striated rabbit muscle. *J. Biol. Chem.* **187**, 127-137.
- VON W., NAGET, WILLIG F., 1965. Aktivität und intrazelluläre lokalisation proteolytischer Enzyme in verschiedenen Organen. *Zeitsch. Vit. Horm. Ferment.*, **14**, 89-96.
- ZENDER R. et al., 1958. Aseptic autolysis of muscle. *J. Food Sci.*, **23**, 305-236.