

COMMUNICATIONS

Utilisation de la spectroscopie par courants thermostimulés pour la mise en évidence de modifications biophysiques dans les muscles de veau traités par des anabolisants

par Gilbert MOUTHON *, Colette LACABANNE **, A. LAMURE **
et J. DANDURAND **

RÉSUMÉ

Les auteurs utilisent la méthode de spectroscopie par courants thermostimulés pour étudier les caractéristiques d'un tissu musculaire (*Pectoralis transversus*), issu de veaux témoins ou ayant été traités avec des anabolisants (zéranol et trenbolone en implants).

Les spectres obtenus sur les 20 échantillons témoins et traités (race Frisonne) montrent des différences significatives.

D'autres travaux sont actuellement en cours, afin de pouvoir utiliser ces observations dans la reconnaissance de viandes provenant d'animaux traités aux anabolisants, et identifier l'origine des modifications signalées par cette méthode.

Mots clés : Anabolisants - Pectoralis transversus - Veau - Spectroscopie par courants thermostimulés.

* Laboratoire INRA de Physique et Chimie Biologique et Médicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général-de-Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex.

** Laboratoire de physique des solides, Université Paul-Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex.

SUMMARY

EFFECTS OF GROWTH SUBSTANCES ON CTS SPECTRA FROM CALVES MUSCLE

The effects of growth substances (Zeranol, Trenbolone) on calf muscle (Pectoralis transversus) has been studied with a recent physical method (thermostimulated current spectroscopy).

This method appeared promising to differentiate meat from calves treated with such hormonal substances. The authors hypothesized that the observed differences between treated and non treated meat deal with protein modification, the nature of which is yet unknown. A complementary work is actually in progress.

Key words : Anabolic substances - Pectoralis transversus - Spectroscopy - Calf muscle.

I. INTRODUCTION

L'utilisation d'hormones anabolisantes en élevage, actuellement interdite en Europe, reste difficile à contrôler en fin de cycle de production, à l'abattoir ou à la consommation. Des anabolisants comme le zéranol ou l'estradiol, associés à l'acétate de trenbolone, laissent peu de résidus et sont difficiles à détecter lorsqu'ils sont correctement utilisés, et demandent des méthodes de dosage extrêmement sensibles (O'KEEFE 1987). L'utilisation classique de l'HPLC (FUKUHARA 1986) dans ce domaine est concurrencée par des méthodes plus souples, comme des systèmes de dosage immunoenzymatique (MEYER 1987).

La mise en évidence des effets des anabolisants sur la composition et la structure des tissus animaux traités n'a pas donné de méthode simple et générale de détection. Ainsi, l'étude des modifications du muscle urétral chez les mâles (WOUK 1986) et les femelles (AMARA 1987) traités respectivement par l'association zéranol + trenbolone ou par des estrogènes apparaît une des rares méthodes applicables en expertise, mais reste d'usage très limité.

L'étude des modifications biochimiques et structurales des viandes est utilisable sur des pièces de découpe, et a pu donner certains résultats, cependant inconstants et dépendant du muscle étudié (KOPP 1984, PATTERSON 1985, CANFIELD 1986, OUALI 1988). Des méthodes plus particulières comme le typage des isomyosines (KOPP 1984, OUALI 1988), l'analyse « conformationnelle » des protéines par enthalpimétrie différentielle et l'étude de l'eau liée par RMN apparaissent prometteuses (OUALI 1988), tout en gardant les mêmes restrictions d'utilisation.

La méthode utilisée ici (spectroscopie par courants thermostimulés) permet d'étudier globalement la polarisation de protéines musculaires et la liaison de l'eau à ces protéines ; sa sensibilité est supérieure à l'enthalpimétrie différentielle que nous avons testée préalablement sur un matériel biologique analogue.

II. MATERIEL ET METHODE

Le *principe* de la spectroscopie par courants thermostimulés (CTS) est le suivant : l'échantillon à étudier est placé entre les plaques d'un condensateur où il est soumis à un champ électrique statique E , à une température T_p et pendant un temps t_p . Le champ électrique appliqué E doit permettre à N dipôles de moment U de s'orienter. L'échantillon peut acquérir une polarisation P_o telle que : $P_o = N \cdot 2/3 \cdot k_p$.

Cette polarisation s'établit avec une constante de temps (TP). Le temps de polarisation doit donc être :

$t_p > 3 T$ (TP) pour que la polarisation P_o soit atteinte. Notons qu'on adopte pour t_p et TP les valeurs minimales pour éviter la formation de charges d'espace qui donneraient des pics CTS supplémentaires susceptibles de polluer le signal intrinsèque. La polarisation est alors gelée en abaissant la température jusqu'à T_o . TP et le champ E est coupé. Le condensateur est alors branché à l'entrée de l'électromètre. Une élévation contrôlée de la température de l'échantillon provoque le retour à l'équilibre des entités polarisables et un courant de dépolarisation est enregistré en fonction du temps et de la température. Des pics CTS seront alors observés : leur position en température est caractéristique des entités polarisables et décrits sous le nom de « modes ».

DISPOSITIF EXPERIMENTAL

La cellule de mesure de CTS est schématisée en (Fig. 1).

Elle comprend en particulier une enceinte étanche 1 qui permet d'établir une atmosphère contrôlée d'Hélium au niveau de l'échantillon. Le condensateur plan 2 est constitué de deux électrodes de forme circulaire qui sont reliées par l'intermédiaire des conducteurs 3 soit à la source de tension lors de la polarisation, soit à l'électromètre (Keithley 642) lors de la dépolarisation.

La température est mesurée par la sonde de platine 4 qui est branchée, avec la sortie de l'électromètre, à l'entrée d'un microordinateur pour l'acquisition du courant en fonction de la température. La résistance 5 assure le chauffage, et la circulation d'azote liquide 6 le refroidissement.

L'enceinte 7 réduit les échanges thermiques extérieurs et maintient un vide secondaire isolant, autour du système de refroidissement et de chauffage.

Le dispositif permet des refroidissements de 40 °C par minute et des réchauffements de 7 °C par minute, dans une gamme de température de -180 °C et 250 °C. Une description plus détaillée du dispositif expérimental a été présentée par SAADAT (1988).

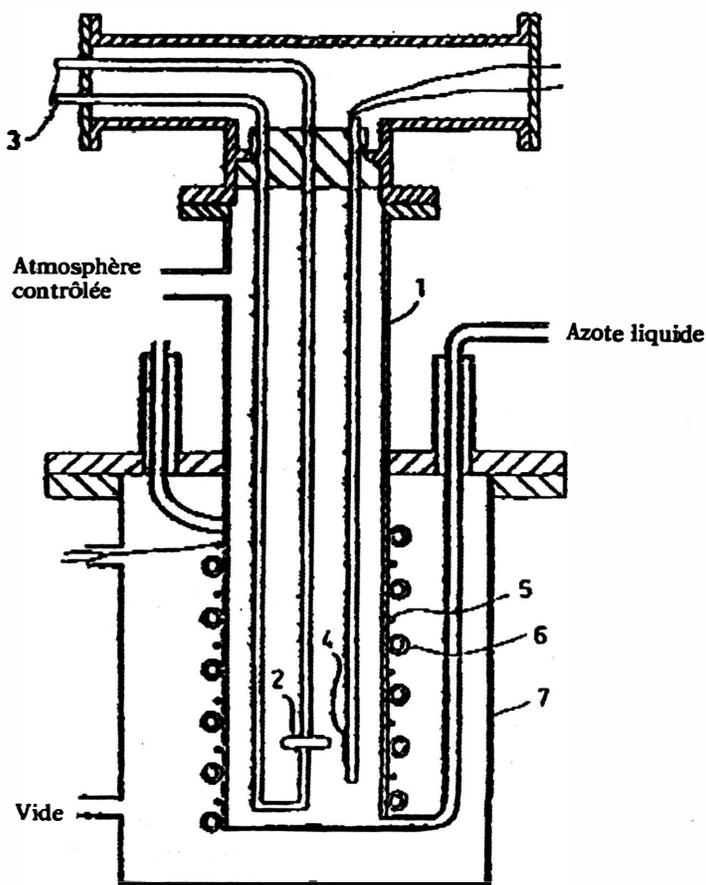


Figure 1 : Schéma de la cellule CTS

MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Des fragments musculaires prélevés dans le muscle Pectoralis transversus de la carcasse de 40 veaux de race Frisonne âgés de quatre mois. Il y avait 20 veaux témoins et 20 veaux implantés avec l'association zéranol (36 mg) et trenbolone (140 mg), 55 jours avant l'abattage.

Les fragments musculaires de 5 g ont été lyophilisés (humidité inférieure à 20 %). La poudre lyophilisée est ensuite comprimée en disques de 8 mm de diamètre et 0,5 mm d'épaisseur.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les deux séries de 20 échantillons (témoins et traités) ont été utilisées. Nous avons observé une bonne reproductibilité des mesures, dans les conditions de polarisation suivantes :

$$E = 8.105 \text{ } \gamma/\text{m} ; TP = - 50 \text{ } ^\circ\text{C} ; t_p = 120 \text{ s.}$$

Nous avons reporté en (Fig. 2) le courant de dépolarisation en fonction de la température T pour les échantillons témoins et traités respectivement.

On distingue dans les deux cas trois pics CTS qui ont été désignés par alpha, bêta, gamma dans l'ordre des températures décroissantes.

Pour faciliter la comparaison des résultats, la conductivité dynamique a été normalisée par $C-1/SE$, où S est la surface de l'échantillon.

Les paramètres adoptés pour caractériser les pics CTS sont les coordonnées de leurs maxima : amplitude de conductivité dynamique et de température T_m ($^\circ\text{C}$).

Le regroupement des résultats est fait dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Les valeurs moyennes de maxima des températures T_m des différents modes ont été établies en effectuant une moyenne des résultats obtenus sur les 20 échantillons étudiés pour chaque série. Compte tenu de l'incertitude sur les valeurs des intensités des pics, nous ne donnons que les valeurs extrêmes des conductivités.

Echantillon témoin	T_m ($^\circ\text{C}$)	Sigma m ($\Omega\cdot\text{m}$) ⁻¹
α	80 ± 5	$2 \cdot 10^{-13} < \sigma_{m\alpha} < 3 \cdot 10^{-12}$
β	25 ± 5	$\sigma_{m\beta} \sigma_{m\alpha} / 2$
γ	$- 100 \pm 10$	$10^{-3} \sigma_{m\alpha} \sigma_{m\alpha} < 10^{-2} m\alpha$
Echantillon traité	T_m ($^\circ\text{C}$)	Sigma m ($\Omega\cdot\text{m}$) ⁻¹
α	35 ± 5	$5 \cdot 10^{-14} < \sigma_{m\alpha} < 3 \cdot 10^{-13}$
β	$- 5 \pm 5$	$\sigma_{m\beta} \sigma_{m\alpha} / 2$
γ	95 ± 5	$10^{-2} \sigma_{m\alpha} < \sigma_{m\gamma} < 10^{-1} \sigma_{m\alpha}$

DISCUSSION ET CONCLUSION

On reconnaît sur les spectres CTS des échantillons témoins et traités trois pics distincts, correspondant aux modes alpha, bêta et gamma (Fig. 2).

Le détail des spectres est donné dans les Fig. 3 et 4.

Des études antérieures portant sur d'autres tissus et protéines permettent de penser que de tels pics correspondent pour chacun d'entre eux à un mode de réorientation des dipôles lors de l'augmentation contrôlée de la température (LAMURE 1983, SAADAT 1988).

En particulier, l'étude de tissus calcifiés (LAMURE 1983, LAMURE 1986) laisse penser que les pics CTS de mode gamma correspondaient à des modifications locales de conformation moléculaire.

Les pics CTS de mode bêta pourraient être associés à une transition « vitreuse » des protéines, dans une gamme de température de 30 °C à — 5 °C, en référence à l'étude de la bêta-lactoglobuline (GENIEYZ 1985).

Enfin, il a été observé que les pics CTS de mode alpha peuvent disparaître si l'échantillon est chauffé au-delà d'une certaine température, qui correspond à la température moyenne de dénaturation d'un grand nombre de protéines (LAMURE 1985, LAMURE 1986) (Fig. 1, courbe A').

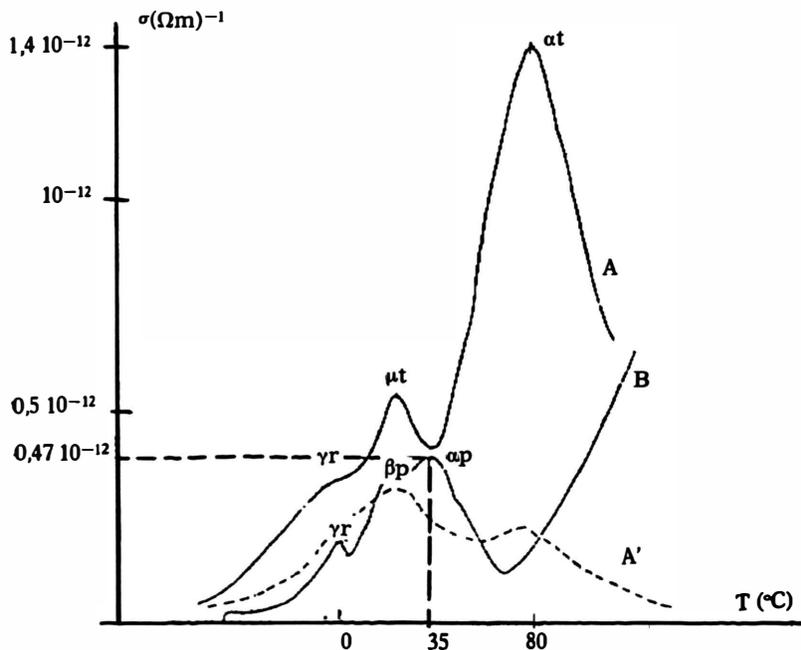


Figure 2 : Essais sur des veaux normaux (A), ayant reçu des anabolisants (B)

E-11 (A)

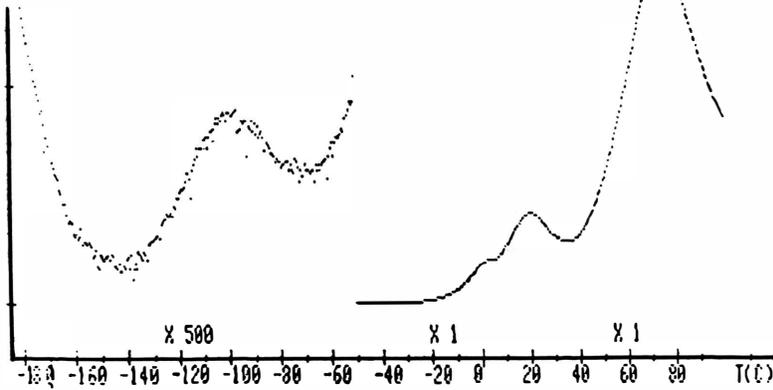


Figure 3 : Spectre CTS de la viande de veau

1 E-12 (A)

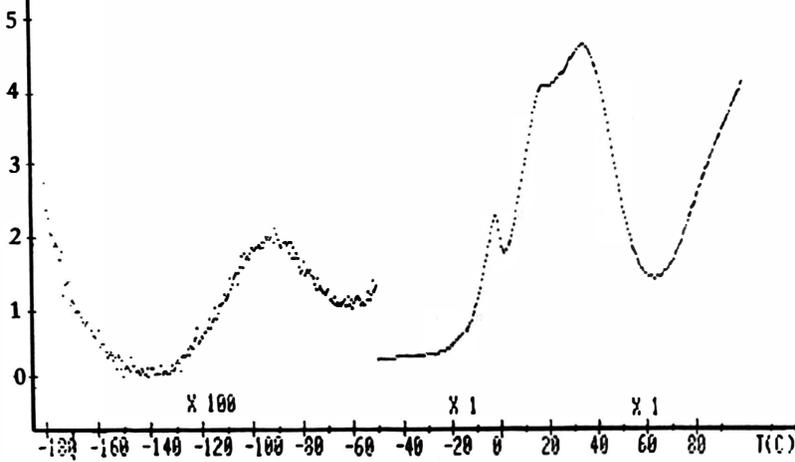


Figure 4 : Spectre de la viande de veau avec anabolisants

Dans cette étude, les trois pics CTS identifiés et appelés alpha, bêta, gamma, semblent devoir être interprétés comme relevant de la polarisation des protéines constitutives des échantillons de muscle étudiés.

Le décalage des maximums des pics CTS en fonction de la température et selon l'origine des échantillons fait apparaître des modifications apparemment liées au traitement hormonal des veaux.

Le pic CTS de mode gamma ne semble pas modifié sur les échantillons ayant subi un traitement hormonal. Par contre, les pics CTS mode bêta et alpha sont profondément modifiés, en faisant apparaître une valeur de Tm inférieure de 30 °C pour le mode bêta et inférieure de 40 °C pour le mode alpha.

En raison des importantes variations d'intensité de ce pic, tant sur les échantillons traités que témoins, l'étude de la relaxation CTS selon le mode alpha nous apparaît prometteuse, quant à son utilité pour détecter des tissus musculaires provenant d'animaux traités aux anabolisants. Une telle détection ne pourra alors se faire que sur des échantillons n'ayant pas subi de traitement thermique trop important, comme en témoigne la Fig. 2, courbe A et A'.

Ces résultats originaux invitent à s'assurer qu'ils pourront être reproduits sur d'autres muscles que le Pectoralis transversus. En effet, les modifications biochimiques ou biophysiques induites par les traitements anabolisants et classiquement décrites sont souvent muscle et âge-dépendant (CANFIELD 1986, AMARA 1987, OUALI 1988).

La nature de ces modifications reste encore à déterminer de façon formelle, et font l'objet d'investigation en cours.

BIBLIOGRAPHIE

- AMARA (A.), SAUTET (J.Y.), VAN HAVERBECKE (G.), CABANIE (P.), MORE (J.), PAVAU (C.) (1987). — Anatomical histochemical and morphometric changes in the musculus urethralis in the female calf under the influence of the association Estradiol-Trenbolone acetate. *Anat. Histol. Embryol.*, 16 (4), 306-319.
- CANFIELD (L.M.), CROSS (H.M.R.), SEARLE (J.W.), DAVY (L.A.) (1986). — Effects of zeranol on lipid composition of beef Longissimus dorsi. *Tex. Agric. Exp. STN. Prog. Rep.*, (4461-4498), 27-28.
- FUKUHARA (K.), MATSUKI (Y.), NAMBARA (T.) (1986). — Determination of zeranol and estradiol in beef by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Food. Hyg. Soc. Jpn*, 27 (5), 517-521.
- GENIYEZ (M.H.) (1985). — Influence du champ électromagnétique sur la conformation de la protéine bêta-lactoglobuline. Thèse de Docteur Ingénieur, ENSAE.
- KOPP (J.), BONNET (M.), ZABARI (M.), RENOU (J.P.), VALIN (C.) (1984). — Influences relatives du sexe et d'un traitement anabolisant sur les caractéristiques du muscle long dorsal de veau. 30th Eur. Meet. of Meat Research Workers. Bristol, 9-14 septembre 1984.
- LAMURE (A.), HITMI (N.), HARMAND (M.F.), MAUREL (E.), PIERRAGGI (M.Th.), LACABANNE (C.) (1983). — Etude du vieillissement du collagène par spectroscopie diélectrique très basse fréquence. *Innov. Techn. Biol. Méd.*, 4, 308-327.
- LAMURE (A.), HITMI (N.), MAUREL (E.), LACABANNE (C.) (1986). — Polarisation phenomena in collagens from various tissues. IEEE, transactions on electrical insulation, EI, 21, 443-447.

-
- MEYER (H.H.D.), HOFFMAN (S.) (1987). — Development of a sensitive micro-titration plate enzyme-immunoassay for the anabolic steroid trenbolone. *Food. Addit. Contamin.*, 4 (2), 149-160.
- O'KEEFFE (M.), HOPKINS (J.P.) (1987). — Survey of residue concentration of the anabolic agents trenbolone acetate FINAPLIX and zeranol RALGRO in beef for the domestic and export market. *Ir. J. Food. Sci. Technol.*, 11 (1), 13-24.
- OUALI (A.), ZABARI (M.), RENOU (J.P.), TOURAILLE (C.), KOPP (J.), BONNET (M.), VALIN (C.) (1988). — Anabolic agents in beef production effects on muscle traits and meat quality. *Meat Sci.*, 24 (3), 151-162.
- PATTERSON (R.L.S.), SALTER (L.J.) (1985). — Anabolic agents and meat quality : a review. *Meat Sci.*, 14, 191-220.
- SAADA (S.) (1988). — Etude de la mobilité moléculaire du collagène par courants thermostimulés. Modélisation du vieillissement cutané. Thèse d'université, Université de Toulouse.
-