

INFLUENCE DU GÈNE RN⁻ SUR LA LOCALISATION INTRACELLULAIRE ET L'ÉVOLUTION *POST MORTEM* DU GLYCOGÈNE DANS LE MUSCLE DE PORC

Marielle ESTRADE (1), C. BAZIN (2), G. MONIN (1), X. VIGNON (1)

(1) I.N.R.A. - Station de Recherches sur la Viande, 63122 Ceyrat.

(2) Pen Ar Lan S.A. - Maxent, 35380 Plélan le Grand.

Le gène RN⁻ provoque une augmentation anormale de la quantité de glycogène intramusculaire. La localisation du glycogène dans des fibres musculaires prélevées avant l'abattage, à 6 h et à 24 h *post mortem* chez des porcs normaux ou porteurs du gène RN⁻ (RN⁻) a été étudiée par microscopie électronique. Un excès de glycogène est observé dans le sarcoplasme des fibres blanches des porcs RN⁻. L'espace cytosolique de ces fibres est nettement augmenté et la taille des myofibrilles est très variable. L'excès de glycogène est conservé aux stades *post mortem*, les particules de glycogène résiduel ont une taille plus importante et une répartition homogène par rapport aux animaux normaux.

L'augmentation du taux de glycogène dans le muscle des animaux RN⁻ est donc liée au métabolisme glucidique du compartiment sarcoplasmique du muscle, elle pourrait être la conséquence d'une distribution anormale des compartiments protéiques ou d'une anomalie mitochondriale comme le suggère la morphologie altérée de ces organites.

Influence of the RN⁻ gene on the intracellular localization and the post mortem evolution of glycogen in pig muscles

The RN⁻ gene is linked to an abnormal increase in muscular glycogen content. The glycogen localization has been studied by electron microscopy in muscle fibers fixed before slaughtering, at 6 h and at 24 h *post mortem* in normal or RN⁻ pigs. A high level of glycogen is observed in the sarcoplasm of white fibers from RN⁻ pigs. The cytosolic space in these fibers is large and the diameter of myofibrils is very variable. In *post mortem* stages, the excess in glycogen is maintained, glycogen particles have a large size and a homogeneous partition as compared with normal animals.

The increase in glycogen content in muscle from RN⁻ animals is therefore related to a modification in the carbohydrates metabolism of the sarcoplasmic compartment, it could be a consequence of an abnormal distribution in the proteic compartments or of a mitochondrial disfunction as suggested by the altered morphology of these organelles.

INTRODUCTION

En 1986, NAVEAU postulait l'existence d'un gène majeur, dominant, appelé RN⁻, augmentant la quantité de glycogène musculaire et diminuant notablement le rendement de cuisson de la viande de porc. La présence du gène RN⁻ chez l'animal vivant peut être testée par prélèvement par biopsie d'un fragment musculaire sur lequel est dosé le potentiel glycolytique. D'une part, cette méthode a l'inconvénient d'être longue et laborieuse, d'autre part le potentiel glycolytique d'un animal donné varie avec les conditions d'environnement. Une meilleure connaissance du mécanisme qui provoque la surcharge en glycogène dans les cellules musculaires pourrait conduire à la mise en oeuvre d'un test d'identification plus fiable.

Dans la cellule musculaire, le glycogène est localisé dans le sarcoplasme et les lysosomes. Ces deux compartiments cellulaires présentent des métabolismes différents. L'étude par microscopie électronique a pour but de déceler le compartiment affecté par l'excès de glycogène et de comparer l'évolution de ce composé au cours de la glycogénolyse *post mortem* chez des animaux normaux et porteurs du gène RN⁻ (notés par la suite RN).

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Les animaux

Le potentiel glycolytique musculaire a été déterminé sur un groupe de 25 porcs issus d'une population de où la présence du gène RN⁻ a été précédemment démontrée (LEROY et al, 1989). Quatre animaux de phénotype RN⁻ (potentiel glycolytique de 299 à 328 $\mu\text{mol/g}$ de muscle frais) et quatre animaux normaux (potentiel glycolytique de 161 à 179 $\mu\text{mol/g}$ de muscle frais) ont été retenus pour cette étude.

1.2. Les prélèvements et la préparation des échantillons

Des biopsies de muscle *Longissimus dorsi* (LD) ont été réalisées juste avant l'abattage des animaux. Dix à 15 min après l'abattage, 200 g de LD sont prélevés et gardés à température ambiante pendant 4 h, puis à 4°C pendant 24 h. Les biopsies et des prélèvements effectués sur les 200 g de muscle à 6 h et 24 h *post mortem* sont coupés en blocs de 3 à 5 mm de côté et 1 cm de longueur, puis sont plongés dans une solution de glutaraldéhyde à 3% dans du tampon cacodylate de sodium 0,15 M pH 7,4 pendant 30 min à température ambiante, puis pendant 4 h à 4°C.

Les échantillons sont recoupés en blocs de 1 mm³ et post-fixés dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 1% dans du tampon cacodylate. Les blocs fixés sont déshydratés dans des bains d'alcool de degré croissant puis enrobés et inclus dans une résine époxy (TAAB). Les coupes ultrafines transversales et longitudinales de 70 à 80 nm d'épaisseur sont récupérées sur grilles en or.

Les particules de glycogène sont colorées sur coupe par la technique à l'acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (PATAg) (THIERY et RAMBOURG, 1974). Les coupes sont traitées à l'acide périodique (20 min), les fonctions aldéhydes des sucres sont ensuite visualisées par le thiocarbohydrazide (40 min) et le protéinate d'argent (30 min). Des témoins sont réalisés en parallèle où l'acide périodique est remplacé par l'eau oxygénée. Les observations ont été réalisées sur un

microscope Philips EM 400 sous une tension d'accélération de 80 KV.

2. RÉSULTATS

Par la coloration PATAg, les complexes glycogène-protéine apparaissent sous forme de particules denses aux électrons visibles dans toutes les fibres fixées après biopsie.

2.1. Le glycogène dans les fibres musculaires avant l'abattage.

La localisation des particules est intracellulaire, principalement subsarcolemmale et intermyofibrillaire. Le glycogène apparaît libre ou accumulé dans des lysosomes, sa répartition est homogène. Chez les animaux normaux, le glycogène intermyofibrillaire est localisé le long des myofibrilles dans un espace étroit et régulier (Fig. 1a). La densité des particules est moindre que chez les animaux RN⁻, où les espaces intermyofibrillaires sont larges et totalement remplis de glycogène (Fig. 1b). Une faible proportion de glycogène est observée dans les myofibrilles, de part et d'autre des stries Z et au niveau de la bande A ; les particules sont disposées longitudinalement, entre les myofilaments.

Deux points particuliers sont à noter chez les animaux RN⁻ : il apparaît de nombreuses vésicules intermyofibrillaires et les mitochondries des fibres blanches ont un aspect anormal (Fig. 1b et 2a). Ces mitochondries renferment parfois des particules de glycogène et la disposition des crêtes est altérée (Fig. 2b).

Les fibres rouges des porcs normaux et RN⁻ sont d'aspect semblable (Fig. 3a et 3b). Les espaces intermyofibrillaires sont réguliers et de dimension similaire. La densité des particules semble plus élevée dans le cas des animaux RN⁻. Les fibres blanches des animaux normaux présentent un espace sarcoplasmique étroit, régulier et totalement rempli de glycogène (Fig. 4a). Par contre, dans les fibres blanches des animaux RN⁻, les espaces intermyofibrillaires sont très larges, irréguliers remplis de glycogène (Fig. 4b). La taille des myofibrilles est très variable.

2.2. Évolution du glycogène après l'abattage

A 6 h *post mortem*, une partie du glycogène est dégradée, les particules sont moins nombreuses dans les fibres musculaires de tous les animaux.

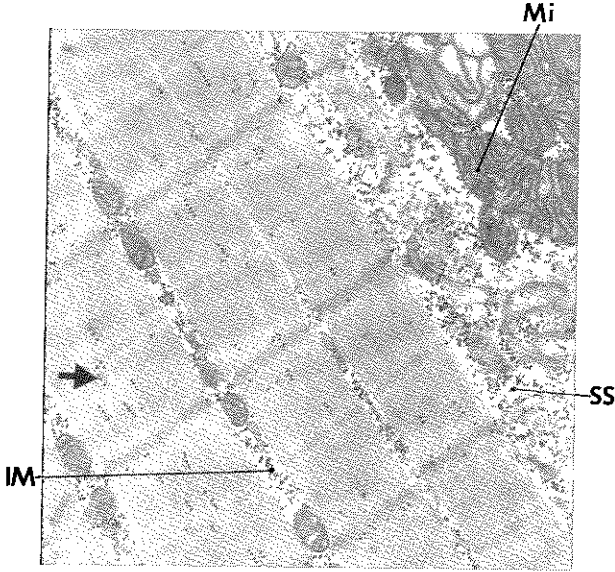
Chez les animaux normaux, une forte diminution du glycogène est constatée, les particules résiduelles sont groupées en amas, accolées à des structures cytosquelettiques et membranaires (stries Z, mitochondries, vésicules) (Fig. 5a). La quantité de glycogène présent chez les animaux RN⁻ reste très élevée, la répartition des particules de glycogène est encore homogène. Au niveau des myofibrilles, les particules sont groupées de chaque côté des stries Z (Fig. 5b). A 24 h *post mortem*, les mitochondries sont dégradées dans toutes les fibres. La membrane plasmique est rompue et des particules de glycogène sont libérées dans l'espace extracellulaire (fig. 6a).

Chez les animaux normaux, les particules de glycogène intracellulaire semblent rattachées aux structures (stries Z, mitochondries) (Fig. 6a). Le glycogène chez les animaux RN⁻ reste en quantité importante. Des amas de glycogène très denses sont localisés sous le sarcolemme (Fig. 6b).

Figure 1 - Coupes longitudinales de Long dorsal fixé après biopsie (x 20.000).

Les particules denses aux électrons correspondent au glycogène.

1a - Muscle de porc normal, les particules de glycogène sont essentiellement localisées dans les espaces intermyofibrillaires (IM) et subsarcolemmale (SS). Quelques particules sont entre les myofilaments.



1b - Muscle de porc RN⁺. Noter la forte densité des particules de glycogène. De nombreuses vésicules sont visibles dans les espaces intermyofibrillaires (V).

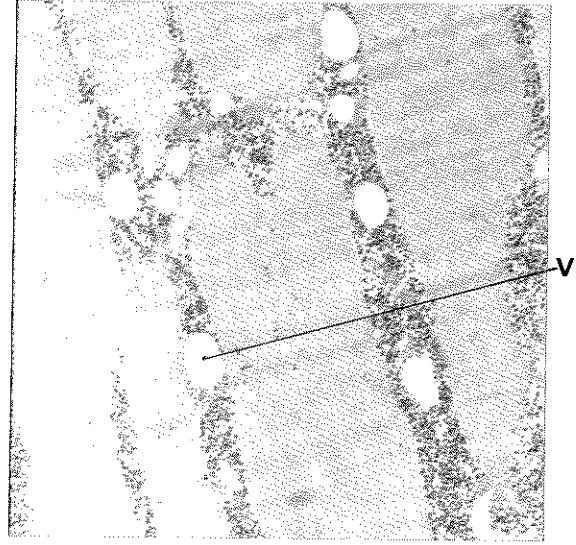
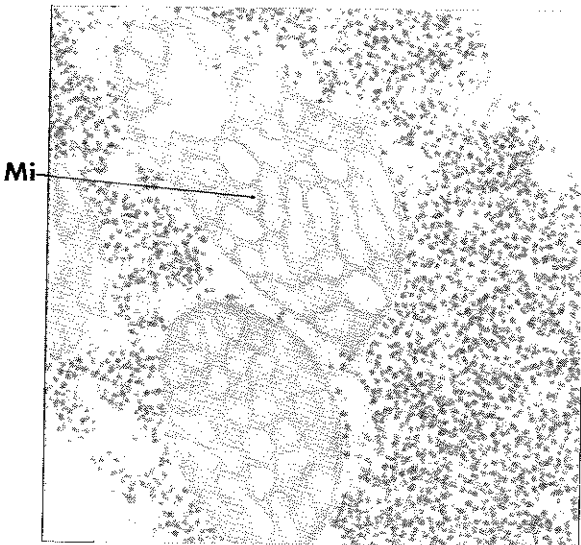


Figure 2 - Anomalies mitochondriales observées dans des fibres blanches de porcs RN⁺ (x 44.000).

2a - Les crêtes mitochondriales forment un réseau anastomosé.



2b - Des particules de glycogène apparaissent dans une vésicule à l'intérieur d'une mitochondrie.

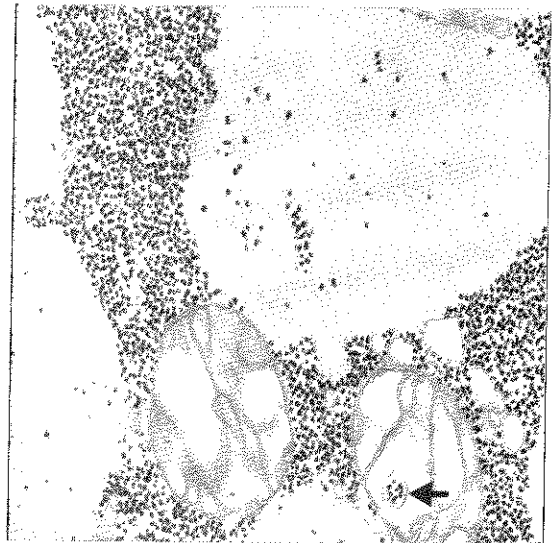
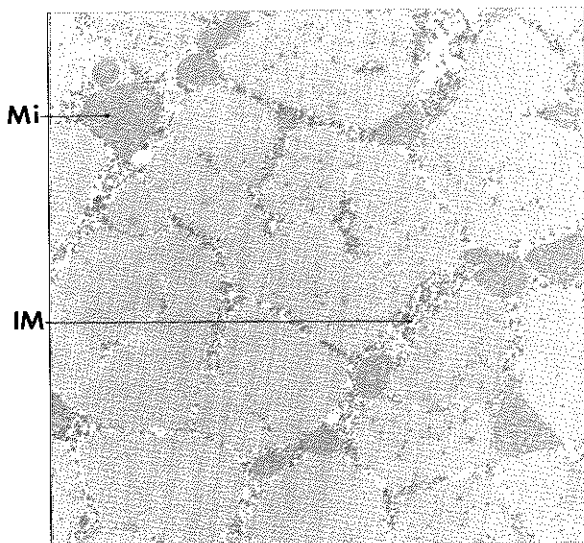


Figure 3 - Coupes transversales de fibres rouges fixées après biopsie (x 12.500).

Les espaces intermyofibrillaires sont réguliers et peu larges (IM).

3a -- Muscle de porc normal.



3b - Muscle de porc RN⁺, la densité des particules de glycogène est légèrement plus élevée que dans le cas précédent.

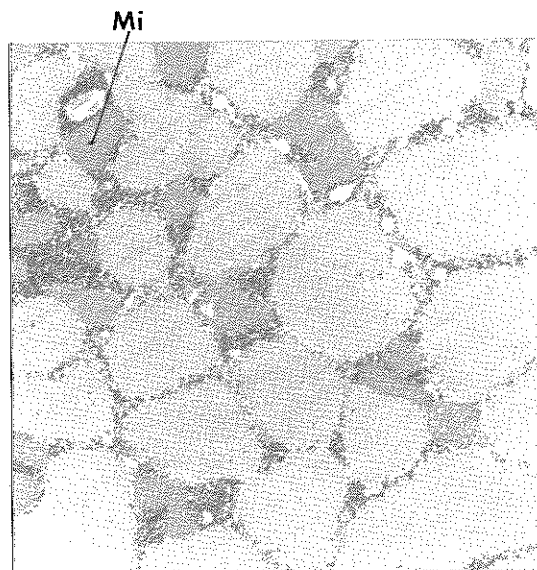
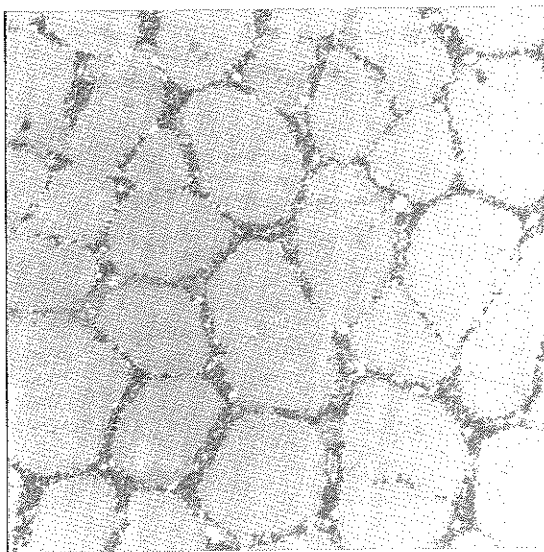


Figure 4 - Coupes transversales de fibres blanches fixées après biopsie (x 12500).

Noter la différence morphologique des fibres entre les animaux normaux et RN⁺

4a - Muscle de porc normal..



4b - Muscle de porc RN⁺, les espaces intermyofibrillaires remplis de glycogène sont irréguliers et très larges (IM).

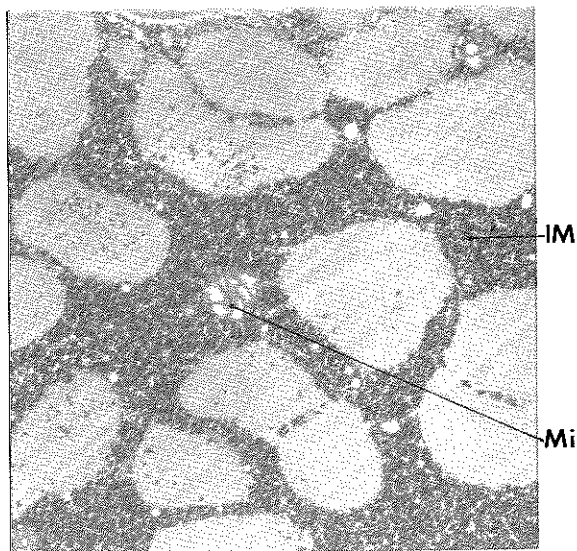
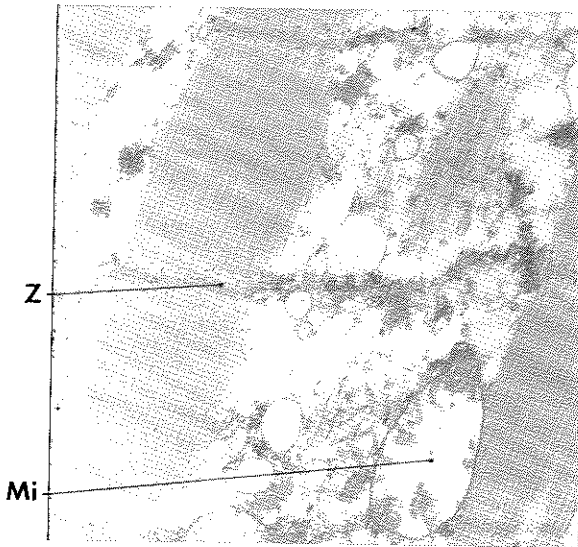


Figure 5 - Coupes longitudinales de fibres blanches fixées à 6 heures *post mortem* (x 20.000).

5a - Muscle de porc normal, le glycogène résiduel est groupé en amas rattachés aux structures : mitochondries (Mi), stries Z (Z).



5b - Muscle de porc RN⁺, les espaces intermyofibrillaires sont toujours remplis de glycogène (IM). La répartition reste homogène. Dans le sarcoplasme, on note la présence de particules de glycogène accumulées dans des lysosomes (Ly). Au niveau des myofibrilles, des particules sont groupées de part et d'autre de la strie Z (Z).

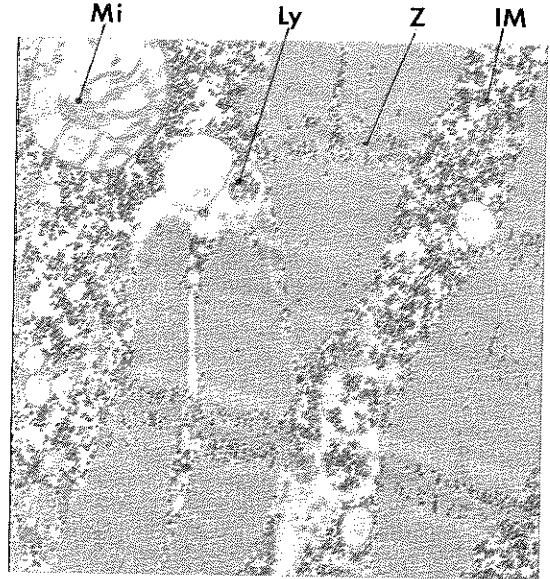
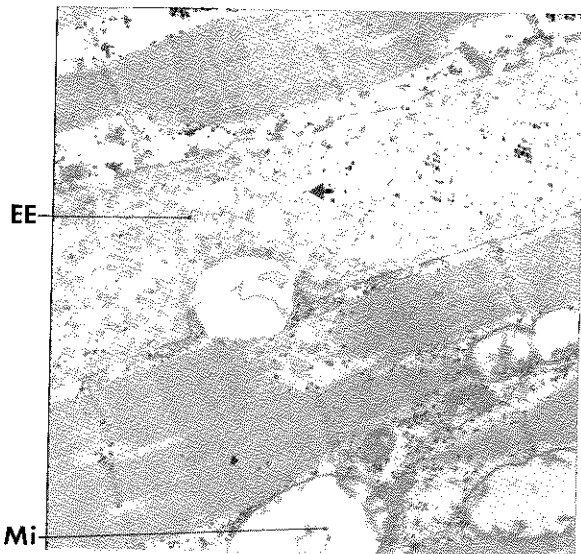
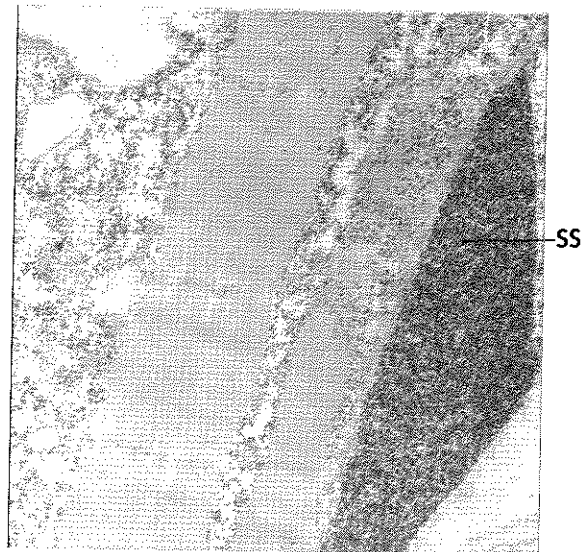


Figure 6 - Coupe longitudinale de fibres blanches fixées à 24 heures *post mortem* (x 20.000).

6a - Muscle de porc normal, la membrane sarcoplasmique est rompue et des particules de glycogène sont libérées dans l'espace extracellulaire (EE).



6b - Muscle de porc RN⁺, des amas de glycogène subsarcolemmal semblent ne pas avoir été touchés par la glycogénolyse *post mortem*.



3. DISCUSSION

La première constatation importante est que la différence du taux de glycogène entre les animaux normaux et RN⁻ est observée de manière plus marquée dans les fibres blanches que dans les fibres rouges. Cette observation concorde avec les résultats de MONIN et al (1987) qui ont montré que l'excès de glycogène est d'autant plus marqué que le caractère blanc du muscle est prononcé. Néanmoins chez les animaux RN⁻, quelques fibres rouges présentent une densité plus élevée que celle observée chez les animaux normaux.

Le deuxième point est que l'excès de glycogène dans les fibres blanches des animaux RN⁻ est sarcoplasmique et non lysosomal et s'accompagne d'une ultrastructure particulière des fibres. Les espaces sarcoplasmiques remplis de glycogène sont larges et irréguliers. La taille des myofibrilles est très variable. Nos résultats ne nous permettent pas de conclure si l'excès de glycogène observé dans les fibres blanches est du à une augmentation de la concentration du glycogène dans le sarcoplasme ou à une augmentation de la taille du compartiment sarcoplasmique. Dans le premier cas, il existerait un défaut de synthèse ou de régulation de l'accumulation du glycogène. Dans la deuxième hypothèse, l'anomalie serait dans la distribution des compartiments protéiques intracellulaires.

GEDDES et al (1986) ont montré que la dégradation du glycogène musculaire *post mortem* est très hétérogène, elle est fonction du poids moléculaire des particules. Le glycogène de haut poids moléculaire est dégradé préférentiellement. Au cours de la glycogénolyse *post mortem*, les premières réserves apparemment mobilisées sont celles constituées par le glycogène intra- et intermyofibrillaire, elles correspondent aux réserves utilisées dans le muscle pendant un exercice (FRIDEN et al, 1989). La glycogénolyse aboutit ainsi à une répartition très hétérogène des particules de glycogène résiduel, celles ci

correspondraient au glycogène de bas poids moléculaire rattaché aux structures, comme cela est observé chez les animaux normaux à partir de 6 h *post mortem*. L'évolution est différente chez les animaux RN⁻, le glycogène résiduel présente une localisation intermyofibrillaire pratiquement homogène. Cette différence dans l'évolution des réserves glucidiques *post mortem* pourrait s'expliquer soit par la présence initiale d'une forte proportion de glycogène à haut poids moléculaire qui n'est pas totalement dégradé, celui-ci masquant alors le glycogène de faible poids moléculaire, soit par une répartition différente des particules de glycogène suivant leur poids moléculaire. A 24 h *post mortem* des plages de glycogène très denses persistent dans les régions subsarcolemmales. Ces régions semblent ne pas avoir été touchées par la glycogénolyse pour des raisons inconnues.

Il faut noter enfin que les observations au microscope ont mis en évidence d'autres anomalies dans les fibres musculaires blanches des animaux RN⁻. Ainsi de nombreuses petites vésicules et des anomalies mitochondriales telles que des particules de glycogène intramitochondriales, mais aussi une organisation anormale des crêtes sont fréquemment visibles dans ces fibres. De telles anomalies mitochondriales ont déjà été observées dans certaines pathologies musculaires et sont liées à des défauts du métabolisme énergétique qui produisent également une accumulation de glycogène (MORGAN-HUGHES, 1982 ; COQUET, 1991).

En conclusion, l'excès de glycogène dans les fibres blanches des muscles de porcs RN⁻ présente une localisation sarcoplasmique. Les lysosomes ne semblent pas impliqués dans l'anomalie. D'autres études sont actuellement en cours pour déterminer si celle-ci est attribuable à un défaut du métabolisme du glycogène, à une distribution anormale des compartiments protéiques ou à un défaut du métabolisme mitochondrial.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COQUET M., 1991, Colloque Franco-Ibérique de Microscopie Electronique, Barcelone, 45.
- FRIDEN J., SEGER J., EKBLOM B., Acta Physiol. Scand., 1989, 135, 381.
- GEDDES R., 1986, Bioscience Reports, 6, 415.
- LEROY P., NAVEAU J., ELSSEN J.M., 1989, 40^e Ann. Meet. EAAP, GP.39, Dublin.
- MONIN G., MEJENES-QUIJANO A., TALMANT A., SELLIER P., 1987, Meat Science, 149.
- MORGAN-HUGHES J.A., 1982, In "Skeletal Muscle Pathology", MASTAGLIA F.L. and WALTON J. eds, 309.
- NAVEAU J., 1986, Journées Rech. Porcine en France, 18, 265-276.
- THIERY J-P., RAMBOURG A., 1974, J. Microscopie, 21, 225.