

ÉCOLE DOCTORALE
Mécanique, Thermique et Génie Civil
DE NANTES

2005

Thèse de DOCTORAT

Discipline : Thermique, Énergétique et Génie des Procédés
Spécialité : Génie des Procédés

Présentée et soutenue publiquement par
CHÉRET Romuald

le 14 Octobre 2005

à l'École Nationale d'Ingénieurs des Techniques
des Industries Agricoles et Alimentaires

**EFFET DES HAUTES PRESSIONS SUR LES INDICATEURS DE
MATURATION DE LA
VIANDE ET D'ALTÉRATION DU MUSCLE DE POISSON**

Jury

Mme Dumay E., Maître de Conférences, HDR, Université Montpellier II, Montpellier (Rapporteur)
Mr Fauconneau B., Directeur de Recherches, Président du Centre INRA de Bordeaux Aquitaine, Villenave-
d'Ornon (Rapporteur)
Mr Fleurence J., Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Nantes (Président)
Mr Ghoul, Professeur, ENSAIA, Vandoeuvre les Nancy (Examinateur)
Mme Verrez-Bagnis V., Cadre de recherche, HDR, IFREMER, Nantes (Directrice de Thèse)
Mme de Lamballerie-Anton M., Maître de Conférences, HDR, ENITIAA, Nantes (Co-encadrante)
Mme Delbarre-Ladrat C., Cadre de recherche, IFREMER, Nantes (Co-encadrante)

Laboratoires :

ENITIAA

Département de Génie des Procédés Alimentaires
GEPEA - UMR CNRS 6144
Rue de la Géraudière - BP 82225
44 322 NANTES cedex 03

IFREMER

Département Sciences et
Techniques Alimentaires Marines
Rue de l'Île d'Yeu - BP 21105
44311 NANTES Cedex 03

N° ED 0367-192

« *Recommencer, ce n'est pas refaire.* »

César

Sculpteur français, né en 1921

Extrait d'une interview dans *Opus International* (1990)

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le département de Génie de Procédés Alimentaires de l'ENTITIAA de Nantes et dans le département de Sciences et Techniques Alimentaires Marines de l'IFREMER de Nantes sous la direction de Madame Véronique Verrez-Bagnis, Cadre de recherche à l'IFREMER de Nantes, et coencadré par Madame Marie de Lamballerie-Anton, Maître de Conférences à l'ENTITIAA de Nantes et par Madame Christine Delbarre-Ladrat, Cadre de recherche à l'IFREMER de Nantes. Je leur exprime toute ma gratitude pour m'avoir guidé dans mon travail de recherche avec rigueur, patience et bonne humeur et pour la confiance qu'elles m'ont témoignée au cours de ces trois années.

J'exprime mes remerciements à Madame Eliane Dumay, Maître de Conférences à l'Université de Montpellier et Monsieur Benoit Fauconneau, Président du centre INRA de Bordeaux, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également Monsieur Mohamed Ghoul, Professeur à l'ENSAIA de Nancy et Monsieur Joël Fleurence, Professeur à l'Université de Nantes d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Patrick Durand d'avoir accepté d'occuper la fonction de directeur de thèse par interim au début de mon projet.

Je remercie Sylviane Delepine pour son aide précieuse, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie Nico avec qui j'ai eu plaisir de partager le bureau pendant ces trois années et aussi aux colocataires qui se sont succédés et plus particulièrement Pablo.

Je remercie également Arancha avec qui j'ai pris plaisir à travailler pendant trois mois.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du personnel du département de Génie des Procédés Alimentaires et de la Halle de Technologie de l'ENTITIAA de Nantes et le personnel des départements de Sciences et Techniques Alimentaires Marines et de Biotechnologies et Molécules Marines de l'IFREMER de Nantes.

Il m'est également agréable de remercier Monsieur Reinhard Lange pour m'avoir accepté dans son laboratoire pendant quelques jours pour y réaliser des manipulations.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour tous leurs encouragements et pour m'avoir supporté et mes amis pour m'avoir changé les idées.

Sommaire

Abréviations, Acronymes et Unités	→p. 1-2
Liste des figures et des tableaux	→p. 3-7
Introduction	→p. 8-10
Bibliographie	→p. 11-72

1. Les hautes pressions	→p. 11
1.1. La pression : définition	→p. 11
1.2. L'histoire des hautes pressions	→p. 11
1.3. Mode d'action des hautes pressions	→p. 12
1.4. Les modes d'application	→p. 14
1.4.1. La compression directe	→p. 14
1.4.2. La compression indirecte	→p. 15
1.5. L'application du procédé dans l'industrie agro-alimentaire	→p. 16
1.5.1. Les réglementations	→p. 16
1.5.2. Le développement dans le monde	→p. 17
1.5.3. Les produits commercialisés	→p. 17
1.5.4. Les limites de ce procédé	→p. 22
1.5.6. Les fournisseurs d'enceintes hautes pressions	→p. 24
1.6. L'effet des hautes pressions sur les systèmes biologiques	→p. 24
1.6.1. Sur l'eau	→p. 24
1.6.1.1. Modification des propriétés de l'eau sous hautes pressions	→p. 25
1.6.1.2. Diagramme des différentes phases de l'eau	→p. 26
1.6.1.3. La congélation par relâchement rapide de la pression	→p. 26
1.6.1.4. La décongélation sous hautes pressions	→p. 27
1.6.2. Sur les protéines	→p. 27
1.6.2.1. Effet sur les principales interactions	→p. 27
1.6.2.2. Effet sur la structure	→p. 27
1.6.2.3. Effet des hautes pressions sur les fonctions des protéines	→p. 28
1.6.3. Sur les lipides	→p. 30
1.6.4. Sur les glucides et les polysaccharides	→p. 30
1.6.5. Sur les vitamines	→p. 31
1.6.6. Sur les micro-organismes	→p. 31
1.6.6.1. Les formes végétatives des bactéries	→p. 32
1.6.6.2. Les spores bactériennes	→p. 32
1.6.6.3. Les levures et les moisissures	→p. 33
1.6.7. Les virus	→p. 33
1.6.8. Sur l'ADN et les interactions ADN/protéines	→p. 33
1.7. L'effet des hautes pressions sur les emballages	→p. 33
1.8. Les risques potentiels du procédé hautes pressions	→p. 34

2. Caractéristiques des muscles	→p. 34
2.1. Le muscle squelettique	→p. 34
2.1.1. La composition du muscle strié squelettique	→p. 34
2.1.2. La structure histologique du muscle	→p. 35
2.1.3. L'ultrastructure du système contractile	→p. 37
2.2. Les protéines du muscle squelettique	→p. 38
2.2.1. Les protéines du tissu conjonctif	→p. 38
2.2.2. Les protéines myofibrillaires	→p. 40
2.2.3. Les protéines régulatrices	→p. 41
2.2.4. Les protéines du cytosquelette	→p. 41
2.2.4.1. Les filaments intermédiaires	→p. 42
2.2.4.2. Les filaments longitudinaux	→p. 42
2.2.4. Les protéines sarcoplasmiques	→p. 43
2.3. Le poisson : particularités de la structure des différents muscles et du tissu conjonctif	→p. 43
2.3.1. Les différents muscles	→p. 44
2.3.2. Le tissu conjonctif	→p. 45
3. La transformation du muscle en viande	→p. 45
3.1. Les différentes phases	→p. 45
3.2. Mécanismes impliqués dans le processus de maturation	→p. 46
3.2.1. Les mécanismes physico-chimiques	→p. 47
3.2.2. Mécanismes enzymatiques	→p. 48
3.3. Les techniques permettant d'améliorer ou d'écourter le temps de maturation	→p. 49
3.4. Le bovin : le modèle d'étude	→p. 52
4. L'évolution de la chair de poisson après la capture	→p. 53
4.1. Les différentes phases	→p. 53
4.2. Mécanismes physico-chimiques	→p. 54
4.3. Mécanismes enzymatiques	→p. 54
4.4. Le bar : le modèle d'étude	→p. 55
5. Les différents systèmes protéolytiques responsables de la dégradation des protéines myofibrillaires	→p. 55
5.1. Le système calpaïque	→p. 56
5.1.1. Les calpaïnes ubiquitaires	→p. 57
5.1.2. La calpastatine	→p. 59
5.1.3. Les différents rôles du calcium	→p. 60
5.1.4. Autres activateurs	→p. 63
5.2. Les enzymes lysosomales	→p. 64
5.2.1. Les protéases à acide aspartique	→p. 65
5.2.2. Les endopeptidases à cystéine	→p. 66
5.3. Le protéasome	→p. 66
5.3.1. Sa structure et les différents isoformes	→p. 67
5.3.2. Les fonctions physiologiques	→p. 68
5.4. Le rôle des protéases dans la dégradation <i>post-mortem</i> du muscle de poisson et dans la viande	→p. 68

5.4.1. Dans le muscle de poisson	→p. 68
5.4.2. Dans la viande	→p. 69
6. Effet des hautes pressions sur les enzymes de dégradation de la viande et du poisson	→p. 70
6.1. Le système calpaïque	→p. 71
6.2. Le système lysosomal	→p. 71
Matériels & Méthodes	→p. 73-95
1. Le matériel animal	→p. 73
1.1. Le bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	→p. 73
1.2. Le bœuf (muscle <i>Biceps femoris</i>)	→p. 73
1.3. Les conditions de stockage	→p. 73
2. La préparation des extraits de protéines	→p. 74
2.1. L'extraction des protéines sarcoplasmiques de muscle de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	→p. 74
2.2. L'extraction des myofibrilles du muscle de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	→p. 74
2.3. L'extraction des protéines sarcoplasmiques du muscle de viande (<i>Biceps Femoris</i>)	→p. 74
2.4. L'extraction des myofibrilles du muscle de bovin (<i>Biceps femoris</i>)	→p. 74
2.5. Préparation d'une solution de caséine à 4%	→p. 76
3. Caractérisations biochimiques et physico-chimiques des protéines	→p. 76
3.1. Dosage des protéines	→p. 76
3.1.1. Dosage protéique par la méthode du Biuret	→p. 76
3.1.2. Le dosage protéique par une méthode dérivée de la méthode de Bradford	→p. 76
3.2. Mesure de pH	→p. 77
4. Le procédé hautes pressions	→p. 77
4.1. Les caractéristiques du pilote hautes pressions	→p. 77
4.2. Le mode opératoire	→p. 79
5. La méthode de purification et de séparation des calpaïnes et de la calpastatine : chromatographie d'interaction hydrophobe	→p. 80
5.1. Le principe de la chromatographie d'interactions hydrophobes	→p. 80
5.2. Le protocole de chromatographie d'interactions hydrophobes	→p. 82
6. La méthode de purification et de séparation des différentes calpaïnes : chromatographie échangeuses d'anions	→p. 82
6.1. Le principe de la chromatographie échangeuse d'anions	→p. 82
6.2. Le protocole de chromatographie échangeuse d'anions	→p. 83
7 Les dosages des activités enzymatiques	→p. 83
7.1. Le dosage de l'activité des calpaïnes	→p. 83
7.2. Le dosage de l'activité des cathepsines B, H et L	→p. 84
7.3. Le dosage de l'activité de la cathepsine D	→p. 84

7.4. Le dosage de l'activité de la phosphatase acide	→p. 85
7.5. Le dosage de l'activité inhibitrice de la calpastatine	→p. 85
7.6. Le dosage de l'activité des calpaïnes de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) sous pression	→p. 85
8. Les techniques électrophorétiques	→p. 86
8.1. Le SDS-PAGE	→p. 86
8.2. La méthode du zymogramme	→p. 88
9. Autre technique biochimique : mesure de l'hydrophobie de surface des protéines	→p. 89
10. L'analyse de la microstructure	→p. 89
11. La mesure colorimétrique	→p. 91
11.1. Le principe	→p. 91
11.2. La préparation des échantillons	→p. 92
11.3. La mesure de la couleur	→p. 92
12. La mesure d'exsudation	→p. 92
13. La mesure de la capacité de rétention d'eau	→p. 92
14. La mesure de texture	→p. 93
15. L'analyse microbiologique	→p. 95
15.1. Préparation des échantillons	→p. 95
15.2. L'ensemencement et le dénombrement	→p. 95
Résultats & Discussions	→p. 96-152
1. Études préliminaires	→p. 96
1.1. L'effet du vide sur l'activité des enzymes	→p. 96
1.2. Séparation des calpaïnes de leur inhibiteur, la calpastatine dans le muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) et dans le muscle bovin (<i>Biceps femoris</i>)	→p. 97
2. Comparaison de l'activité des enzymes entre la viande et le poisson	→p. 99
3. Effet de la pression sur l'activité des enzymes protéolytiques	→p. 103
3.1. Choix des hautes pressions	→p. 103
3.2. Effet de la pression sur les calpaïnes	→p. 103
3.2.1. L'effet de la pression sur les calpaïnes présentes dans le muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) et dans le muscle de bovin (<i>Biceps femoris</i>)	→p. 103
3.2.2. L'activité des calpaïnes de muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) sous pression	→p. 106
3.2.3. Modification structurale des calpaïnes de muscle de bar après un traitement par hautes pressions	→p. 107
3.2.4. Effet du traitement par hautes pressions sur l'hydrophobie de surface des	→p. 109

protéines sarcoplasmiques	
3.3. Effet de la pression sur les enzymes lysosomales	→p. 111
3.3.1. La phosphatase acide	→p. 111
3.3.2. La cathepsine D	→p. 114
3.3.3. Les cathepsines B, H et L	→p. 115
4. Effet de la pression et du temps sur l'activité enzymatique des protéases et sur les protéines du muscle de poisson	→p. 119
4.1. Déroulement de l'expérimentation	→p. 119
4.2. Évolution de l'activité des calpaïnes et de la calpastatine au cours du temps de stockage et en fonction du traitement hautes pressions	→p. 121
4.2.1. Les calpaïnes	→p. 121
4.2.2. La calpastatine	→p. 122
4.3. Évolution de l'activité des cathepsines après stockage et en fonction du traitement hautes pressions	→p. 123
4.3.1. La cathepsine D	→p. 123
4.3.2. Les cathepsines B, H et L	→p. 125
4.4. Analyse des dégradations des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires au cours du stockage à 4°C selon les différents traitements par hautes pressions	→p. 127
4.4.1. Les protéines sarcoplasmiques	→p. 127
4.4.2. Les protéines myofibrillaires	→p. 129
5. Effet de la pression et du temps sur la texture, la couleur et la micro-structure du muscle de poisson	→p. 131
5.1. Effet de la pression et du stockage sur l'exsudation	→p. 131
5.2. Effet de la pression et du stockage sur la capacité de rétention en eau (Water Holding Capacity)	→p. 132
5.3. Effet des hautes pressions sur la texture	→p. 133
5.4. Effet des hautes pressions sur la couleur	→p. 136
5.5. Effet de la pression sur l'évolution de la flore au cours du stockage	→p. 139
5.6. Effet des hautes pressions sur la micro-structure	→p. 140
6. Modifications <i>post-mortem</i> des protéines de muscle de viande	→p. 143
6.1. Modifications <i>post-mortem</i> des protéines sarcoplasmiques selon différentes pressions	→p. 143
6.2. Modifications <i>post-mortem</i> des protéines myofibrillaires selon différentes pressions	→p. 145
6.3. Activité des protéases du muscle de viande à 4°C	→p. 146
6.4. Effet des protéases calcium dépendantes sur les protéines myofibrillaires bovines	→p. 148
6.4.1 Purification des calpaïnes et identification	→p. 148
6.4.2. Effet protéolytique de la m-calpaïne sur des protéines myofibrillaires	→p. 150
Conclusion & Perspectives	→p. 153-156
Références bibliographiques	→p. 157-174
Articles & Communications	→p. 175-176

Abréviations, Acronymes et Unités

Liste des abréviations et des symboles

a*	indice de rouge-vert (système L* a* b*)
AMC	7-Amino-4-MéthylCoumarin
ANS	8-Anilino-1-Naphthalène Sulfonate
Arg	arginine
b*	indice de jaune-bleu (système L* a* b*)
BCA	Acide BicinChoninique
BSA	Bovine Sérum Albumine (ou albumine de sérum bovin)
C*	chroma (saturation)
Ca ²⁺	ion calcium
CaCl ₂	dichlorure de calcium
CFU	Colony Forming Unit (ou unité formant une colonie)
CHAPS	3-[(3-CHolamidopropyl)dimethylAmmonio]-1-PropaneSulfonate
CIE	Commission International de l'Eclairage
DEAE	DiEthylAminoEthyl
DMSO	DiMethyl SulfOxide
DTT	DL-DiThioThreitol
DO	Densité Optique ou absorbance
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetique Acid
EGTA	Ethylène Glycol-bis((2 amino-ethyl)ether) Tetraacetique Acid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (ou chromatographie liquide basse pression)
FU	Fluorescence Unit (ou unité de fluorescence)
g	accélération de la pesanteur (9,81 m/s ²)
J0	jour 0 (jour de mort)
Jx	nombre de jours après la mort
L*	clarté (système L* a* b*)
Leu	leucine
milliQ	eau ultra pure
pH	potentiel Hydrogène
Phe	phenylalanine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TCA	TriChloroacetique Acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TPA	Texture Profile Analysis
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tyr	tyrosine
Val	valine
WHC	Water Holding Capacity (ou capacité de rétention d'eau)

Liste des unitésUnités de volume :

l	litre
ml	millilitres (10^{-3} l)
μ l	microlitre (10^{-6} l)

Unités de masse :

kg	kilogramme
g	gramme
μ g	microgramme

Unité de température :

$^{\circ}$ C	degré Celsius
--------------	---------------

Unités de pression :

MPa	MégaPascal(10^6 Pa)
Pa	Pascal (ou $N.m^{-2}$)
bar	bar (10^5 Pa)
atm	atmosphère ($1,01325.10^5$ Pa)

Unités de biochimie et de biologie moléculaire :

kDa	kiloDalton
M	$mol.l^{-1}$
mM	$10^{-3} mol.l^{-1}$
μ M	$10^{-6} mol.l^{-1}$

Unités de temps :

h	heure
min	minute
s	seconde

Unité de vitesse :

tpm	tours par minute
-----	------------------

Unités de longueur :

m	mètre
cm	centimètre
mm	millimètre
nm	nanomètre

Unités électriques :

V	volts
A	ampère
mA	milliampère

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

▣ Bibliographie

- Figure 1** : Schéma du principe d'une enceinte hautes pressions à compression directe →p. 15
- Figure 2** : Schéma du principe d'une enceinte hautes pressions à compression indirecte →p. 15
- Figure 3** : Implantation des enceintes hautes pressions industrielles sur l'ensemble de continents (Nicolas Correa Hyperbaric, communication) →p. 17
- Figure 4** : Différents types de produits commercialisés dans le monde (Nicolas Correa Hyperbaric, communication) →p. 18
- Figure 5** : Enceinte hautes pressions en position horizontale (NC Hyperbaric, Espagne) →p. 23
- Figure 6** : Paniers de remplissage de l'enceinte contenant des produits à pressuriser →p. 23
- Figure 7** : Diagramme de phase de l'eau (Kalichevsky *et al.*, 1995) →p. 26
- Figure 8** : Représentation schématique du muscle →p. 36
- Figure 9** : Constituants du sarcomère →p. 37
- Figure 10** : Représentation schématique d'une molécule de myosine →p. 40
- Figure 11** : Représentation schématique d'un myofilament épais →p. 40
- Figure 12** : Représentation schématique d'un myofilament fin →p. 41
- Figure 13** : Forme des myotomes chez le saumon (d'après Van Leeuwen, 1999) →p. 43
- Figure 14** : Schématisation de l'organisation du muscle de poisson →p. 44
- Figure 15** : Évolution du pH du muscle et de la pression osmotique de bovin au cours de la maturation (Ouali, 1990) →p. 47
- Figure 16** : Schéma des muscles de bovin. →p. 52
- Figure 17** : Photo de bar, *Dicentrarchus labrax* L. →p. 55
- Figure 18** : Schéma des calpaïnes I et II →p. 58
- Figure 19** : Schéma de la structure cristallographique en ruban de la m-calpaïne humaine en l'absence du calcium →p. 59
- Figure 20** : Schéma de la structure de la calpastatine, inhibiteur spécifique des calpaïnes →p. 60
- Figure 21** : Schéma des mécanismes d'activation possibles des calpaïnes. →p. 63

▣ Matériels & Méthodes

- Figure 22** : Extraction des protéines myofibrillaires de muscle de bovin →p. 76
- Figure 23** : Photo du pilote hautes pressions de l'ENITIAA (Nantes) →p. 78
- Figure 24** : Schéma du pilote hautes pressions →p. 78
- Figure 25** : Schéma des conditions du traitement hautes pressions →p. 79
- Figure 26** : Courbe d'évolution de la température à l'intérieur de l'enceinte réalisée pour une mise sous pression à 400 MPa puis une détente →p. 80
- Figure 27** : Représentation du ligand Phenyl Sepharose CL-4B couplé à une matrice d'agarose →p. 81
- Figure 28** : Schématisation de chromatographie d'interactions hydrophobes →p. 81

Figure 29 : Représentation du ligand Diéthylaminoéthyl (DEAE)	→p. 82
Figure 30 : Cellule permettant d'effectuer des mesures de fluorescence sous pression	→p. 86
Figure 31 : Schéma d'un filet de poisson	→p. 90
Figure 32 : Schéma du diagramme de couleur du système L*a*b* (CIE, 1976)	→p. 91
Figure 33 : Principe de mesure en compression pour établir une analyse du profil de texture	→p. 93
Figure 34 : Représentation de l'allure typique d'un profil de texture TPA	→p. 94

□ Résultats & Discussion

Partie 1 :

Figure 35 : Effet de la mise sous vide sur l'activité enzymatique des calpaïnes de muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	→p. 97
Figure 36 : Profil d'élution sur une colonne Phenyl Sepharose CL-4B d'un extrait de muscle de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	→p. 98
Figure 37 : Profil d'élution sur une colonne Phenyl Sepharose CL-4B d'un extrait de muscle bovin (<i>Biceps femoris</i>)	→p. 98

Partie 3 :

Figure 38 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité des calpaïnes de muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) issues de muscle pressurisé ou d'extrait pressurisé.	→p. 104
Figure 39 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité des calpaïnes de bovin (<i>Biceps femoris</i>) issues de muscle pressurisé ou d'extrait pressurisé.	→p. 104
Figure 40 : Effet du traitement hautes pressions sur la dissociation de la m-calpaïne de lapin d'après les travaux de Bessière <i>et al.</i> (1999a).	→p. 105
Figure 41 : Activité des calpaïnes de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) sous pression.	→p. 106
Figure 42 : Zymogramme de caséine des protéines sarcoplasmiques de muscles blanc de bar. Les flèches indiquent les différentes isoformes de calpaïnes (hypothétiques).	→p. 107
Figure 43 : Électrophorèse en condition native montrant l'effet du traitement par hautes pressions sur la structure de la calpaïne de muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.).	→p. 108
Figure 44 : Électrophorèse en condition dénaturante montrant l'effet du traitement par hautes pressions sur la structure de la calpaïne de muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.).	→p. 109
Figure 45 : Effet de la pression sur l'hydrophobie de surface des protéines présentes dans les extraits sarcoplasmiques, dans les fractions calpaïnes de muscles de bar et de bovin et de la calpastatine commerciale.	→p. 110
Figure 46 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la phosphatase acide de muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) issue de muscle pressurisé ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé.	→p. 112
Figure 47 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la phosphatase acide de muscle de bovin (<i>Biceps femoris</i>) issue de muscle pressurisé ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé.	→p. 113
Figure 48 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la phosphatase acide commerciale.	→p. 113
Figure 49 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la cathepsine D de muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) issue de muscle pressurisé ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé.	→p. 114
Figure 50 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la cathepsine D de muscle de bovin (<i>Biceps femoris</i>) issue de muscle pressurisé ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé.	→p. 115

Figure 51 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité des cathepsines B, H et B+L de muscle blanc de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) issues de muscle pressurisé ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé .	→p. 116
Figure 52 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité des cathepsines B, H et L de muscle de bovin (<i>Biceps femoris</i>) issue de muscle pressurisé ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé.	→p. 117
<u>Partie 4 :</u>	
Figure 53 : Constitution des différents lots.	→p. 119
Figure 54 : Représentation schématique du déroulement de l'expérimentation.	→p. 120
Figure 55 : Évolution de l'activité des calpaïnes après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage <i>post-mortem</i> à 4°C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa, 100 MPa et 300 MPa	→p. 121
Figure 56 : Évolution de l'activité des calpastatines après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage <i>post-mortem</i> à 4°C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa, 100 MPa et 300 MPa	→p. 122
Figure 57 : Évolution de l'activité de la cathepsine D après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage <i>post-mortem</i> à 4°C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa, 100 MPa et 300 MPa	→p. 124
Figure 58 : Évolution de l'activité de la cathepsine B après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage <i>post-mortem</i> à 4°C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa, 100 MPa et 300 MPa	→p. 125
Figure 59 : Évolution de l'activité des cathepsines (B+L) après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage <i>post-mortem</i> à 4°C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa, 100 MPa et 300 MPa	→p. 126
Figure 60 : Analyse électrophorétique des protéines sarcoplasmiques : 0 et 2 jours <i>post-mortem</i>	→p. 128
Figure 61 : Analyse électrophorétique des protéines sarcoplasmiques : 4 et 7 jours <i>post-mortem</i>	→p. 128
Figure 62 : Analyse électrophorétique des protéines myofibrillaires : 0 et 2 jours <i>post-mortem</i>	→p. 129
Figure 63 : Analyse électrophorétique des protéines myofibrillaires : 4 et 7 jours <i>post-mortem</i>	→p. 130
<u>Partie 5 :</u>	
Figure 64 : Effet du stockage à 4°C pendant 0, 7 et 14 jours <i>post-mortem</i> et du traitement hautes pressions sur l'exsudation de filets de bar	→p. 131
Figure 65 : Effet du stockage à 4°C pendant 0, 7 et 14 jours <i>post-mortem</i> et du traitement hautes pressions sur la capacité de rétention en eau des filets de bar	→p. 132
Figure 66 : Évolution de la flore totale au cours du stockage à 4°C pendant 0, 7 et 14 jours, prélevée dans du muscle de bar après des traitements par hautes pressions	→p. 139
Figure 67 : Coupes transversales de muscle de bar traité par hautes pressions et stocké pendant 0, 7 et 14 jours à 4°C	→p. 141
<u>Partie 6 :</u>	
Figure 68 : Profil électrophorétique des protéines sarcoplasmiques pour les échantillons à J0 et J7 avec les différentes pressurisations (0, 100, 300 et 500 MPa).	→p. 144
Figure 69 : Profil électrophorétique des protéines sarcoplasmiques pour les échantillons à J14 et J21 avec les différentes pressurisations (0, 100, 300 et 500 MPa).	→p. 144
Figure 70 : Profil électrophorétique des protéines myofibrillaires pour les échantillons à 0 et 100 MPa au cours du temps (0, 7, 14 et 21 jours).	→p. 145
Figure 71 : Profil électrophorétique des protéines myofibrillaires pour les échantillons à 300 et 500 MPa au cours du temps (0, 7, 14 et 21 jours).	→p. 146

- Figure 72** : Activité des calpaïnes purifiées de muscle de bovin à 4 °C à pH 5,8 et 7,5. →p. 147
- Figure 73** : Activité de la cathepsine D de muscle de bovin à 4 °C à pH 5,8. →p. 148
- Figure 74** : Profil d'éluion sur une colonne DEAE Sepharose Fast Flow d'un extrait de fractions des calpaïnes de muscle bovin (*Biceps Femoris*) obtenus sur une colonne Phenyl Sepharose CL-4B. →p. 149
- Figure 75** : Profil électrophorétique de la calpaïne de muscle de bovin dans les fractions. →p. 150
- Figure 76** : Profils électrophorétiques de la dégradation des protéines myofibrillaires par les calpaïne commerciale. →p. 151
- Figure 77** : Profils électrophorétiques de la dégradation des protéines myofibrillaires par les calpaïnes purifiées. →p. 152

Liste des tableaux

▣ Bibliographie

- Tableau 1** : Équivalences des différentes unités de pressions →p. 11
- Tableau 2** : Produits commercialisés à base de fruits et légumes autres que les jus →p. 19
- Tableau 3** : Jus de fruits et boissons commercialisés →p. 20
- Tableau 4** : Produits commercialisés à base de poisson et fruits de mer →p. 21
- Tableau 5** : Produits carnés commercialisés →p. 22
- Tableau 6** : Production et coût de production de produits traités par hautes pressions (Résultats NC Hyperbaric, Espagne) →p. 23
- Tableau 7** : Constituants du muscle squelettique de mammifère. →p. 34
- Tableau 8** : Caractérisation qualitative et quantitative du muscle de poisson (Love, 1970) →p. 35
- Tableau 9** : Composition, rôle et localisation des protéines myofibrillaires (d'après Pearson & Young, 1989) →p. 38
- Tableau 10** : Sites d'actions des enzymes protéolytiques durant le vieillissement du muscle →p. 49
- Tableau 11** : Récapitulatif des différentes enzymes responsables des dégradations myofibrillaires →p. 56
- Tableau 12** : Tableau récapitulatif des cathepsines d'intérêt dans cette étude →p. 65

▣ Matériels & Méthodes

- Tableau 13** : Déroulement de la coloration au nitrate d'argent →p. 88

▣ Résultats & Discussion

Partie 2 :

- Tableau 14** : Activités totales des enzymes protéolytiques (cathepsine D, cathepsine B, cathepsine H, cathepsines (B+L) et calpaïnes) dans le muscle blanc de bar et dans la viande de boeuf →p. 99

Partie 4 :

Tableau 15 : Répartition des traitements et des temps de stockage pour les différents lots. →p. 120

Partie 5 :

Tableau 16 : Paramètres de l'analyse de texture TPA de filets de bar traités par hautes pressions après 0, 7 et 14 jours de stockage à 4°C. →p. 135

Tableau 17 : Résultats des différents paramètres de couleur du système L*a*b* de filets de bar traités par hautes pressions après 0, 7 et 14 jours de stockage à 4°C. →p. 138

Introduction

Introduction

Le traitement par hautes pressions est un procédé qui consiste à appliquer une pression sur un liquide dans lequel le produit d'intérêt est immergé : cette pression peut atteindre 6000 fois la pression atmosphérique dans l'industrie agro-alimentaire.

Ce procédé fait figure de procédé innovant en industrie agro-alimentaire, car il s'inscrit dans la droite lignée de la pasteurisation, et a même été surnommé « pasteurisation à froid ». Les études de Hite, Roger et Reignard à la fin du XIX^{ème} siècle ont mis en évidence que ce procédé permettait d'améliorer la conservation des aliments par une dégradation de la flore bactérienne, tout en conservant les propriétés organoleptiques des aliments. La seule entrave, à un développement important de cette technique, fut la mise au point et la fabrication d'enceintes sécurisées avec des volumes suffisamment conséquents pour une application dans l'industrie agro-alimentaire.

Depuis une quinzaine d'années, on a vu apparaître sur le marché japonais, des produits traités par hautes pressions comme de la confiture et des compotes. Ce nouveau procédé s'est développé et étendu d'abord sur ce même marché à une plus large gamme de produits. Ce procédé a ensuite franchi les frontières, pour gagner l'Europe avec du jambon commercialisé en Espagne par Espuña et du jus d'orange commercialisé en France par Pampryl, ainsi que le continent américain avec du guacamole développé par Avomex au Mexique.

Les nombreux avantages de ce procédé ont été vantés et mentionnés : une dégradation de la flore bactérienne, aucune modification des vitamines, une faible modification de la couleur... Les études entreprises plus précisément sur le procédé et les interactions avec les biomolécules ont mis en évidence que les hautes pressions ne modifiaient pas les vitamines, activaient ou inhibaient des enzymes, entraînaient une transition de phase liquide-solide des lipides, modifiaient la structure tridimensionnelle des polysaccharides et des protéines conduisant à la formation de nouvelles textures. De nouvelles applications du procédé comme la texturation de produits alimentaires sont envisagées.

La texture est un critère important pour la viande et pour le poisson, mais aussi un gage de qualité. Les consommateurs recherchent une viande tendre, tandis que pour le poisson, l'attente est toute autre, une chair ferme est recherchée. La viande bovine a besoin d'un long processus de maturation pour que sa tendreté soit améliorée. Ceci passe par une action concomitante de réactions enzymatiques et de mécanismes physico-chimiques se produisant,

après la mort de l'animal. Pour le poisson, l'altération de la chair fait suite à une action enzymatique, physico-chimique et bactérienne. Tous ces mécanismes de dégradation entraînent une diminution de fermeté de la chair. De la viande ou du poisson, un point commun peut être souligné : l'action privilégiée des enzymes dans les mécanismes dégradatifs, et plus précisément des cathepsines et des calpaïnes. Les implications de ces différentes familles de protéases sont connues, mais il demeure, néanmoins, quelques incertitudes quant à l'implication de telles ou telles protéases au cours de la période *post-mortem* et à leur degré de participation à l'altération des protéines myofibrillaires.

Les hautes pressions ont révélé une action sur la structure des protéines ; elles peuvent donc jouer un rôle sur les fonctions catalytiques par un changement de la structure des protéases. Les effets dépendent principalement de la structure de l'enzyme (monomérique ou oligomérique) ainsi que des conditions de traitements (temps, intensité de pression, pH, température,...). Dans le cas de la viande, une activation des mécanismes protéolytiques est recherchée permettant de réduire la période de maturation et pour la chair de poisson, il serait plutôt souhaité une inhibition des activités enzymatiques conduisant à son altération, afin de conserver la fermeté de la chair. Les précédents travaux sur l'étude des hautes pressions sur les muscles de poisson et le muscle bovin ont souligné un impact important sur la couleur du produit donnant l'apparence d'un produit cuit. Cette modification est un point critique pour le consommateur. Au cours de ce travail, nous nous intéresserons à comprendre les modifications entraînées par ce procédé, afin de pouvoir l'utiliser à bon escient. Une bonne connaissance des modifications des protéases en fonction des paramètres de pressurisation pourrait permettre de contrôler les activités enzymatiques.

La démarche qui caractérise cette étude débute par une caractérisation des principales protéases impliquées dans les dégradations des protéines de structure du muscle de viande et de poisson. Elle se poursuit par une évaluation des effets des hautes pressions ainsi que de la conservation réfrigérée sur les activités de ces protéases et par une compréhension des mécanismes de fonctionnement.

Le présent travail sera basé sur trois axes fondamentaux en vue de présenter le sujet et de le restituer dans son contexte, d'exposer les techniques utilisées, de rapporter les résultats obtenus, de les discuter et de conclure sur l'ensemble du travail de recherche.

Le premier axe, intitulé Bibliographie, présente le procédé de hautes pressions, caractérise le muscle de poisson et de mammifère, décrit les mécanismes enzymatiques après l'abattage et synthétise les résultats des études déjà effectuées sur des sujets proches.

Le deuxième axe, nommé Matériels & Méthodes, précise les muscles utilisés, et énumère et décrit les techniques d'analyse utilisées.

Et enfin, le troisième axe, intitulé Résultats & Discussion, fait état des résultats obtenus au cours de cette étude, et les explications apportées pour comprendre les différents phénomènes. Six parties distinctes sont soulignées :

- ✦ Études préliminaires : dans ce paragraphe, il est présenté les résultats d'études sur l'effet du vide sur les protéases et la caractérisation de la purification des calpaines par chromatographie d'interactions hydrophobes.

- ✦ Comparaison de l'activité des enzymes entre la viande et le poisson : dans cette partie, nous apportons une caractérisation, une quantification ainsi qu'une comparaison des différentes protéases responsables de la dégradation musculaire dans la viande et dans la chair de poisson.

- ✦ Effet de la pression sur l'activité des enzymes protéolytiques : ce point explique le choix des paramètres du traitement par hautes pressions et montre les effets des hautes pressions sur les différentes classes de protéases, aussi bien dans la viande que dans le muscle de poisson.

- ✦ Effet de la pression et du temps sur l'activité enzymatique des protéases et sur les protéines du muscle de poisson : dans cette partie, il est présenté l'évolution des activités enzymatiques dans le muscle de poisson au cours du entreposage en condition réfrigérée après avoir été soumis à un traitement hautes pressions.

- ✦ Effet de la pression et du temps sur la texture, la couleur et la micro-structure du muscle de poisson : dans cette cinquième partie sont étudiés, au cours du entreposage, les critères révélateurs de l'état d'altération du muscle de poisson après que les échantillons ont subi un traitement hautes pression.

- ✦ Modifications *post-mortem* des protéines de muscle de viande

Bibliographie

Bibliographie

1. Les hautes pressions

1.1. La pression : définition

Lorsqu'une force s'exerce sur une surface, l'effet engendré s'exprime par le quotient de l'intensité de cette force par unité de surface. Ce quotient s'appelle la pression.

$$\text{Pression (Pascal)} = \frac{\text{Force (Newton)}}{\text{Surface (m}^2\text{)}}$$

Dans le Système International d'unités, la pression s'exprime en pascal (Pa) : $1 \text{ Pa} = \text{N.m}^{-2}$. Il existe d'autres unités de pression, les plus courantes étant l'atmosphère (atm), le bar, le « millimètre de mercure ». Les équivalences de ces différentes unités sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

Unités	Abréviations	Conversions en MPa
Atmosphère	atm	0,1013
Bar	bar	0,1
Livre par pouce carré	psi	$6,892.10^{-3}$
Kiloforce par centimètre carré	kg.cm^{-2}	0,1019
Millimètre de mercure	mmHg	$1,34.10^{-4}$
Torr	torr	$1,34.10^{-4}$

Tableau 1 : Équivalences des différentes unités de pressions

Au niveau de la mer, la pression moyenne est égale à 760 mm de mercure, ou 1013 millibars (mbar): cela représente la pression atmosphérique. Cette pression décroît avec l'altitude.

1.2. L'histoire des hautes pressions

A la fin du XIX^{ème} siècle, Regnard en 1884 (cité par Tonello, 1998) avec ses travaux sur l'altération bactérienne du lait et de la viande, Roger en 1885 (cité par Tonello, 1998) avec ses

travaux sur la destruction de certains micro-organismes et Hite en 1899 avec ses études sur le lait et les produits à base de fruits, ont découvert l'utilité des hautes pressions pour la conservation des aliments. Ce procédé pourrait suppléer la pascalisation : on lui attribue même le nom de pascalisation à froid. Après l'utilisation de ce procédé, on remarque que la plupart des propriétés des aliments sont conservées telles que la couleur d'origine du produit frais, la teneur en vitamines et le goût tout en assurant un assainissement microbiologique.

Aujourd'hui, les consommateurs sont de plus en plus exigeants. Ils veulent une nourriture la plus fraîche possible, la plus « naturelle » avec un minimum d'emballage, une grande qualité en terme de flaveur, de texture, d'apparence et de valeur nutritionnelle et tout cela avec une durée de conservation étendue.

L'utilisation des hautes pressions pourrait donc permettre de répondre à un certain nombre d'attentes des consommateurs.

Il a fallu attendre un siècle pour voir resurgir le procédé de pressurisation appliqué à l'industrie agroalimentaire. La barrière était la construction de machine adaptée pour les industries agro-alimentaires. Cette reprise d'activité, il y a une quinzaine d'années, a suscité une forte attention entraînant une recherche active et un développement de ces activités.

Elle s'est d'abord concentrée sur le marché japonais où l'on a pu voir de la marmelade de fraises commercialisée sous la marque Meidi-Ya. Les japonais ont ensuite diversifié les produits pressurisés (jus de fruits, viandes, poissons, gâteaux de riz, jambon de bœuf, saké, etc.) ainsi que la gamme des machines de traitement.

Par la suite le procédé a dépassé les frontières japonaises et d'autres pays se sont lancés dans cette nouvelle technologie aussi bien en Amérique avec du guacamole commercialisé par Avomex et des huîtres crues de Motivatit et en Europe : en France avec du jus d'orange fraîchement pressé de la société Ulti-Fruit de Pernod Ricard et en Espagne avec du jambon cuit tranché pressurisé vendu par la société Espuña.

Cette vague de hautes pressions est représentée maintenant sur presque tous les continents mais l'avance des japonais reste indéniable.

1.3. Mode d'action des hautes pressions

En 1984, Henri Le Chatelier énonça le principe suivant : « Tout système en équilibre chimique stable soumis à l'influence d'une cause extérieure qui tend à faire varier soit la température soit sa condensation (pression, concentration) dans sa totalité ou seulement dans quelques-unes de ses parties, ne peut éprouver que des modifications intérieures qui, si elles se produisent seules, amèneraient un changement de température ou de condensation de signe contraire à celui résultant de la cause extérieure ». Ce principe empirique traduit le fait que la pression agit sur de nombreuses molécules et qu'elle peut engendrer des perturbations telles que des changements conformationnels, des modifications de réactions chimiques et des changements d'états.

L'influence de la pression à température constante est décrite par la loi de modération de Le Chatelier. Une augmentation de la pression appliquée à un système maintenu à température constante entraîne un déplacement de l'équilibre dans le sens de la réaction qui à température et à pression constante, s'exécute avec une diminution de volume. Ceci favorise le rapprochement des molécules entre elles. Le principe de Le Chatelier peut être aussi explicité de façon plus élémentaire. Si l'on modifie les conditions d'un système en équilibre, celui-ci réagit de façon à s'opposer en partie aux changements qu'on lui impose, jusqu'à ce qu'il atteigne un autre état d'équilibre.

L'influence d'une variation isotherme de la pression sur la constante d'équilibre est donnée par l'expression générale du changement d'énergie ou enthalpie libre ΔG .

Si l'on s'intéresse à un équilibre élémentaire $A \leftrightarrow B$, cela se traduit par :

$$\Delta G = -R.T.\ln K = \Delta E + P.\Delta V - T.\Delta S$$

avec R : constante des gaz parfaits, T : température, K : constante de réaction, P : pression, ΔE : variation d'énergie interne totale, ΔG : enthalpie libre, ΔS : variation d'entropie.

L'utilisation de la pression comme variable physique va changer seulement le volume du système contrairement à la température qui modifie l'énergie interne et le volume du système.

On peut donc ainsi déterminer ΔV comme la différence entre l'état final (V_B) et l'état initial (V_A) par l'expression suivante :

$$\Delta V = V_B - V_A = (\delta.\Delta G / \delta p)_T = -R.T.(\delta.\ln K / \delta p)_T$$

Ainsi, si le volume augmente au cours de la réaction ($\Delta V > 0$) et si la pression diminue ($dP < 0$), alors $d\Delta G < 0$ et ΔG diminue ; la transformation sera favorable. De même, si le volume augmente au cours de la réaction ($\Delta V > 0$) et si la pression augmente ($dP > 0$), alors $d\Delta G > 0$ et ΔG augmente, la transformation sera défavorable. Si à température constante la pression augmente, le système évolue naturellement dans le sens qui entraîne une diminution du volume du système, et inversement si la pression diminue, le système évolue dans le sens qui entraîne une augmentation du volume du système.

La loi énoncée par Le Chatelier peut permettre de prédire les modifications apportées par l'action de la pression sur les molécules. Suivant la valeur de ΔV de formation d'une liaison chimique, celle-ci sera soit favorisée, soit inhibée par la pression.

La rupture des liaisons covalentes a un ΔV de 10 ml.mol^{-1} . Elle est inhibée par l'augmentation de la pression, ainsi les liaisons seront rendues beaucoup plus stables. Les liaisons électrostatiques ont un ΔV de -10 ml.mol^{-1} ; la pression entraîne la dissociation ionique. Les liaisons hydrophobes, dont le ΔV est positif, sont détruites lorsque les pressions sont

inférieures à 100 MPa, et renforcées au dessus. Enfin, les liaisons hydrogènes sont généralement favorisées par la pression ($\Delta V \approx -3 \text{ ml} \cdot \text{mol}^{-1}$), ce qui permettra d'expliquer la formation de gels.

1.4. Les modes d'application

La technique de pressurisation consiste à appliquer une pression sur un liquide qui contient les produits devant subir le traitement. La compressibilité du liquide transmettant la pression est faible. Souvent, le liquide utilisé est l'eau. Il en découle ainsi l'appellation « hautes pressions hydrostatiques ».

Le produit est enfermé dans son emballage de vente (souvent un sachet imperméable et flexible), dans lequel le vide a été fait puis submergé sous l'eau. La pression appliquée est isostatique (elle est identique dans toutes les directions de l'espace) en tous points de l'enceinte et donc du produit (Earnshaw, 1996). Ainsi comprimé, le produit peut reprendre sa forme initiale quand la pression est libérée (Olson, 1995). La gamme des hautes pressions appliquées varie de quelques dizaines de méga pascals à 1 giga pascal.

Ce procédé présente des avantages : (i) le traitement par hautes pressions se fait à des températures inférieures à 100°C et même en général à température ambiante, (ii) ce traitement requiert beaucoup moins d'énergie que la majorité des autres systèmes de conservation, (iii) il n'y a aucun gradient de pression dans le produit car la transmission de cette pression se fait instantanément par opposition à un traitement thermique.

L'équipement est composé d'une enceinte résistante à la pression, d'un circuit hautes pressions, d'une pompe externe de compression du fluide, d'une unité de commande et d'un dispositif de chauffage ou de refroidissement.

Deux types de compressions sont à ce jour disponibles : la compression « directe » et « indirecte ».

1.4.1. La compression directe

Dans le système de compression « directe » (cf. figure 1), la pression est générée directement à l'intérieur de l'enceinte par la compression d'un piston sur son milieu en contact. Le fluide, ainsi vecteur de la pression, arrive sous basse pression dans l'enceinte ; ensuite le piston permet de générer les pressions. L'avantage de cette méthode, est d'atteindre rapidement des pressions élevées, mais néanmoins elle reste limitée à des enceintes de faible diamètre du fait de problèmes d'étanchéité.

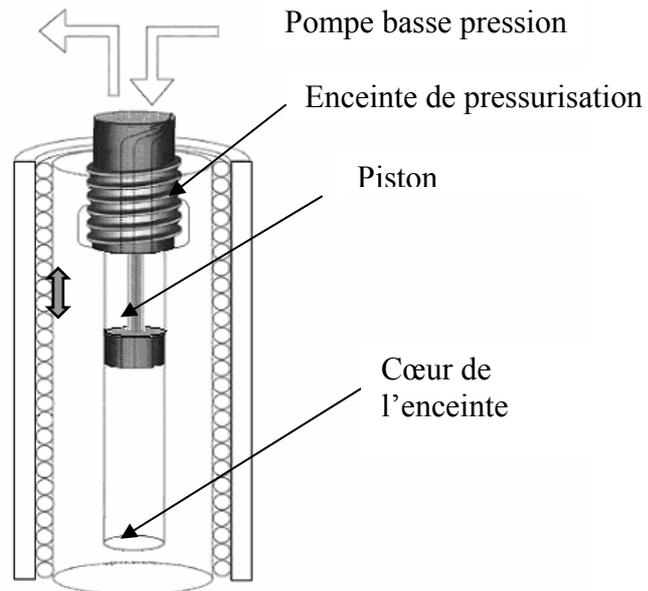


Figure 1 : Schéma du principe d'une enceinte hautes pressions à compression directe

1.4.2. La compression indirecte

La deuxième possibilité est la compression « indirecte ». Dans ce cas, une pompe hautes pressions envoie un fluide de pressurisation dans une enceinte close (cf. figure 2). Cette méthode est la plus répandue dans les industries.

Ce mode de compression sera utilisé dans le cadre de notre étude.

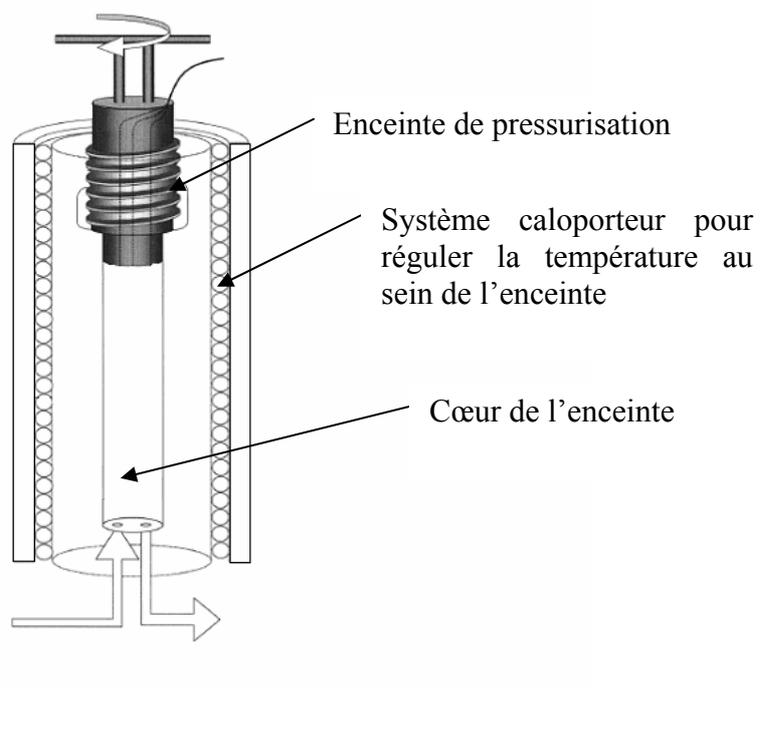


Figure 2 : Schéma du principe d'une enceinte hautes pressions à compression indirecte

L'échantillon est enfermé dans un sachet flexible et étanche dans lequel le vide a été fait au préalable. Il est ensuite introduit dans l'enceinte remplie d'eau. Dans un premier temps, une pompe basses pressions (ou pompe de gavage) comprime l'eau pour l'envoyer à une deuxième pompe qui permet de générer des pressions très importantes. Elle communique directement avec l'enceinte par une canalisation hautes pressions et envoie le liquide jusqu'à obtenir la pression désirée.

1.5. L'application du procédé dans l'industrie agro-alimentaire

L'utilisation des hautes pressions est une alternative aux traitements thermiques classiques pour détruire les micro-organismes. Ce procédé permet de prolonger la stabilité à l'entreposage des produits tout en conservant les propriétés nutritionnelles et sensorielles des aliments.

1.5.1. Les réglementations

La législation européenne, sur les produits traités par hautes pressions dans l'industrie agro-alimentaire est basée sur le règlement CE 258/97, entré en vigueur le 15 Mai 1997. Il introduit, avant toute commercialisation, une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans l'Union Européenne pour de nouveaux aliments ou de nouveaux ingrédients. Les produits soumis à un traitement par hautes pressions sont considérés comme tels. Cette démarche demeure obligatoire pour l'ensemble des états membres.

Les produits pressurisés sont des aliments auxquels a été appliqué un procédé de production qui n'est pas couramment utilisé. Ce procédé de production peut-il affecter leur valeur nutritive, leur métabolisme ou leur teneur en substances indésirables ? Et de plus, la consommation de ce type de produit est restée jusqu'à présent négligeable dans l'Union Européenne.

Tout industriel doit constituer un dossier d'autorisation de mise sur le marché pour tout nouvel aliment d'après la recommandation du 27 Juillet 1997. Ce dossier comprend :

- des données administratives
- une description générale
- des informations essentielles : spécification du nouvel aliment, effet du procédé de production, utilisation antérieure du produit de base pour le nouvel aliment, consommation et niveau d'utilisation prévu, informations d'ordre nutritionnel, microbiologique et toxicologique du nouvel aliment
- une évaluation et une conclusion du demandeur : la conclusion doit dire si le nouvel aliment est substantiellement équivalent à l'aliment de référence et dans le cas contraire, les différences entre les deux. De plus, le demandeur doit proposer un contenu pour l'étiquetage.
- un résumé établi par le demandeur pour être transmis aux états membres

Aux États-Unis, la réglementation est beaucoup plus favorable au développement de « nouveaux produits ». Les deux services responsables de l'autorisation de commercialisation du

produit sont : la FDA (Food and Drug Administration) et le FSIS (Food Safety and Inspection Service). La FDA autorise la commercialisation mais décline toute responsabilité. L'industriel est seul responsable. Et la FSIS demande simplement que le traitement par hautes pressions soit capable de détruire *Listeria monocytogenes* dans les plats cuisinés ou dans les produits prêts à consommer, à base de viande ou de volaille.

1.5.2. Le développement dans le monde

Les valeurs présentées sur la figure 3 résument le développement de l'utilisation du procédé hautes pressions à travers le monde. Il n'est plus maintenant considéré comme « une mode » mais comme un procédé qui a réellement sa place dans l'industrie agro-alimentaire. Mais, les implantations des enceintes hautes pressions ne sont pas égales sur tous les continents. En 2004, 70 machines implantées dans une cinquantaine d'entreprises ont produit 100 000 tonnes de produits pressurisés.

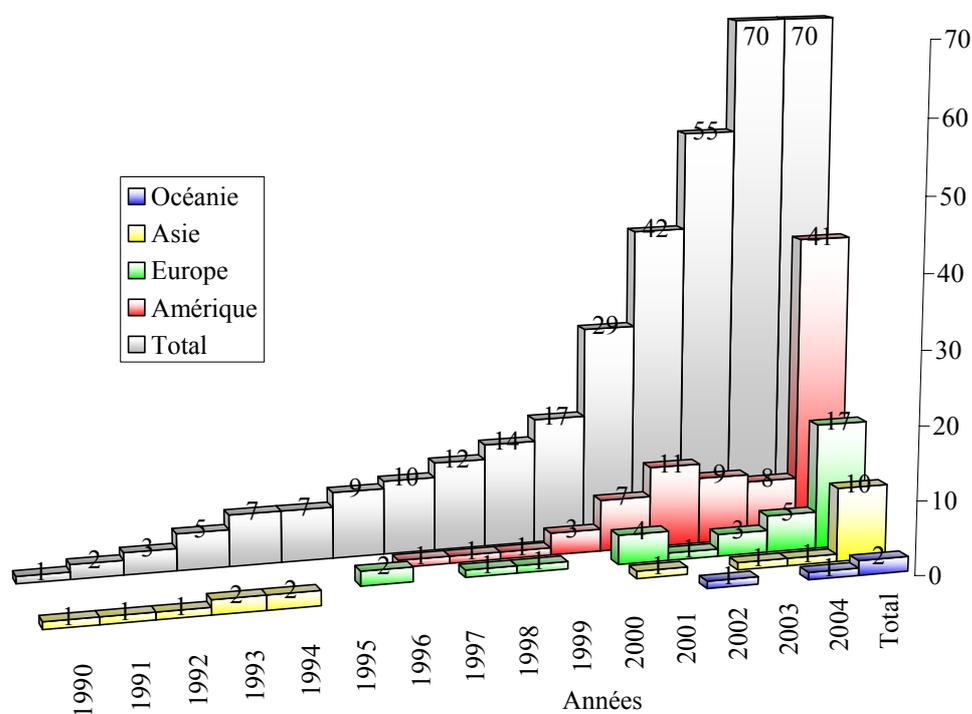


Figure 3 : Implantation des enceintes hautes pressions industrielles sur l'ensemble de continents (Nicolas Correa Hyperbaric, communication personnelle).

1.5.3. Les produits commercialisés

Tout comme le nombre d'enceintes, le nombre de produits traités connaît un essor certain à travers le monde (cf. figure 4).

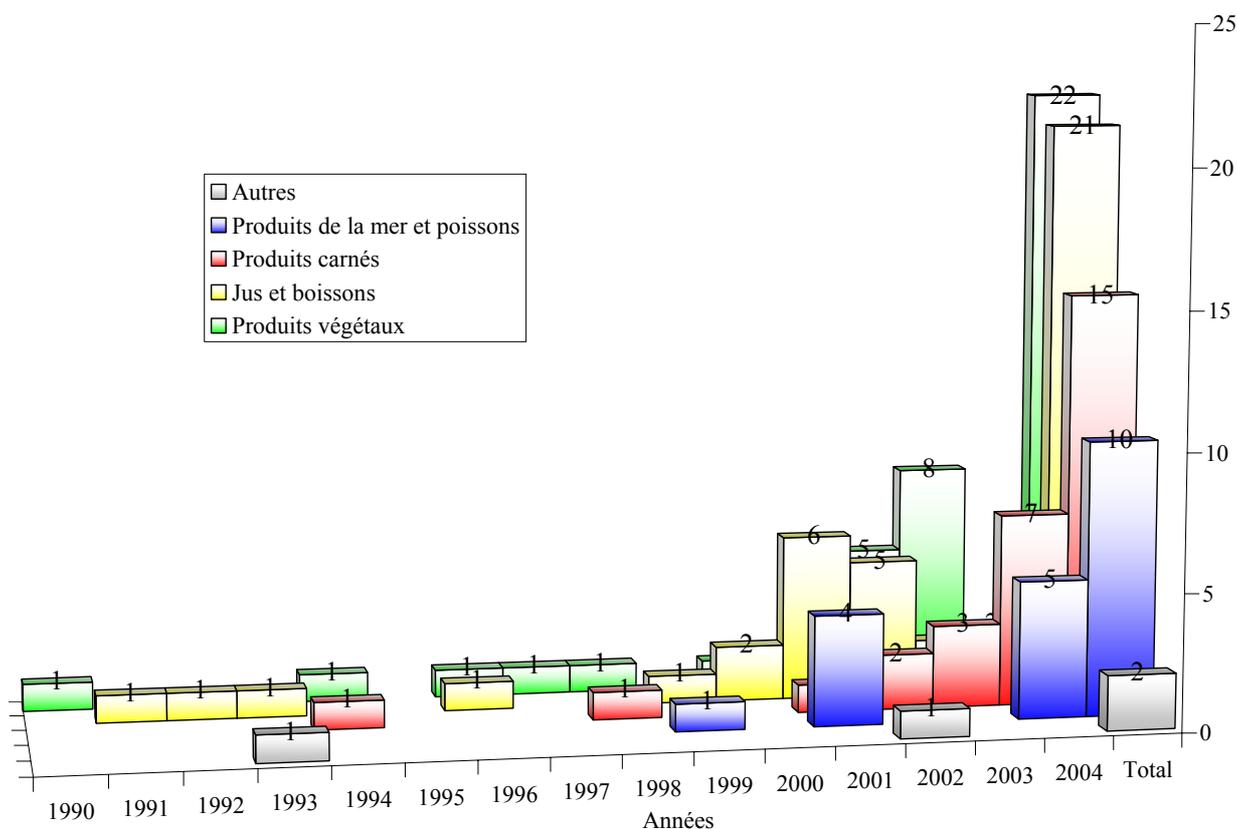


Figure 4 : Différents types de produits commercialisés dans le monde (Nicolas Correa Hyperbaric, communication personnelle).

Il existe de nombreux produits commercialisés ayant subi un traitement par hautes pressions (cf. tableaux 2, 3, 4 et 5). Ce sont des produits à base de fruits et de légumes, des boissons et des jus, des produits carnés et des produits à base de poisson et des fruits de mer.

Le traitement par hautes pressions permet d'aseptiser les fruits, les purées de légumes, les salades, les produits découpés ou tranchés comme le citron, la pomme, l'avocat, l'oignon... Le tableau 2 présente les différents produits à base de fruits et de légumes pressurisés. Le traitement appliqué sur ce type de produits détruit les micro-organismes pathogènes comme *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*. Il réduit également les activités enzymatiques (PPO : polyphénoloxydase, LOX : lipoxygénase, POD : peroxydase ...) qui sont responsables du changement de la couleur dans les fruits et les légumes frais. La durée de conservation est prolongée et toutes les qualités d'un produit frais sont conservées, sans modification de leurs propriétés sensorielles. Il a également été montré que ce traitement réduit l'allergénicité du riz (Suzuki, 2000).

Tableau 2 : Produits commercialisés à base de fruits et légumes autres que les jus (Nicolas Correa Hyperbaric, communication personnelle).

Produits à base de fruits et de légumes			
Pays (Année)	Produits	Caractéristique du traitement indirect	Durée de conservation
Japon (1990)	Confitures, Sauces Gelées de fruits	400 MPa pendant 10 à 30 minutes	2 à 3 mois à 4°C
Japon (1994)	Gâteaux de riz aromatisés aux herbes (mochi-yuomogi)	400 MPa pendant 10 minutes à 50°C	3 mois à 4 °C
États-Unis	Produits à base d'avocats : guacamole, purée d'avocats, sauce salsa (avocats et tomates), demi avocats	600 MPa pendant 2 à 3 minutes à 4°C	1 mois à 4°C
Japon (2000)	Riz précuit Riz hypoallergénique	400 MPa	À température ambiante
Italie (2001)	Fruits : pomme, poire, fraise	3 à 5 minutes à 600 MPa et à 17°C	1 à 2 mois
Etats-Unis (2002)	Produits à base d'avocats	?	?
Mexique (2002)	Produits à base d'avocats	?	?
Etats-Unis (2003)	Rondelles d'oignons	?	45 jours
Canada (2003)	Purée et sauce à base de pomme	?	?
Etats-Unis (2004)	Produits à base de soja, tofu	?	?
Espagne (2005)	Assiette de légumes prêts à consommer	500 MPa	1 mois

Ce traitement est aussi utilisé pour aseptiser des jus et des boissons : jus de fruits ou de légumes (citron, pomme, baies, carotte, brocoli,...), produits à base de jus de fruits et de lait (« smoothies » en anglais), boissons alcooliques... Le tableau 3 recense tous les jus et les boissons pressurisés. Il détruit des pathogènes comme *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, ... De plus, les micro-organismes de détérioration, comme des spores de *Alicyclobacillus* ou de *Saccharomyces cerevisiae* dans les jus de fruit ou des bactéries lactiques dans le vin ou la bière, sont sensiblement réduits par traitement par hautes pressions. Ce traitement a permis aussi de commercialiser de nouvelles boissons, d'exporter des boissons de fruits tropicaux

Tableau 3 : Jus de fruits et boissons commercialisés (Nicolas Correa Hyperbaric, communication personnelle).

Jus et boissons			
Pays (Année)	Produits	Caractéristique du traitement	Durée de conservation
Japon (1991)	Jus de raisin	Mode direct 150 à 200 MPa pendant 15 à 20 minutes à 5°C	Quelques mois à température ambiante
Japon (1992)	Jus de mandarine	Mode direct semi-continu 400 MPa pendant 1 minute à température ambiante	1 an à température ambiante
Japon (1993)	Saké	Mode indirect 400 MPa pendant 30 minutes à 15°C	6 à 12 mois à 4°C
France (1994)	Jus d'agrumes	Mode indirect 400 MPa pendant 1 minute à température ambiante	18 jours à 4°C
Mexique (2000)	Jus d'agrumes et mélange à base de lait et de jus de fruits	Mode indirect 500 MPa	?
Liban (2001)	Jus de fruits	Mode indirect 500 MPa	1 mois
Angleterre (2001)	Jus d'agrumes et mélange à base de lait et de jus de fruits	Mode direct semi-continu 500 MPa pendant 60 secondes	21 jours
États-Unis (2001)	Jus de pomme	Mode direct semi-continu	?
Portugal (2001)	Jus de pomme	Mode indirect 450 MPa 20 à 90 secondes à 12°C	28 jours
Italie (2001)	Jus de fruits et jus à base de légumes	Mode indirect 3 à 5 minutes à 600 MPa et 17°C	1 à 2 mois
Irlande (2001)	Jus de fruits et mélange à base de lait et de jus de fruits	Mode indirect	21 jours
États-Unis (2002)	Jus d'orange et de citron	Mode direct	21 jours
République tchèque (2004)	Jus de pomme	Mode indirect	21 jours

Pour les produits à base de poisson et les fruits de mer, présentés dans le tableau 4, le traitement par hautes pressions détruit les bactéries pathogènes comme *Listeria*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*. La durée de conservation des fruits de mer crus et cuits est considérablement augmentée sans modification de leurs propriétés sensorielles. La quantité d'additifs ou de sel sera ainsi réduite. Par ailleurs ce procédé permet d'ouvrir les coquilles de

moules, d'huîtres par exemple. Mais aussi il facilite l'extraction de la chair de crustacés (langoustines, homards, crabes...).

Tableau 4 : Produits commercialisés à base de poisson et fruits de mer (Nicolas Correa Hyperbaric, communication personnelle).

Produits à base de poisson et fruits de mer			
Pays (Année)	Produits	Caractéristique du traitement	Durée de conservation
États-Unis (1999)	Huîtres et sauces à base d'huîtres	200 à 350 MPa pendant 1 à 2 minutes	10 à 15 jours
Japon (2000)	Hareng	185 MPa pendant 30 minutes à 15°C	1 an à -20°C
Japon (2000)	Saumon fumé tranché	400 MPa pendant 10 minutes à 15-20°C	3 semaines à 10°C
États-Unis (2001)	Huîtres	240 MPa pendant 90 secondes	?
États-Unis (2001)	Huîtres	?	?
Australie (2002)	Huîtres	300 MPa pendant 1 minute	?
Canada (2004)	Produits de la mer	?	?
Nouvelle-Zélande (2004)	Produits de la mer	?	?
Espagne (2004)	Saumon et colin prêts à consommer	500 MPa	2 mois
Canada (2004)	Homards	275 MPa pendant 1 minute	?
Italie (2004)	Morue déssalée	600 MPa	?

Pour les produits à base de viande, le développement du traitement par hautes pressions a permis d'améliorer et d'assurer les qualités sanitaires (jambon, produits tranchés à base de dinde, de poulet, des produits tout préparés). Le tableau 5 présente les produits carnés pressurisés. Cela passe par une destruction de la flore pathogène comme *Listeria*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*. Ce procédé permet de mettre à disposition du consommateur des produits diététiques avec une faible quantité de sel, d'additifs ou de graisse avec une durée de conservation commerciale normale. Ce procédé réduit la période de cuisson des produits fragiles à la chaleur (gros foie de canard, viande rôtie...). Ainsi il est possible de maintenir leur qualité sensorielle élevée en assurant une qualité microbiologique.

Tableau 5 : Produits carnés commercialisés (Nicolas Correa Hyperbaric, communication personnelle).

Produits carnés			
Pays (Année)	Produits	Caractéristique du traitement	Durée de conservation
Espagne (1998)	Jambon cuit tranché et « tapas » (morceaux de porc et volaille)	400 MPa pendant 10 minutes à 8°C	2 mois à 7°C
États-Unis (2001)	Produits cuits tranchés, produits à base de viande de porc et jambon sec (Proscuitto)	?	?
États-Unis (2001)	Produits à base de volaille prêts à consommer	?	?
États-Unis (2001)	Tranches de poulet et bœuf précuits pour fajitas	?	21 jours
Espagne (2002)	Tranches jambon, jambon sec (Serrano), produits à base de dinde et de poulet, chorizo	500 MPa pendant 5 à 10 minutes à 8°C	2 mois pour les produits cuits
Italie (2003)	Jambon sec (Proscuitto), salami, mortadelle et bacon italien (Pancetta)	500 MPa pendant 10 minutes à 7°C	?
Japon (2005)	Jambon fumé, et produits tranchés et cuits à base de porc	600 MPa pendant 5 minutes	4 semaines
Allemagne (2005)	Jambon cru	600 MPa pendant 2 minutes	?

En conclusion, pour l'ensemble des produits traités, le développement du procédé hautes pressions améliore la qualité sanitaire, permet d'innover et donc de concevoir de nouveaux produits, d'exporter des produits fragiles, en conservant les qualités organoleptiques et sensorielles.

1.5.4. Les limites de ce procédé

Il y a quelques années, l'utilisation de ce procédé restait limitée à cause de son coût de production. Par suite, ce coût se répercutait sur le prix du produit commercialisé. Ce traitement ne pouvait donc s'appliquer que sur des produits à forte valeur ajoutée.

A ce jour, les constructeurs d'enceintes hautes pressions ont fait d'énormes innovations technologiques pour rendre ce procédé plus ergonomique. L'installation de la machine ainsi que son intégration sur la chaîne de production se fait plus facilement, car les enceintes sont en position horizontale. Des paniers permettent de traiter une large gamme de produits avec des formes et des emballages différents. Cet appareillage, conçu en acier inoxydable, reste résistant à

l'environnement de l'industrie agro-alimentaire comme l'humidité, l'agressivité des produits de nettoyage, ...

En terme de production, les équipements industriels, rendus entièrement automatiques, permettent une production semi-continue. Le remplissage de l'enceinte se fait à basse pression, éliminant l'utilisation d'une vanne hautes pressions de grand diamètre.

De plus, la conception de l'enceinte par un bobinage empêche son éclatement instantané.

Au final, tout ceci induit une production de produits pressurisés à un coût raisonnable.

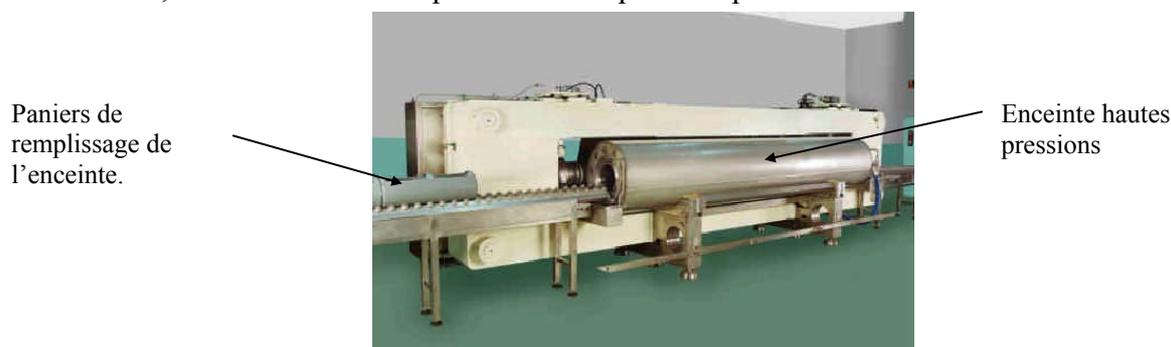


Figure 5 : Enceinte hautes pressions en position horizontale (NC Hyperbaric, Espagne).



Figure 6 : Paniers de remplissage de l'enceinte contenant des produits à pressuriser.

Le tableau ci-dessous présente le coût de production selon le volume de l'enceinte utilisée :

Tableau 6 : Production et coût de production de produits traités par hautes pressions (Résultats NC Hyperbaric, Espagne).

Enceintes	Production ^(a)	Coût ^(b)	Production ^(c)	Coût ^(b)
55 litres	170 kg.h ⁻¹	0,19 €·kg ⁻¹	250 kg.h ⁻¹	0,12 €·kg ⁻¹
150 litres	425 kg.h ⁻¹	0,14 €·kg ⁻¹	660 kg.h ⁻¹	0,09 €·kg ⁻¹
300 litres	850 kg.h ⁻¹	0,11 €·kg ⁻¹	1325 kg.h ⁻¹	0,07 €·kg ⁻¹
Deux enceintes de 300 litres en tandem (600 litres au total)	2000 kg.h ⁻¹	0,09 €·kg ⁻¹	3100 kg.h ⁻¹	0,05 €·kg ⁻¹

- a) Calculs basés sur un facteur de remplissage de l'enceinte de 50% et une durée de la pressurisation de 3 minutes à 600 MPa.
- b) Calculs comprenant une dépréciation (5 ans, 280 jours par an, 16 h par jour) et un coût d'entretien.
- c) Calculs basés sur un facteur de remplissage de l'enceinte de 50% et une durée de la pressurisation de 1 minute à 300 MPa.

1.5.6. Les fournisseurs d'enceintes hautes pressions

Dans la liste ci-dessous sont recensés les principaux fabricants ainsi que les équipementiers d'enceintes hautes pressions:

Avure Technologies -Washington, USA - <http://www.fresherunderpressure.com/>

Autoclave Engineers -Pennsylvannie, USA- <http://www.autoclaveengineers.com>

Elmhurst Research, Inc. -New-York, USA- <http://www.elmhurstresearch.com/>

Engineered Pressure Systems Inc. -Massachusetts, USA- <http://www.epsi-highpressure.com/>

Harwood Engineering Company Inc. -Massachusetts, USA-
<http://users.rcn.com/harwood.ma.ultranet/>

High Pressure Equipment Company -Pennsylvannie, USA- <http://www.highpressure.com/>

Kobelco (Kobe Steel) -Japon- <http://www.kobelco.co.jp/english/index.html>

Mitsubishi Heavy Industries -Japon- http://www.mhi.co.jp/e_hq/e_koatsu/04.html

NC Hyperbaric -Burgos, Espagne- <http://www.nchyperbaric.com/>

Resato -Belgique- <http://www.lpcc.be/resatoindustrie.html>

SITEC -Zurick, Suisse- <http://www.sitec-hp.ch/SITEC/Steri.htm>

Stansted Fluid Power -Royaume-Uni- <http://www.sfp-4-hp.demon.co.uk/home.htm>

Stork Food and Dairy Systems -Amsterdam, Pays-Bas- <http://www.fds.storkgroup.com/>

Uhde Hochdrucktechnik -Hagen, Allemagne- <http://www.uhde-hpt.com/>

1.6. L'effet des hautes pressions sur les systèmes biologiques

1.6.1. Sur l'eau

L'eau est le constituant alimentaire fondamental. Elle existe sous différents états et interagit avec les différentes microstructures et édifices moléculaires au sein des aliments. La quantité contenue dans les aliments est très variable. Les aliments les plus pauvres en contiennent environ 12% et les plus riches plus de 80%.

1.6.1.1. Modification des propriétés de l'eau sous hautes pressions

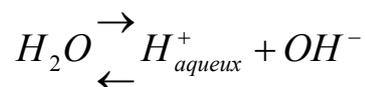
L'eau est le liquide le plus utilisé pour transmettre la pression. Il est donc nécessaire de connaître son comportement lors de sa mise sous pression.

□ Compressibilité de l'eau : La compressibilité de l'eau augmente avec la pression, mais elle reste toutefois relativement faible. La diminution de volume atteint 4% à 100 MPa pour une température de 20°C, et 15% à 600 MPa pour une température de 22°C (Hayashi, 1991).

□ Dissociation des molécules d'eau : Lors de la pressurisation de l'eau, les molécules sont dissociées. Ce phénomène est connu de longue date. Dans de l'eau liquide, certaines des molécules H₂O se dissocient : d'un côté, apparaît une molécule formée d'oxygène et d'hydrogène chargée négativement et de l'autre, un atome d'hydrogène sans électron chargé positivement. C'est ce proton d'hydrogène qui, en se liant avec des molécules d'eau, forme du H₃O⁺. Par conséquent, le pH diminue. Les travaux de Cheftel *et al.* (1991) relatent une diminution théorique du pH de 0,73 unités lorsque la pression évolue de 0,1 à 100 MPa. Il a été démontré dans des études plus récentes que les variations de pH sont de l'ordre de 0,3 unités lorsque l'eau est soumise aux hautes pressions, et ceci par palier de 100 MPa (Hayert *et al.*, 1999).

□ Propriétés thermodynamiques : La compression adiabatique de l'eau, définissant le fait qu'il n'y a aucun échange de chaleur avec l'extérieur au cours de cette transformation, s'accompagne d'une variation de température. Cette hausse de température est de l'ordre de 2 à 3°C par palier de 100 MPa. Cette gamme de variation de température dépend du produit pressurisé ainsi que de la vitesse de montée en pression au sein de l'enceinte (Cheftel & Dumay, 1997).

□ Phénomène d'électrostriction : La formule ci-dessous présente la réaction de dissociation de l'eau :



Les concentrations molaires dans cet équilibre chimique sont définies par application de la loi d'action de masse par le produit : $[H^+_{\text{aqueux}}] \cdot [OH^-] = K_e$, où K_e est une constante d'équilibre.

Lors de l'application de la pression, les molécules d'eau se compactent en cercle autour d'une autre molécule d'eau, et créent ainsi un champ électrique autour d'elles. Ce champ, qui déstabilise les liens électrostatiques entre les atomes de la molécule assiégée, lui enlève un proton. Ce réarrangement définit le phénomène d'électrostriction et contribue à augmenter le produit ionique de l'eau. Car chargé positivement, cet atome d'hydrogène retombe le plus souvent sur « sa » molécule mais, quelquefois, la liaison entre l'hydrogène et l'oxygène se casse et le libère. Le proton se lie alors avec une autre molécule d'eau, agissant sur l'acidité du liquide.

⊘ Modification des liaisons hydrogènes : Les liaisons hydrogènes sont affaiblies lors de l'augmentation de la pression. Ce comportement propre à l'eau se déroule jusqu'à des pressions de 200 MPa (Cavaille *et al.*, 1996). Au delà de cette pression, l'eau a un comportement classique puisque les liaisons hydrogènes sont renforcées.

1.6.1.2. Diagramme des différentes phases de l'eau

Les hautes pressions influent sur le diagramme de phase de l'eau (cf. figure 7). Leur application a tendance à réduire les points de congélation et de fusion de l'eau à un minimum de -22°C pour une pression de 207,5 MPa.

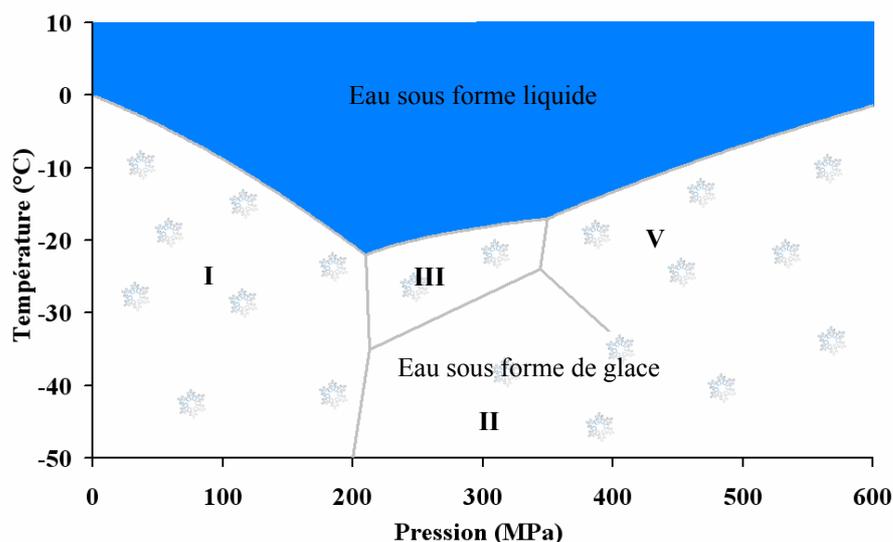


Figure 7 : Diagramme de phase de l'eau (Bridgman, 1912)

La pression agit sur la cristallisation. Il en résulte différents polymorphes. La glace de type I a une plus faible densité que l'eau à l'état liquide ; car lors de la congélation, son volume augmente (de 9% à 0°C et de 13% à -20°C). Ces variations de volume sont une des causes principales de la dégradation de la texture des aliments congelés. L'application de la pression pour la formation de glaces polymorphes a un avantage certain, car le volume est moindre (c'est à dire que la densité est augmentée) par rapport à l'état liquide. Par exemple, la glace de type IV se forme à température ambiante à une pression de 900 MPa, et ainsi cette méthode peut être une alternative économique à la congélation traditionnelle (Kalichevsky *et al.*, 1995). Ce procédé peut être intéressant dans un grand nombre d'applications de congélation et de décongélation de produits alimentaires, où la présence de l'eau demeure importante. La structure du produit est alors moins affectée.

1.6.1.3. La congélation par relâchement rapide de la pression

L'objectif de la congélation sous hautes pressions est de permettre la formation uniforme et rapide de cristaux de petites tailles afin d'endommager au minimum la texture des aliments. Ce

but est atteint en commençant par abaisser négativement la température du produit sous hautes pressions tout en conservant l'eau à l'état liquide, puis de détendre rapidement pour rétablir la pression atmosphérique et ainsi congeler le produit.

1.6.1.4. La décongélation sous hautes pressions

La décongélation sous hautes pressions présente de nombreux avantages par rapport à une décongélation ordinaire à température ambiante (LeBail *et al.*, 2002). Le principal atout est la réduction du temps de décongélation (des premiers travaux ont été réalisés sur le thon et le surimi). Les autres avantages sont la destruction partielle des micro-organismes ainsi que la limitation de leur croissance, une exsudation faible et une préservation de certaines propriétés organoleptiques telles que la couleur.

1.6.2. Sur les protéines

1.6.2.1. Effet sur les principales interactions

Les hautes pressions modifient principalement les interactions hydrophobes et électrostatiques que l'on rencontre dans les macromolécules (protéines, acides nucléiques et polymères glucidiques) (Balny & Masson, 1993).

1.6.2.2. Effet sur la structure

Les protéines se caractérisent par quatre niveaux de structure : la structure primaire qui représente les acides aminés dans une chaîne polypeptidique reliés entre eux par des liaisons covalentes ; la structure secondaire représente les enroulements des chaînes peptidiques reliés par des liaisons hydrogènes ; la structure tertiaire correspond aux repliements dans l'espace tridimensionnel formés par des liaisons covalentes et enfin la structure quaternaire définit les structures variables compactes ou les sous-unités reliées entre elles par des liaisons non covalentes.

□ Structure primaire : Les liaisons covalentes reliant les différents acides aminés sont caractérisées par des énergies élevées. Les gammes de pressions appliquées ne sont pas assez importantes pour entraîner des modifications. Ainsi, les liaisons covalentes ne sont presque pas affectées par les hautes pressions (Mozhaev *et al.*, 1994) : la structure primaire reste donc intacte.

□ Structure secondaire : Les liaisons hydrogènes sont les éléments clés de la structure protéique et permettent la construction de structure en hélice α et en feuillet β . Les changements de la structure secondaire peuvent s'expliquer par la rupture des liaisons hydrogènes. Ces ruptures mettent en péril le maintien des structures lors des fortes pressions. Par ailleurs, les faibles pressions permettent de consolider les liaisons hydrogènes.

□ Structure tertiaire : La structure tertiaire est modifiée pour des pressions au delà de 200 MPa. Un dépliement de petites protéines comme par exemple la ribonucléase A se produit lors de fortes pressions (entre 400 et 800 MPa) montrant dans ce cas que son volume ainsi que sa compressibilité changent. La plupart du temps, la dénaturation induite par la pression apparaît être un processus complexe qui conduit à de multiples formes dénaturées tout en passant par des formes intermédiaires. Mais la compression n'entraîne pas forcément une dénaturation complète des protéines (Masson, 1992; Balny & Masson 1993). Cela dépend du niveau de pression : au delà de 200 MPa, l'effet est souvent irréversible.

□ Structure quaternaire : La structure quaternaire est principalement maintenue en place par des liaisons de type hydrophobe sensibles aux hautes pressions. Les pressions modérées, c'est à dire inférieures à 150 MPa, favorisent la dissociation des protéines oligomériques. Cette dissociation est parfois suivie d'une agrégation des sous-unités ou même d'une précipitation. Pour des pressions plus importantes (comprises entre 150 et 200 MPa), un dépliement des protéines est observé ainsi qu'une réassociation des sous-unités pour les oligomères qui auraient été dissociés (Masson, 1992).

Les hautes pressions peuvent être considérées comme un paramètre externe capable de perturber l'équilibre d'association des sous-unités. L'exposition des protéines oligomériques à de fortes pressions entraîne un changement de l'équilibre contribuant à la formation de monomères (Silva *et al.*, 1996). Cependant, un effet protecteur de la pression sur la structure quaternaire de la butyrylcholinestérase a été observé. Au dessus de 40°C, pour une pressurisation comprise entre 100 à 300 MPa, l'enzyme est protégée contre une inactivation thermique (Weingand-Ziadé *et al.*, 1997).

1.6.2.3. Effet des hautes pressions sur les fonctions des protéines

La structure tertiaire de la protéine est déterminante pour les propriétés fonctionnelles. On a vu précédemment que les hautes pressions affectaient ce niveau structural. Ainsi, les fonctions des protéines vont être touchées (Masson, 1992; Balny & Masson, 1993).

□ Effet sur l'allergénicité des protéines

De nombreux procédés alimentaires ont été appliqués sur les aliments pour éliminer les protéines allergéniques ou réduire leur niveau d'allergénicité. Il a été montré que le traitement par la chaleur pouvait diminuer l'allergénicité d'une protéine mais aussi tout autant l'augmenter car il touche à la structure de la protéine et donc à la présentation de l'épitope (Sanchez & Frémont, 2003). Le procédé des hautes pressions est récemment appliqué sur différents produits alimentaires comme la viande, par exemple. Les travaux réalisés par Han *et al.* en 2002 sur la γ -globuline de bœuf, une protéine allergénique, ont montré que les hautes pressions n'affectaient pas ou très peu l'allergénicité de cette protéine. L'espoir n'est pas vain, car la combinaison des hautes pressions et d'un autre procédé serait peut-être à même de réduire davantage l'allergénicité des protéines.

Beaucoup de japonais sont sujets à des allergies provenant de protéines de riz. Un effet indirect des hautes pressions sur le riz précuit a été mis en évidence. Les hautes pressions augmentent la porosité du riz, ce qui permet d'extraire d'avantage ces protéines allergènes (95% environ composées d'albumines et de globulines) (Suzuki, 2000).

Des études ont été faites sur l'allergène majeur de la pomme, le Mal d1. Un changement des hélices α et des feuillettes β induit par le traitement par hautes pressions a été révélé. De plus, des tests de réactions allergènes sur des patients allergiques aux pommes ont montré une tolérance des patients pour les échantillons traités par rapport aux échantillons natifs, où une réaction immunitaire sévère est observée. La pression induirait un changement de la structure de la molécule (Scheibenzuber *et al.*, 2002) et ainsi diminue l'allergénicité.

Le taux d'hydrolyse de β -lactoglobuline par la trypsine est augmenté avec l'augmentation de la pression hydrostatique. La digestibilité de la β -lactoglobuline augmentée après un traitement hautes pressions est le résultat d'une diminution de volume pendant le processus d'association et d'une diminution de volume pendant l'étape catalytique. Le traitement par hautes pressions de produits laitiers devrait être considéré comme une technologie de la transformation alternative pour la réduction d'allergénicité (Olsen *et al.*, 2003).

□ Effet sur les enzymes

L'activité biologique dépend étroitement du site actif et donc de la structure tridimensionnelle de la molécule. Les hautes pressions peuvent modifier la liaison enzyme/substrat, la catalyse de la réaction enzymatique ou bien la structure de la protéine considérée. Un changement dans la structure de l'enzyme dans les mécanismes réactionnels influe sur le taux de réaction.

La pression est capable d'affecter la structure des protéines au niveau secondaire, tertiaire et quaternaire conduisant à une dénaturation protéique (Lullien-Pellerin & Balny, 2002). Puisque la dénaturation est associée à un changement de conformation, cela peut affecter les fonctionnalités de l'enzyme. Dans ce cas, le traitement par hautes pressions a un effet négatif : il faut donc prendre en considération le niveau de pressurisation.

L'action des hautes pressions dépend de l'enzyme considérée.

L'effet des hautes pressions peut être divisé en deux catégories. Dans une première catégorie, les basses pressions, c'est à dire aux alentours de 100 MPa, peuvent activer les enzymes. Cet effet de stimulation des enzymes est seulement observé pour les enzymes monomériques. Ces dernières finissent par être inactivées pour des fortes pressions.

En s'intéressant à l'effet d'inactivation de la pression sur les enzymes, on peut distinguer quatre groupes : les enzymes qui sont complètement et irréversiblement inactivées, celles qui sont complètement et réversiblement inactivées, celles qui sont incomplètement et irréversiblement inactivées et enfin celles qui sont incomplètement et réversiblement inactivées. L'effet d'inactivation ou d'activation dû aux hautes pressions reste pertinent et intéressant pour

les applications possibles en relation avec les qualités alimentaires, car les produits pressurisés ne sont plus altérés par des dégradations enzymatiques.

En plus des changements de conformation des enzymes, l'activation des enzymes peut être augmentée par une décompartmentation induite par les hautes pressions. En effet, dans un tissu intact, les enzymes et les substrats sont souvent séparés par des membranes. Ces barrières peuvent être détruites par les hautes pressions. Ainsi, l'application des hautes pressions permet d'assurer une mise en contact entre le substrat et l'enzyme.

1.6.3. Sur les lipides

Les lipides sont des molécules biologiques insolubles dans l'eau. Ils constituent une classe de molécules biologiques hydrophobes (graisses ou huiles solubles dans les solvants organiques), constituées d'esters d'acides gras à chaînes moyennes, longues ou très longues pouvant présenter des insaturations.

L'action des hautes pressions concerne principalement les transitions de phase : la température de transition solide vers liquide. La température de fusion des lipides s'accroît, de manière réversible, de l'ordre de 20°C tous les 100 MPa. Ainsi, les lipides présents dans un état liquide à température ambiante cristallisent sous l'effet de la pression.

De plus, l'oxydation des lipides est favorisée après un traitement par hautes pressions (Cheah & Ledward, 1996). Les premiers travaux de Cheah & Ledward (1995) concernant la lipooxydation des viandes pressurisées, ont montré que la graisse de porc est transformée de façon irréversible pour des pressions de 800 MPa. Dans d'autres études, Cheah & Ledward (1996) ont montré que la viande de porc traitée à 300 MPa était plus oxydée que celle non traitée.

Orlien *et al.* (2000) rapportent qu'un traitement de 800 MPa pendant 10 minutes à 10°C est nécessaire pour que l'oxydation du muscle de poulet soit équivalente à celle obtenue en le cuisant à 80°C pendant 10 minutes. L'amplitude de la pression serait plus importante que la durée d'exposition.

1.6.4. Sur les glucides et les polysaccharides

Les glucides sont largement présents dans notre alimentation ; ils sont désignés également par le terme sucre. Ils existent sous deux formes : les sucres simples, à absorption rapide comme le glucose et le saccharose et les sucres complexes, à absorption lente comme l'amidon des graines des céréales, des légumineuses, des féculents, des fruits...

Les hautes pressions ont des effets différents selon la complexité des glucides. Sachant qu'elles n'ont pas d'effets sur les liaisons covalentes et que ces liaisons composent les sucres simples, cette classe de sucres n'est ainsi pas sujet à des modifications. Ainsi les oses et les oligosides sont peu affectés et peuvent être considérés comme peu barosensibles.

Par opposition, les polysaccharides présentent des liaisons de faible énergie reliant les différents oses entre les différentes chaînes. La pression dissocie les différentes chaînes. Elle modifie leurs propriétés rhéologiques. Par exemple, les polysaccharides comme l'amidon, les

alginate sont sensibles à la pression : des modifications des propriétés gélifiantes sont observées. En définitive, l'application de hautes pressions sur certaines structures polysidiques permet la formation de gel. La pression peut aussi modifier la température de transition sol/gel de l'amidon qui devient possible dès 4-5°C à 500 MPa (Heremans, 1982).

1.6.5. Sur les vitamines

Les vitamines se divisent en deux groupes. Les vitamines liposolubles comprenant les vitamines A, D, E, F et K ; et les vitamines hydrosolubles comprenant les vitamines du groupe B (B1, B2, PP ou B3, B5, B6, B8, B9 et B12) et la vitamine C. Les vitamines sont de petites molécules pauvres en liaisons de faible énergie. La plupart se trouvent dans les aliments d'origine végétale. Elles ont souvent une durée de vie très courte. Ces petites molécules ne sont pas touchées par le traitement par les hautes pressions (Cheftel, 1991). Le traitement par hautes pressions étant beaucoup plus doux que le traitement thermique, il ne détruit pas les liaisons covalentes au sein des molécules (seules les liaisons de faible énergie sont détruites) (Polydera *et al.*, 2003). Par exemple, on peut retenir que les vitamines hydrosolubles comme les vitamines B1, B6 et C sont très peu affectées par le traitement hautes pressions (Sancho *et al.*, 1999).

1.6.6. Sur les micro-organismes

La sensibilité des micro-organismes aux hautes pressions est variable. Les bactéries, les levures, les champignons sont détruits dans une gamme de pression de 100 à 600 MPa.

Différentes études ont démontré que les hautes pressions étaient capables de détruire la plupart des micro-organismes. Mais cela dépend de l'amplitude de la pression, de son temps d'application, de son mode d'application (continu ou fragmenté), du pH du milieu, du type de micro-organismes et enfin de la température du produit lors de cette pressurisation (positive ou négative). Ainsi, les hautes pressions améliorent la durée de vie du produit d'un point de vue microbiologique et la qualité sanitaire des produits alimentaires. Le traitement par hautes pressions permet alors de pasteuriser les différents produits à basse température, et d'augmenter ainsi leur date limite de consommation (DLC), tout en leur conservant des caractéristiques les rendant proches des produits frais. L'optimisation de ce procédé peut aussi se faire par des traitements combinés.

Dans un premier temps, les hautes pressions induisent des modifications des membranes cellulaires, qui sont l'une des principales causes de mortalité bactérienne (Ludwig, 2002), de la morphologie des cellules conduisant à des élongations des cellules, des pertes de mouvements pour les micro-organismes voués à se déplacer, des éclatements de certaines vacuoles intracellulaires. De plus, des changements mineurs de certaines réactions biochimiques, au sein des cellules vivantes, peuvent aussi jouer un rôle dans l'inactivation bactérienne. Par exemple, les molécules d'eau et d'acides sont plus ionisées sous la pression ; le pH de l'eau ainsi que celui des solutions tampons diminuent de façon réversible de 0,2-0,3 unités pour 100 MPa, ce qui s'ajoute aux effets de la pression sur les micro-organismes. La pression joue aussi un rôle sur la disponibilité de l'énergie au sein des cellules car elle affecte les réactions biochimiques chargées

de produire de l'énergie (Barbosa-Canovas & Rodriguez, 2002). Elle peut aussi affecter certaines réactions moléculaires comme l'expression génétique et la synthèse protéique entre 30 et 50 MPa.

En général, les micro-organismes résistants à la température sont aussi résistants à la pression. Les bactéries Gram positives sont plus résistantes à la pression et à la température que les bactéries Gram négatives : *Listeria* et *Staphylococcus aureus* sont plus résistants que *Salmonella* et *Escherichia coli*, par exemple. De plus, les bactéries de type coque sont plus résistantes que celles de type bacille (Shigehisa *et al.*, 1991). La présence de sucres et de protéines sur la surface externe des cellules augmente la résistance des micro-organismes face aux hautes pressions (Simpson & Gilmour, 1997).

Des travaux ont montré que les traitements par impulsions étaient beaucoup plus efficaces que les traitements statiques (Chapleau, communication personnelle ; López-Caballero *et al.*, 2000). Les traitements composés d'un effet pression combiné à un effet température sont parfois plus bénéfiques (Krebbes *et al.*, 2003).

1.6.6.1. Les formes végétatives des bactéries

La pression maintenue pendant un temps suffisant permet de détruire la plupart des micro-organismes sous forme végétative. Ces formes bactériennes sont inactivées par des pressions entre 400 et 600 MPa. Car les hautes pressions entraînent des changements dans la morphologie des bactéries (longueur de la cellule, compression de la membrane,...), dans la structure de la membrane cellulaire, dans les réactions biochimiques et dans les mécanismes génétiques (Hoover *et al.*, 1989).

1.6.6.2. Les spores bactériennes

Les spores bactériennes caractérisent une forme dormante de la cellule, capable de supporter souvent des conditions extrêmes. Les formes bactériennes végétatives sont inactivées par des pressions plus faibles que les spores des mêmes espèces qui peuvent résister à des pressions supérieures à 1000 MPa (Cheftel, 1995; Gould, 1995). Ce sont les formes de micro-organismes les plus résistantes à la pression. Elles sont par contre sensibles entre 50 et 300 MPa (Timson & Short, 1965; Sale *et al.*, 1970). La pression peut induire la germination des spores sous des conditions moyennes; par exemple, avec une combinaison de la pression comprise entre 50 et 250 MPa et d'une température de 40°C. Généralement, la pressurisation inactive les spores parce qu'elle entraîne leur germination et ensuite, l'inactivation de leur forme germée. Ainsi, le processus pour minimiser la survie des spores consiste en une première pression modérée pour la germination et en une seconde beaucoup plus importante pour les inactiver. D'autres applications pour la préservation des aliments sont à ce jour utilisées comme l'abaissement du pH. Cette technique détruit peu de spores mais leur croissance est impossible. La comparaison entre les spores résistantes à la pression et à la température, montre que les spores bactériennes extrêmement résistantes à la pression sont aussi résistantes à la chaleur, mais il n'existe aucune relation entre les deux.

Par ailleurs, il peut être mentionné que les bactéries peuvent développer un haut niveau de résistance à la pression grâce à des mutations spontanées.

1.6.6.3. Les levures et les moisissures

En général, plus la complexité d'organismes est grande, plus la sensibilité aux hautes pressions est importante. Ainsi, les micro-organismes eucaryotes sont plus sensibles que les micro-organismes procaryotes (Hoover *et al.*, 1989). Les levures et les moisissures font partie de la famille des eucaryotes. Elles sont inactivées par des pressions entre 200 et 300 MPa (Cheftel, 1995). A titre de comparaison, des bactéries Gram négatif seraient plus sensibles aux hautes pressions que des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (Shigehisa *et al.*, 1991). La majeure partie des spores de levures ou de moisissures est facilement inactivée par une pression à 400 MPa.

1.6.7. Les virus

Les virus sont très hétérogènes ainsi la résistance à la pression varie considérablement. Par exemple, le nombre de virus à ADN-protéines, tels que les bactériophages, est considérablement réduit par des pressions de 300 à 400 MPa (Brauch *et al.*, 1990). Le virus du HIV très pathogène nécessite un traitement de 10 minutes à une pression de 400 à 600 MPa pour que le nombre de particules infectieuses soit réduit d'un facteur de 10^4 - 10^5 (Otake *et al.*, 1997).

De nombreuses applications deviennent possibles comme la stérilisation de composés thermosensibles (dans l'industrie pharmaceutique), la stérilisation d'instruments chirurgicaux et d'objet hospitaliers, l'inactivation de déchets hospitaliers...

1.6.8. Sur l'ADN et les interactions ADN/protéines

La structure macromoléculaire de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est formée par deux chaînes complémentaires s'emboîtant tout en s'enroulant l'une autour de l'autre pour former une double hélice droite. Cette structure est maintenue par des liaisons hydrogènes, qui sont très peu sensibles à la pression et qui la conservent par un renforcement (Hoover *et al.*, 1989; Heremans, 1982). Contrairement à l'ADN, l'ARN des cellules est constitué d'un brin unique : il est dit monocaténaire et la pression est capable de le dégrader. De plus, certains mécanismes nécessitant une interaction entre l'ADN et les protéines sont inhibés par l'application de ce traitement. C'est le cas de la réplication et de la transcription (Cheftel, 1992).

1.7. L'effet des hautes pressions sur les emballages

Les emballages utilisés doivent comporter au moins une partie flexible pour éviter tout risque de déformation ou de rupture. Des études japonaises révèlent que les films plastiques, matériau couramment utilisés en agroalimentaire, ne voient pas leurs propriétés modifiées par des pressions de l'ordre de 400 à 600 MPa. Les autres emballages utilisés sont l'EVOH

(copolymère éthylène-alcool vinylique), le PVOH (polyvinyle alcool semblable à l'EVOH) pour les poches, les pots et les barquettes flexibles.

1.8. Les risques potentiels du procédé hautes pressions

Il n'y a à ce jour aucune étude qui montre une toxicité des produits alimentaires traités par hautes pressions. Il est connu que les hautes pressions affectent la structure des protéines, l'activité de certaines enzymes, certaines liaisons moléculaires. Il serait nécessaire de compiler toutes les données sur les effets des hautes pressions afin de clarifier leurs rôles envers la toxicité, l'allergenicité, la perte de digestibilité, les qualités nutritionnelles. Par exemple, on sait que les hautes températures permettent de réduire l'allergenicité par le fait qu'elles dénaturent des protéines, mais qu'elles entraînent aussi la formation de nouveaux sites antigéniques. Les hautes pressions pourraient-elles permettre de rendre des produits alimentaires hypoallergéniques? Autant de questions qui restent à ce jour en suspens.

2. Caractéristiques des muscles

2.1. Le muscle squelettique

2.1.1. La composition du muscle strié squelettique

Pour l'ensemble des mammifères, la composition et la structure des muscles squelettiques sont sensiblement identiques. Le bovin est composé d'une carcasse comprenant 105 muscles différents qui forment la chair. Il existe des différences au sein d'une même carcasse sur les différents muscles, et d'une carcasse à une autre la tendreté varie pour un même morceau.

Les pourcentages des principaux constituants du muscle de mammifère répertoriés par Lawrie (1985) sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Constituants du muscle squelettique de mammifère.

Constituants	Quantité
Eau	75%
Protéines	19% composé par 11,5% de protéines myofibrillaires, 5,5% de protéines sarcoplasmiques et 2% de collagène
Lipides	2,5%
Substances non protéiques solubles	2,3% composé par 1,65% de substances azotées et 0,65% de d'autres substances (minéraux : phosphates solubles, potassium, sodium, magnésium, calcium, zinc, traces de métaux)
Glucides	1,2%
Vitamines	traces

La composition chimique des poissons est variable et ceci selon l'espèce considérée et même d'un individu à l'autre si son âge, son sexe, son environnement ou sa saison de capture

sont différents. Tout comme les mammifères, les principaux constituants des poissons peuvent être divisés en catégories présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 8).

Tableau 8 : Caractérisation qualitative et quantitative du muscle de poisson (Love, 1970).

Constituants	Quantité
Eau	66-81 % avec un maximum de 96 % et un minimum de 28 %
Protéines	16-21 % avec un maximum de 28 % et un minimum de 6 %
Lipides	0,2-25 % avec un maximum de 67 % et un minimum de 0,1 %
Glucides	Inférieur à 0,5 %
Minéraux	1,2-1,5 % avec un maximum de 10,5 % et un minimum de 0,4 %

2.1.2. La structure histologique du muscle

Un muscle strié a généralement la forme d'un fuseau aux extrémités duquel se trouvent les tendons qui assurent la fixation sur les os. Ce muscle est un assemblage de faisceaux parallèles appelés fascicules enveloppés dans un tissu conjonctif élastique constitué de collagène (l'endomysium) : chaque faisceau, délimité par le périnysium, est formé de fibres musculaires disposées également de façon parallèle. Les fibres sont des cellules longues et fines plurinucléées de plusieurs centimètres de long composées de plusieurs fibrilles capables de se contracter : les myofibrilles. Le sarcolemme est la membrane qui entoure la fibre musculaire. Ces myofibrilles constituées d'une association de stries claires et foncées définissent le sarcomère. L'alignement régulier des sarcomères est assuré par un réseau tridimensionnel cytosquelettique. Ce dernier assure le maintien transversal et longitudinal par des filaments intermédiaires reliant les sarcomères entre eux et par des costamères, structures reliant les myofibrilles et le sarcolemme.

Chaque fibre musculaire se présente sous la forme d'un minuscule cylindre dont le diamètre est variable, allant de 10 à 100 μm et d'une longueur comprise entre 1 et 40 mm (Pearson & Young, 1989). Elles sont regroupées par 20 ou 50 et présentent une alternance régulière de bandes sombres et claires dont la parfaite correspondance au niveau d'une myofibrille à l'autre donne à la fibre un aspect strié transversal.

On distingue classiquement deux types de fibres. La majorité des muscles sont composés d'un panachage de ces différentes fibres. Les fibres de type I sont très riches en myoglobine (d'où leur coloration rouge) et en enzymes oxydatives. Elles contiennent de nombreuses mitochondries, où sont concentrées les enzymes intervenant dans le cycle de Krebs et sont riches en substrats du métabolisme aérobie (glycogène, lipides). Ce sont des fibres à contractions lentes. Les fibres II quant à elles sont moins riches en myoglobine (donc de couleur blanche) et en enzymes oxydatives. Par exemple, le muscle *pectoralis* du poulet contient essentiellement des fibres de ce type, ce qui explique sa couleur. Leur vitesse de contraction est rapide. Elles

renferment peu de mitochondries et sont peu capillarisées. Trois formes sont différenciées : IIa, IIb et IIc. Les fibres IIc pourraient être des fibres intermédiaires dues aux transformations des fibres IIa et IIb en type I.

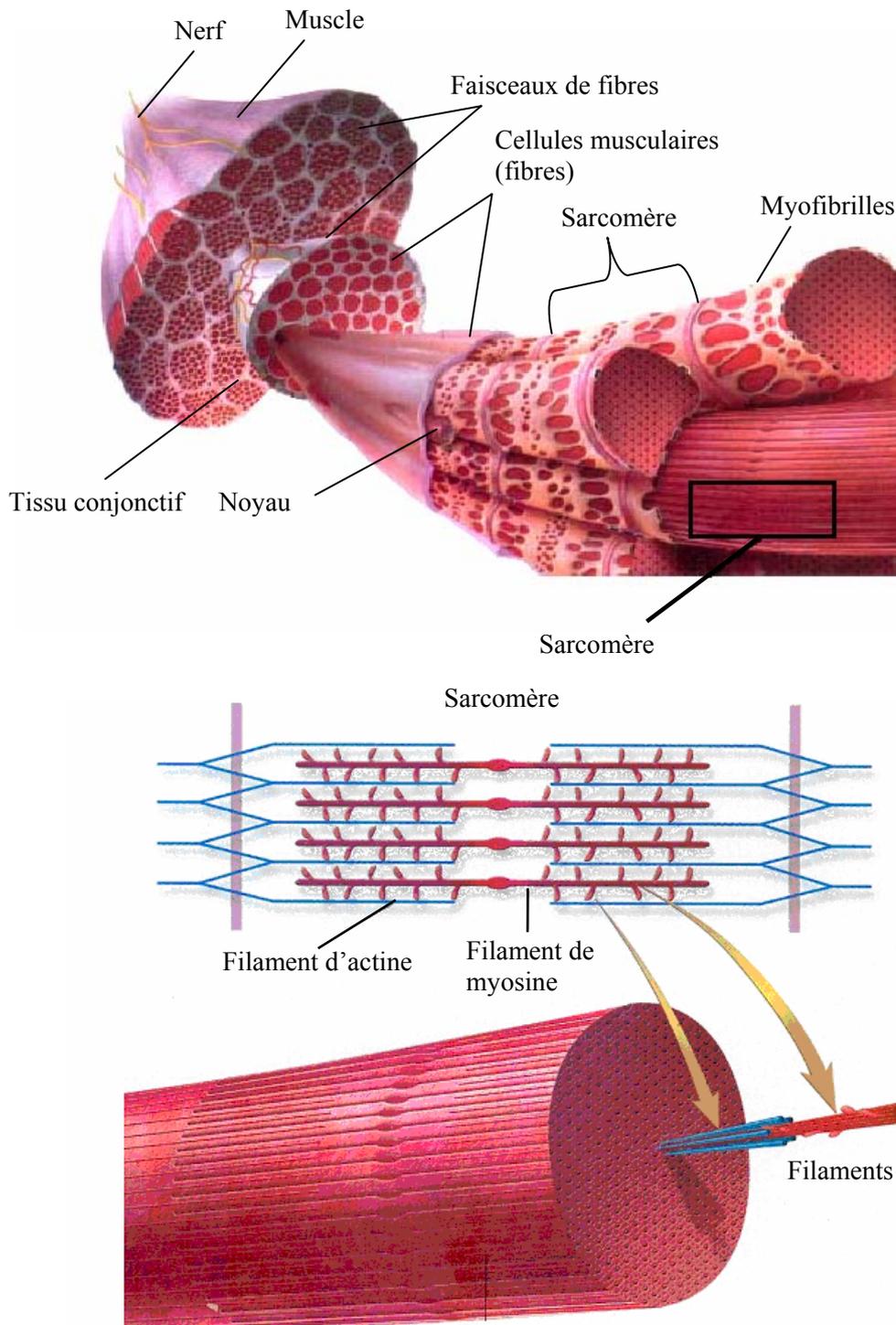


Figure 8 : Représentation schématique du muscle.

2.1.3. L'ultrastructure du système contractile

La figure 9 illustre la structure de ce système contractile. Chaque sarcomère est délimité par des stries foncées : les lignes Z (Zwischen signifiant entre en allemand) appelées aussi disques Z. Le sarcomère est compris entre deux lignes Z.

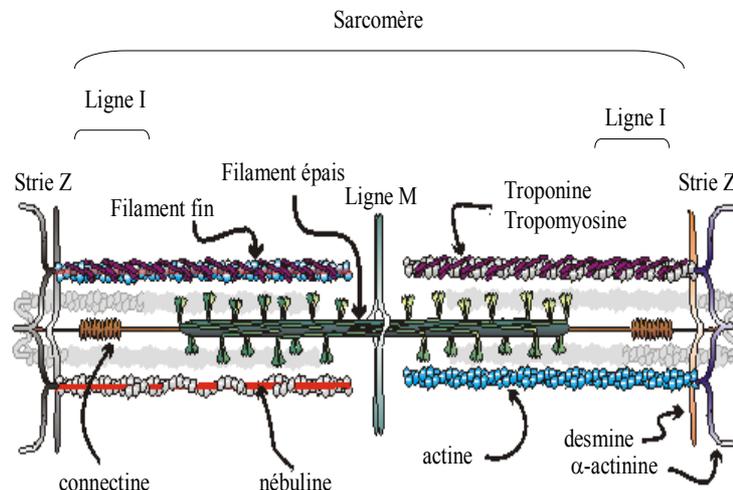


Figure 9 : Constituants du sarcomère.

Au sein d'une myofibrille, il existe une alternance de bandes claires et de bandes sombres traduisant l'existence de filaments de deux sortes : les filaments épais et les filaments minces. Les filaments minces, dont le diamètre varie de 5 à 8 nm, sont constitués d'actine. Les filaments d'actine sont traversés par la ligne Z en leur milieu. Une moitié de chacun des filaments d'actine pénètre dans deux sarcomères voisins en une seule fois. A l'endroit où le sarcomère n'est constitué que de filament d'actine, c'est à dire à proximité de la ligne Z, on parle de bande I (Isotrope). Les filaments épais, dont le diamètre varie de 14 à 18 nm, sont constitués essentiellement par de la myosine. Ces filaments définissent la bande A (Anisotrope). D'autres protéines, (protéines C, H et X) en quantité plus restreinte, constituent les filaments épais et se situent à la surface des filaments de myosine. La région centrale et claire de la bande A représente la zone H, où l'on ne trouve que des filaments de myosine. L'épaississement des filaments de myosine constitue la ligne M (Mitellini). Il est dû à des filaments transversaux composés de desmine et de vimentine perpendiculaire à la myosine assurant le maintien des sarcomères au niveau de la zone H.

La strie Z assure la liaison entre les filaments fins des sarcomères adjacents.

Le tableau ci-dessous répertorie les différents composants et précise leurs proportions, leurs localisations et leurs poids moléculaires respectifs.

Tableau 9 : Composition, rôle et localisation des protéines myofibrillaires (d'après Pearson & Young, 1989).

Composition	Pourcentage des protéines myofibrillaires	Localisation dans le sarcomère	Poids moléculaire (kDa)
Protéines contractiles			
Myosine	50	Filaments épais	500
Actine	20	Filaments fins	42
Protéines régulatrices			
Tropomyosine	3	Filaments fins	68
Troponine C	1,15	Filaments fins	18
Troponine I	1,35	Filaments fins	23
Troponine T	1,95	Filaments fins	37
α -Actinine	1	Disque Z	201
Eu-Actinine	0,3	Disque Z	42
γ -Actinine	<0,01	Filaments fins	35
β -Actinine	<0,01	Bande A	71
Protéines du cytosquelette			
Titine (connectine)	5 à 8	Sarcomère	2800
Nébuline	3	Ligne M	500
Protéine C	1,5	Filaments épais	121
Paratropomyosine	<1	Bande A et I	68
Myoméline/Protéine M	0,5	Ligne M	185/165
Desmine (skeletine)	<0,2	Disque Z	55
Filamine	0,1	Disque Z	480
Vimentine	0,1	Disque Z	57
Protéine X	0,2	Disque Z	152
Protéine I	0,1	Filaments épais	50
Protéine F	0,1	Filaments épais	121
Protéine kinase	0,1	Ligne M	74
Protéine H	0,18	Filaments épais	125

2.2. Les protéines du muscle squelettique

Les protéines musculaires peuvent se ranger dans trois groupes distincts : les protéines du tissu conjonctif, les protéines myofibrillaires et les protéines sarcoplasmiques.

2.2.1. Les protéines du tissu conjonctif

Le tissu conjonctif assure le maintien de la structure. Il constitue la partie très peu mobile du muscle. Ce tissu permet de soutenir le système musculaire et intervient au niveau de la transmission des forces de la contraction myofibrillaire vers le squelette par l'intermédiaire des tendons. Il est impliqué directement dans le phénomène de tendreté de la chair.

Il représente entre 0,4 et 3% de la masse musculaire et environ 10% des protéines musculaires totales. Ce tissu est constitué essentiellement de collagène et d'élastine qui sont deux protéines fibreuses.

Le collagène est le composé le plus important puisqu'il représente environ 80% du poids du tissu conjonctif. C'est une protéine fibreuse comprenant une séquence tripeptidique d'acides aminés se répétant. Cette séquence est du type Glycine-X-Y, où X et Y sont des acides aminés. Dans la composition du collagène, 3 acides aminés prennent une part assez importante : la glycine, la proline et l'hydroxyproline (selon les types de collagène). L'hydroxyproline peut être considérée comme un marqueur spécifique du tissu conjonctif et son dosage permet d'évaluer la quantité de collagène au sein du muscle (Etherington, 1991).

La molécule de base de collagène est formée de trois chaînes polypeptidiques reliées par des liaisons covalentes et hydrogènes, afin de former une triple hélice. Cet assemblage en longueur donne des fibrilles de diamètres variables selon la nature du collagène. Entre les fibres et les fibrilles, des liaisons, de nombre et de nature variables, peuvent se former. C'est justement le nombre et la nature de ces liaisons qui permettent de définir le degré de réticulation du collagène et donc de déterminer la dureté de la viande ; ainsi plus le degré de réticulation sera important, plus les fibres et les fibrilles seront solidement ancrées les unes aux autres, et plus la viande sera dure.

Les structures tridimensionnelles du collagène, au sein du tissu conjonctif ne sont pas toutes identiques. Pour l'endomysium, le collagène forme un feutrage dense de fibrilles. Pour le pérимыsium, un feutrage lâche permet la cohésion entre les fibres musculaires. Et enfin, pour l'épимыsium, un entrecroisement de fibres de collagène ondulées forme une enveloppe continue autour des fibres musculaires. Ces différentes structures ont des rôles d'amortisseur et de transmission de tension au sein du muscle.

Dans le cas de la viande, le collagène est le principal responsable de sa tendreté, pour un muscle qui n'a subi encore aucune maturation.

L'élastine, quant à elle, est une protéine également présente dans le tissu conjonctif. Elle ressemble au collagène par certaines de ses propriétés mais en est très différente par d'autres. Elle représente moins de 10% de la masse du tissu conjonctif. Sa teneur dépend du type de muscle ainsi que de sa fonction. Sa structure est faite de chaînes enroulées au hasard et manifeste des propriétés élastiques, contrairement au collagène. Cette protéine fibreuse est constituée de deux types de fibres (Rowe, 1986) : des fibres épaisses (5 à 10 μm de diamètre) orientées parallèlement aux cellules musculaires et des fibres fines (1 à 2 μm de diamètre) qui suivent l'alignement des fibres de collagène du pérимыsium et de l'endomysium. De plus, elle contribuerait à l'augmentation de la cohésion des myofibrilles (Totland *et al.*, 1988).

2.2.2. Les protéines myofibrillaires

Dans la composition du cytosquelette des cellules musculaires, de multiples protéines entrent en jeu. Les protéines myofibrillaires sont structurées selon un grand axe. Parmi ces protéines contractiles majeures, il existe la myosine et l'actine.

La **myosine** (cf. figure 10) est la protéine la plus abondante. Elle représente 43% des protéines contractiles (Yates & Greaser, 1983). C'est une protéine hexamérique de haut poids moléculaire (environ 500 kDa). Elle est constituée de deux chaînes lourdes de 200 kDa chacune et de 4 chaînes légères de 14 à 20 kDa chacune. Chaque myofilament (cf. figure 11) comprend entre 300 et 400 molécules de myosine. Cette molécule comprend deux parties : la queue principalement hélicoïdale et deux têtes globulaires. C'est sur la tête de myosine que se trouve un site comportant une enzyme spécifique à l'hydrolyse de la molécule d'ATP et les sites de fixation à l'actine. Seule la molécule d'ATP fournit l'énergie nécessaire à la contraction musculaire. La queue, quant à elle, est responsable de la flexibilité de la molécule et de l'assemblage des molécules de myosine dans le myofilament épais par des liaisons principalement ioniques.

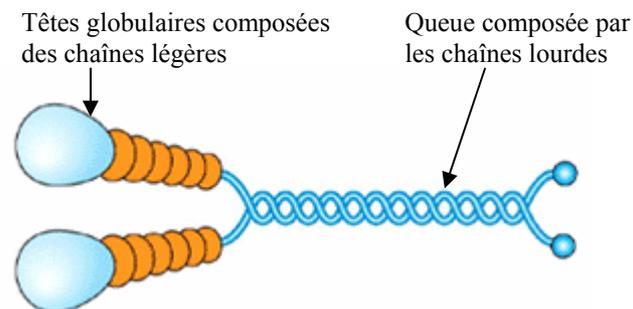


Figure 10 : Représentation schématique d'une molécule de myosine

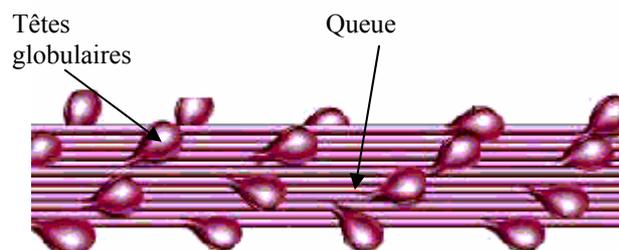


Figure 11 : Représentation schématique d'un myofilament épais.

L'**actine** représente 22% des protéines myofibrillaires. Elle se localise au niveau des myofilaments fins (cf. figure 12). Elle a un poids moléculaire de 42 kDa. Sous forme globulaire, elle peut se lier à des ions bivalents comme le Ca^{2+} et Mg^{2+} , à un ATP ou ADP ainsi qu'à une molécule de myosine. Le filament fin d'actine est d'une structure un peu plus complexe. Les filaments d'actine sont des polymères fibreux formés de l'association de monomères d'actine globulaires. Ils entourent, en nombre variable suivant les espèces et les types de muscles, les filaments de myosine, la tropomyosine, et périodiquement, se retrouvent dans le complexe de la troponine, formé par ces 3 éléments distincts.

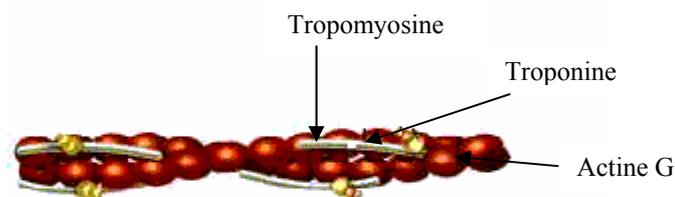


Figure 12 : Représentation schématique d'un myofilament fin.

2.2.3. Les protéines régulatrices

Elles sont localisées essentiellement au niveau des myofilaments fins. Elles représentent environ 10% des protéines myofibrillaires. On distingue la tropomyosine qui est présente à raison d'une molécule pour sept monomères d'actine, et la troponine, qui sous forme complexée, est fixée à la tropomyosine.

La **tropomyosine** est une protéine allongée formée de 2 chaînes hélicoïdales α et β de 33 kDa chacune. Dans le muscle au repos, elle se dispose en enroulement le long des filaments d'actine, dans le sillon formé par les deux hélices qui les constituent. Dans cette position, la tropomyosine empêche l'interaction entre les sites d'accrochage de l'actine et les têtes de la myosine.

Le groupe des **troponines** est constitué de 3 protéines organisées en complexe fixées à intervalles réguliers sur la tropomyosine. Chacune d'elles a un rôle spécifique au niveau de la contraction musculaire. On distingue la troponine C qui peut fixer 4 ions Ca^{2+} avec une forte affinité, la troponine I, facteur inhibant l'activité du complexe au repos et, avec la tropomyosine, l'interaction entre l'actine et la myosine, ainsi que la troponine T qui stabilise le complexe et le fixe à la tropomyosine.

2.2.4. Les protéines du cytosquelette

Elles représentent environ 25% des protéines myofibrillaires. Leur rôle est d'assurer l'intégrité structurale et fonctionnelle de la myofibrille. Ces protéines s'organisent en réseaux

intermédiaires et longitudinaux matérialisés par des filaments. Les filaments longitudinaux sont essentiellement constitués de deux protéines, la titine et la nébuline (Horowitz *et al.*, 1986). Les filaments intermédiaires sont constitués principalement de desmine et synémine.

2.2.4.1. Les filaments intermédiaires

Ce réseau de filaments permet de maintenir les myofibrilles alignées les unes par rapport aux autres et permet leur attachement au sarcolemme. Ils sont constitués principalement par la desmine et la synémine.

La **desmine** représente 0,35% des protéines myofibrillaires. Elle a un poids moléculaire de 53 kDa. C'est la protéine majoritaire des filaments transversaux du cytosquelette. Ces filaments intermédiaires de desmine forment un réseau abondant au niveau des stries Z, avec quelques filaments tendus longitudinalement le long du sarcomère. La desmine assure une liaison entre les myofibrilles adjacentes.

La **synémine** a un poids moléculaire de 220 kDa. Elle est située au niveau des bandes Z et elle assure la liaison de la desmine avec les stries Z.

Ces liaisons au sarcolemme, par l'intermédiaire de la dystrophine, sont localisées au niveau de la bande M et de la strie Z, sur les costamères. Ces costamères sont formés de protéines transmembranaires comme la sialoglycoprotéine Sgp 130, d'intégrines, de vinculine, de taline ou d'actine. Ils permettent également l'attachement du sarcolemme aux molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine ou la laminine.

2.2.4.2. Les filaments longitudinaux

Les filaments longitudinaux représentés principalement par la titine et la nébuline constituent une armature longitudinale de renforcement du sarcomère sous la forme d'un troisième réseau parallèle imbriqué dans celui des filaments fins et épais.

La **titine** ou **connectine** est une molécule géante existant sous deux formes représentant 10% des protéines myofibrillaires. Les formes α et β ont des masses moléculaires respectives de 2800 et 2100 kDa. La forme la plus légère résulte de la protéolyse endogène de la molécule de titine native. Cette protéine fine et longue se situe au niveau de la strie Z et elle s'étend jusqu'à la bande M (Fürst *et al.*, 1988). Elle forme un troisième type de filaments longitudinaux dans les sarcomères. Son rôle serait mécanique et permettrait de maintenir la myosine dans la partie médiane du sarcomère en assurant une partie élastique reliant l'extrémité des filaments épais de myosine à la strie Z.

La **nébuline** est une protéine d'environ 800 kDa. Cette protéine très insoluble représente environ 5% des protéines myofibrillaires. Grâce à son extrémité C-terminale, elle se lie à l' α -actinine au niveau de la strie Z. Elle permettrait de contrôler la longueur du filament fin et régulerait la contraction en modifiant l'interaction entre l'actine et la myosine. Les filaments de nébuline sont associés aux filaments fins d'actine. Tous ces filaments jouent un rôle dans l'élasticité des myofibrilles.

2.2.4. Les protéines sarcoplasmiques

Les protéines sarcoplasmiques, présentes dans le sarcoplasme des fibres musculaires, sont composées essentiellement d'enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire. Elles représentent environ 30% des protéines totales du muscle. Elles se répartissent dans quatre classes : la classe nucléaire (nucléoprotéines, lipoprotéines), la classe mitochondriale (lipoprotéines, mitochondries, peroxyosomes, lysosomes), la classe microsomale (microsomes, réticulum sarcoplasmique, ribosomes) et la classe cytoplasmique (enzymes de la glycolyse, enzymes protéolytiques, myoglobine, hémoglobine).

2.3. Le poisson : particularités de la structure des différents muscles et du tissu conjonctif

Chez les poissons, le tissu musculaire occupe une part importante de la masse corporelle par comparaison avec les autres vertébrés. Les principaux muscles du corps d'un poisson sont disposés sur les côtés, le long du tronc et de la queue. Ces muscles composant la chair de poisson sont au nombre de trois : les grands latéraux, les muscles rouges et les muscles des nageoires.

Chez les poissons, les muscles se caractérisent par une structure en métamères (en segments placés à la suite les uns des autres) peu présente chez les mammifères. La partie principale de la chair de poisson est formée de longs muscles divisés en feuillets de forme approximativement conique, dont le sommet est dirigé vers la tête. Ces nombreux segments appelés myotomes ou myomères ont une forme en W (cf. figure 13) et s'emboîtent les uns dans les autres. Ces myotomes sont délimités par des myoseptes ou myocommes conjonctifs dans lequel les fibres musculaires s'insèrent (cf. figure 14). Les myocommes sont très fins. On sait que la fibre musculaire est la cellule de base constituant le muscle. Elle s'étend entre deux myocommes. Ces cellules sont reliées entre elles par du tissu conjonctif plus abondant autour des fibres dans le muscle rouge que le muscle blanc. A partir d'observations microscopiques, il apparaît une similitude entre la structure de la cellule de muscle de poisson et celle des muscles striés de mammifères.

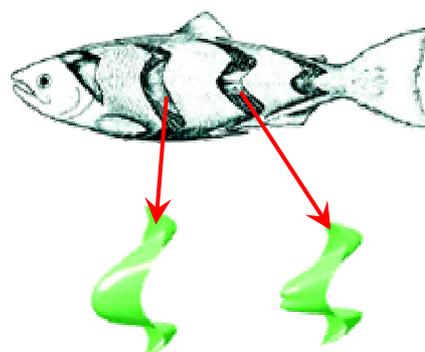


Figure 13 : Forme des myotomes chez le saumon (d'après Van Leeuwen, 1999).

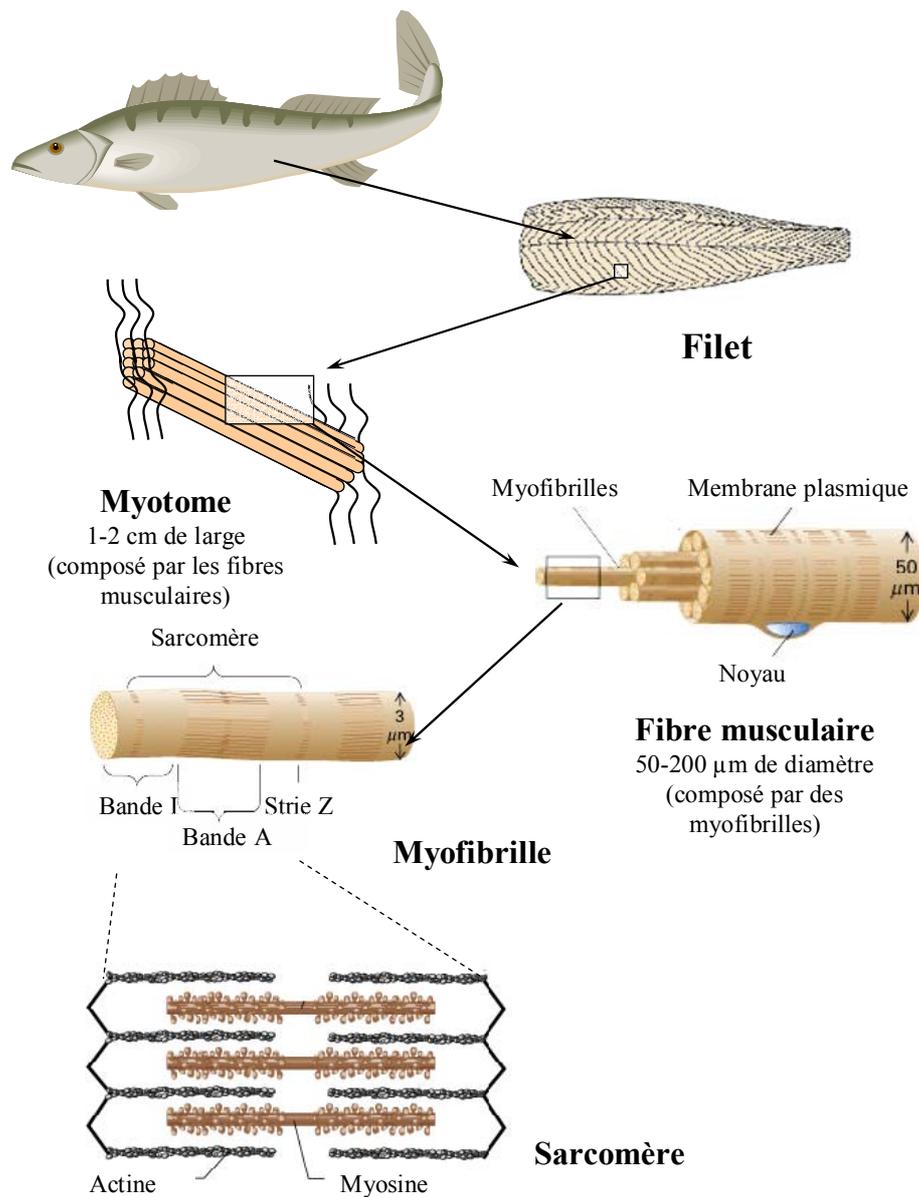


Figure 14 : Schématisation de l'organisation du muscle de poisson.

2.3.1. Les différents muscles

□ Les grands latéraux

Ils se trouvent de part et d'autre de la colonne vertébrale. Ils ont une forme de fuseaux. Le nombre de vertèbres du poisson définit le nombre de myotomes de ces muscles.

Selon les espèces de poisson, la couleur de la chair est différente. Les espèces de poisson vivant en haute mer (y compris les espèces de poisson pélagiques), sont des poissons à chair sombre ou à chair rouge. Cela s'explique par le fait que ces muscles fournissent de gros efforts et sont très irrigués. Pour les espèces de poisson qui vivent sur les fonds à proximité du rivage (c'est à dire les espèces demersales), les muscles sont à chair blanche. Cette distinction de couleur des muscles caractérise une physiologie différente.

□ Les muscles rouges

Cette notion de muscles rouges n'est pas à confondre avec celle de poisson à chair rouge. Ils sont localisés sous la peau, sur les flancs, le long des deux lignes médianes latérales. Ils sont caractéristiques des téléostéens (qui comprend la presque totalité des espèces actuelles de poissons) où ils sont nettement distincts entre la peau et les grands latéraux.

En général, ils forment une lame musculaire depuis la partie thoracique jusqu'à la queue et représentent la même structure en feuillets que celle décrite sur la figure 14, mais la structure des fibrilles qui les composent est différente de celle des muscles blancs.

Ces muscles participent au déplacement du poisson ce qui explique leur forte vascularisation.

La réserve lipidique de ce type de muscle est élevée : elle peut représenter jusqu'à 30% du poids.

□ Les muscles commandant les nageoires

Ces muscles ont un rôle important car ils permettent de stabiliser et de diriger le poisson dans l'espace tridimensionnel.

2.3.2. Le tissu conjonctif

Le tissu conjonctif dans le poisson se trouve en moins grande proportion par rapport aux animaux à sang chaud. Il constitue une sorte de membrane enveloppant ainsi le muscle. Il est composé de filaments fins réticulés composés de collagène, de réticuline, d'élastine et d'une substance non structurée dite fondamentale.

3. La transformation du muscle en viande

Après l'abattage de l'animal, la carcasse subit des modifications contribuant en particulier à son attendrissement, qui est une des qualités les plus importantes et les plus recherchées par les consommateurs. Le processus d'attendrissement pour la viande fait l'objet de nombreuses controverses.

Le taux d'attendrissement varie entre les différentes espèces de mammifères avec 80 % d'attendrissement réalisé en environ cinq jours après la mort de l'animal pour le porc et en au moins deux semaines pour le bœuf à une température réfrigérée. D'autres espèces comme le lapin ou l'agneau requièrent des temps de stockage intermédiaires. De plus, pour la volaille et plus particulièrement le poulet, l'attendrissement est très rapide, totalement accompli en 48 heures.

3.1. Les différentes phases

Au cours de la maturation à l'état réfrigéré, lorsque le muscle est transformé en viande, le muscle est soumis à une transformation partagée en trois phases.

La première phase dite « pantelante » concerne les trois premières heures après l'abattage. Il se caractérise par un muscle « vivant » et flasque. La tendreté du muscle à cet instant est équivalente à celle du muscle après une maturation d'une quinzaine de jours.

Ensuite la phase de rigidité cadavérique ou *rigor mortis* s'installe progressivement (pendant 24 heures dans le cas de la viande de bœuf). Elle se caractérise par des muscles plus durs et inextensibles. Les muscles deviennent alors inextensibles et les axes osseux sont difficiles à déplacer les uns par rapport aux autres. La graisse se solidifie et contribue également à augmenter la fermeté de la viande. L'installation de la rigidité cadavérique se fait toujours dans le même ordre. Elle commence par la tête, le cou, les membres antérieurs, la région dorsale pour finir enfin par les membres postérieurs. Au cours de cette phase, le tissu musculaire va connaître une acidification. En effet, la circulation sanguine étant stoppée, l'oxygène n'arrive plus dans les muscles qui passent donc rapidement en anaérobiose. Les dernières réserves énergétiques de glycogène sont épuisées et transformées en acide lactique. Cet acide, du fait de l'arrêt de la circulation sanguine, n'est pas éliminé du muscle : il s'accumule et contribue à l'abaissement du pH. Plus le pH du muscle diminue, plus le muscle devient dur. Au bout de 24 heures, le muscle atteint son maximum de dureté, le pH est alors stable et proche de 5,4.

Enfin la phase de maturation conduit à un attendrissement du muscle. Lors de cette phase dont la durée peut atteindre plusieurs jours (10 jours environ pour la viande de bœuf) (Ouali, 1990), la dureté est réduite de 80%. Après la phase de *rigor mortis*, la viande commence à s'attendrir sous l'effet de la maturation. La maturation n'est à relier en aucun cas avec un phénomène bactériologique. Il s'agit d'un phénomène naturel, qui résulte du relâchement des liens entre les fibres musculaires, liens établis lors de la *rigor mortis*. Ce relâchement se fait grâce à l'action de diverses enzymes capables de dégrader les protéines du muscle. La dégradation de ces protéines conduit au relâchement des myofibrilles, qui serait responsable de l'attendrissement de la texture. Ces enzymes sont des endoprotéases. Des réactions chimiques se produisent également au niveau des lipides : sous l'action de lipases, les lipides se transforment et développent une odeur et une saveur caractéristique d'une viande « mûre ». Mais, si la maturation de la viande se prolonge trop, ces lipides se détériorent et forment alors des composés qui donnent une odeur et un goût rance. Au cours de la maturation, seuls les protéines et les lipides de la viande sont transformés. Le collagène n'est pas modifié. Il caractérise la dureté basale de la viande.

3.2. Mécanismes impliqués dans le processus de maturation

La maturation du muscle en viande dépend de nombreux facteurs biologiques et technologiques : l'action protéolytique des différents systèmes enzymatiques, la température de stockage du muscle, la modification de la gamme du pH, la pression osmotique, la force ionique. Les mécanismes impliqués dans l'attendrissement de la viande sont des phénomènes enzymatiques et physico-chimiques (Ouali, 1990) entre lesquels il existe probablement une synergie.

3.2.1. Les mécanismes physico-chimiques

La température basale de l'animal vivant est d'environ 38°C. Après l'abattage, la température de la carcasse, stockée à 4°C, diminue progressivement. La morphologie de la carcasse affecte la vitesse de refroidissement des muscles selon la localisation (plus ou moins à l'extérieur). De plus, la composition intrinsèque du muscle aussi joue un rôle : la matière grasse isole plus ou moins les muscles et affecte cette vitesse de refroidissement.

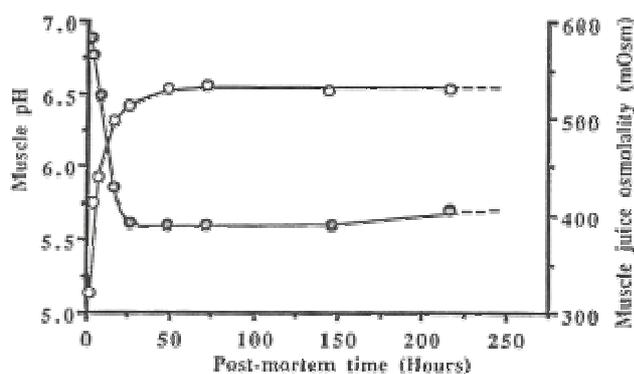


Figure 15 : Évolution du pH du muscle et de la pression osmotique de bovin au cours de la maturation (Ouali, 1990) (pH : ○ ; pression osmotique : ◊).

Le pH est le paramètre de la viande le plus souvent mesuré. Son suivi au cours de la maturation est un moyen de contrôler la qualité. Juste après l'abattage de l'animal, le pH au sein du muscle est aux alentours de 6,8 (cf. figure 15). Après la mort de l'animal, le muscle est privé d'oxygène et devient anoxique. Le maintien de l'homéostasie musculaire nécessite la synthèse de composés riches en énergie tel que l'ATP. Les réactions de synthèse de l'ATP sont assurées par la dégradation de la créatine phosphate et essentiellement par la glycolyse et la glycolyse anaérobie. Les réactions de dégradation de l'ATP et du glycogène ont été décrites en détail par Bendall (1973). Durant l'installation de la rigidité cadavérique, l'hydrolyse de l'ATP s'accompagne de la libération de protons contribuant à la diminution du pH. Le pH des muscles tend à se stabiliser à une valeur appelée pH ultime, généralement comprise entre 5,7 à 5,4 après 24 heures de stockage. Cette baisse de pH atteint progressivement le point isoélectrique des protéines. Ceci entraîne une diminution des liaisons entre les protéines et l'eau ainsi qu'une baisse du pouvoir de rétention de l'eau. Le pH ultime dépend de la concentration en glycogène dans les muscles au moment de l'abattage.

La pression osmotique augmente juste après la mort de l'animal et tend à se stabiliser à la fin de la période de la rigidité cadavérique (cf. figure 15). Sa valeur physiologique initiale est même doublée. Ces modifications ont été mesurées par Bonnet *et al.*, 1992. Elles correspondent à la formation de métabolites et à la libération d'ions libres initialement concentrés dans le réticulum sarcoplasmique et dans les mitochondries (Ouali, 1990). Parallèlement à l'acidification du muscle, la pression osmotique augmente à cause de l'accumulation d'acide lactique. Cette augmentation de la pression osmotique a deux effets principaux. Dans un premier temps, elle

participe à une altération des structures contractiles par une solubilisation des protéines myofibrillaires. Ainsi, la maturation sera plus rapide dans un muscle dont la pression osmotique est importante (Ouali, 1992). Et dans un deuxième temps, elle permet de réguler et de faciliter l'action protéolytique d'enzymes comme les calpaïnes, qui sont sensibles à de fortes concentrations salines.

3.2.2. Mécanismes enzymatiques

Au cours de la maturation dans des conditions réfrigérées, les composantes myofibrillaires du muscle sont modifiées et permettent ainsi à la viande de s'attendrir. Les raisons de cet attendrissement ne sont pas encore bien définies. Il demeure encore un grand nombre de contradictions. Il existe différents systèmes protéolytiques décrits dans la littérature impliqués dans le phénomène d'attendrissement : comme le système calpaïnes-calpastatine, le système cathepsines-cystatines et plus hypothétiquement le système protéasome. La μ - et la m-calpaïne ainsi que les protéases lysosomales, c'est à dire les cathepsines D, B, L et H sont les plus souvent retenues pour être impliquées dans l'attendrissement du muscle, même si souvent le système calpaïque est décrit responsable en majorité de l'attendrissement de la viande pendant la période *post-mortem* (Christensen, 2003).

Les calpaïnes ont comme substrats préférentiels : les composantes de la strie Z comme la desmine, la filamine, la nébuline, les protéines de la ligne M, la troponine T, la tropomyosine et la connectine ; mais par contre, elles ne s'attaquent ni à l'actine ni à la myosine (Koochmaraie, 1992b). Et elles contribuent aussi à l'apparition d'un fragment de 30 kDa. *In vitro*, ces modifications sont également reproduites (Ouali *et al.*, 1983, Taylor *et al.*, 1995b). Cependant toutes les modifications observées sur le muscle ne sont pas reliées à l'action seule des calpaïnes (Taylor *et al.*, 1995b). Par exemple, les modifications observées sur la bande I ne sont pas retrouvées lors de l'incubation des myofibrilles avec des calpaïnes. Cela confirme le rôle majoritaire mais non exclusif des calpaïnes dans l'attendrissement du muscle pendant la période *post-mortem*.

Le système lysosomal participe également aux modifications. L'incubation des myofibrilles avec un extrait lysosomal ou avec la cathepsine L montre que l'action protéolytique se localise au niveau de la bande I (Mikami *et al.*, 1987). Quant aux cathepsines B, H et D, elles dégradent plus particulièrement les myofibrilles de la bande M et celles localisées au niveau de la jonction entre la bande A et la bande I (Ouali, 1992). Les cathepsines hydrolysent essentiellement la myosine et l'actine. De plus, l'attaque des protéines contractiles se fait selon des points stratégiques.

Le tableau 10 récapitule les substrats du système calpaïque et du système lysosomal dans la viande.

<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Calpaïnes</i> 	
Troponine T	
Strie Z (desmine)	
Connectine	
Protéines de la strie M	
Tropomyosine	
<hr/>	
<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Enzymes lysosomales comprenant les cathepsines B, D, H et L</i> 	
Troponine T	
Troponine I	
Protéines C	
Chaîne lourde de la myosine	
Chaîne légère de la myosine	
Actine	
Tropomyosine	
Nébuline	
Titines	
α -Actinine	
Collagène	
Mucopolysaccharides	

Tableau 10 : Sites d'actions des enzymes protéolytiques durant le vieillissement du muscle.

Selon Ouali (1992), l'attendrissement *post-mortem* peut seulement s'expliquer par une action synergique des systèmes calpaïques et lysosomaux. Cette théorie est celle qui est la plus souvent adoptée. La contribution du protéasome est peu étudiée et donc souvent négligée bien que d'après les quelques études réalisées, le protéasome soit capable de dégrader la majorité des protéines myofibrillaires (Mykles, 1989 ; Mykles & Haire, 1995).

3.3. Les techniques permettant d'améliorer ou d'écourter le temps de maturation

De façon conventionnelle, l'attendrissement de la viande bovine se fait par un stockage *post-mortem* à une température réfrigérée pendant une durée d'environ trois semaines. Certaines méthodes peuvent permettre d'accélérer ce processus et ainsi avoir une application dans l'industrie.

□ L'accrochage de la carcasse : la technique d'accrochage des carcasses influe sur la tendreté de la viande. Il existe différentes techniques d'accrochage : la suspension pelvienne, la suspension par la « crête sciatique » et la suspension par le tendon d'Achille. Pour être efficace, cette technique doit être appliquée le plus tôt possible après l'abattage, avant l'installation de la *rigor mortis*.

La suspension pelvienne a un effet significativement favorable sur la tendreté d'une majorité de muscles. De plus, le gain de tendreté procuré par cette technique est entre 1 à 2 fois

le gain obtenu lors d'une maturation de 7 jours pour une carcasse accrochée par le tendon d'Achille.

Ces résultats probants obtenus jusqu'à ce jour permettent d'affirmer que la suspension pelvienne se situe parmi les facteurs pouvant influencer le plus sur la tendreté des viandes de gros bovins, au même titre que les conditions de réfrigération des carcasses ou que la durée de maturation des viandes.

□ Les traitements par marinage dans des solutions acides : Les traitements par marinage dans des solutions acides comme l'acide acétique ou l'acide lactique ont été traditionnellement utilisés comme des moyens pour attendrir la viande. Ces traitements diminuaient la résistance mécanique. Mais une des limites de ce procédé est la faible pénétration du liquide dans le muscle. Des injections permettent alors une diffusion plus rapide dans le muscle. Il en résulte une diminution de la force mécanique et une augmentation de la tendreté dans un temps plus court (Cannon *et al.*, 1993; Ertbjerg *et al.*, 1995 ; Ertbjerg *et al.*, 1999).

Les effets des acides sur la texture de la viande dépendent de la chute de pH produite. Au cours de ce mode de traitement, une combinaison de mécanismes se met en place : un gonflement des fibres musculaires, un relâchement direct du tissu conjonctif (Ertbjerg *et al.*, 1995) et une accélération de l'attendrissement *post-mortem* par des protéases comme les cathepsines, car elles ont une activité optimale avec un pH faible.

Le marinage conduit à un gonflement considérable de la viande avec l'acide acétique.

Les travaux dans lesquels l'acide lactique est utilisé, rapportent que le pH atteint est plus haut (vers 4,5) et que le gonflement est limité.

Cependant, l'injection d'acide lactique en période *pre* et *post-rigor* entraîne une chute rapide du pH aux alentours de 5. D'autres effets sont observés : une accélération de la libération des enzymes lysosomales dans le cytosol, une dégradation importante de la chaîne lourde de la myosine, des altérations de l'ultrastructure des myofibrilles ce qui inclut un relâchement ou une rupture de la strie M, et une diminution de la stabilité à la chaleur du collagène. Finalement, on voit une amélioration nette des caractéristiques de la texture au bout de 2 jours *post-mortem* avec peu d'amélioration lorsque le stockage s'étend à 14 jours *post-mortem* (Berge *et al.*, 2001 ; Lewis & Purslow, 1991).

□ La stimulation électrique : la stimulation électrique sur les carcasses après la mort de l'animal est un procédé qui permet d'obtenir des effets significatifs sur la dureté de la viande. Il est maintenant établi que la stimulation électrique augmente le taux de glycolyse *post-mortem* et donc l'abaissement du pH. Ainsi, le muscle atteint rapidement un pH inférieur à 6 avant d'être exposé à une température de 10°C. Cette baisse de pH protège les muscles une fois exposés aux conditions de refroidissement permettant d'éviter le durcissement lié au cryochoc. Mais d'autres effets biochimiques et biophysiques sont impliqués aussi. Ce procédé entraîne une perturbation de la structure matricielle myofibrillaire du muscle (Ho *et al.*, 1996 et 1997)

De plus, la stimulation électrique peut permettre aussi l'activation du système enzymatique des calpaïnes accélérant la dégradation de protéines myofibrillaires. Ceci est dû à un changement du rapport *post-mortem* pH / température ou à l'effet lié à une augmentation significative calcium libre grâce à cette stimulation (Hwang *et al.*, 2003).

□ Les traitements mécaniques : l'application de lames tranchantes entraîne une rupture du tissu conjonctif et du système myofibrillaire contractile. De plus, la force de torsion est réduite. Davis *et al.* (1977) ont rapporté aussi que ce procédé avec des lames tranchantes augmente la tendreté plus rapidement que le procédé de maturation *post-mortem* classique. Mais ce procédé ne permet pas d'augmenter la tendreté d'une viande déjà tendre (Davis *et al.*, 1975).

□ L'utilisation de solutions de calcium : la majorité des recherches suggère que le mode d'attendrissement est dû à l'activation des protéases calcium dépendantes présentes dans le muscle squelettique (Whipple & Koohmaraie, 1991). Par opposition, d'autres recherches utilisant des inhibiteurs de ces protéases rapportent que l'effet non enzymatique de sel de calcium entraîne la solubilisation des protéines (Taylor & Etherington, 1991).

Les chlorures de calcium, de baryum et de magnésium sont connus pour leur capacité à déstabiliser les protéines en augmentant les interactions électrostatiques entre les protéines et les ions en solution ; la solubilité des protéines est de ce fait augmentée. On a connaissance que les ions zinc peuvent inhiber l'activité des calpaïnes et ainsi bloquer l'attendrissement enzymatique (Koohmaraie, 1990). Les résultats de Lawrence *et al.* (2004) suggèrent que l'activité enzymatique activée par le calcium et l'effet non enzymatique du salage contribuent à l'attendrissement du muscle. Cependant, les mécanismes enzymatiques réduisent la dureté de 2,9 à 7,5 fois plus que les mécanismes non enzymatiques. La dégradation enzymatique activée par le calcium apparaît être le mécanisme majeur d'attendrissement alors que le salage avec les ions calcium jouerait un rôle mineur.

□ Le traitement thermique : les réactions enzymatiques augmentent généralement avec une augmentation de la température en passant de 0-4°C à une température corporelle de 37°C. La dégradation protéolytique des protéines du muscle est généralement réalisée à 3,5-7°C mais sur une période de temps plus longue.

□ L'utilisation d'enzymes exogènes : La transformation du muscle en viande repose très largement sur des mécanismes enzymatiques affectant les protéines myofibrillaires et le collagène. Sur ce plan et malgré une maturation technologiquement bien conduite, une carcasse de bœuf renferme donc toujours autant de morceaux à cuisson lente (35% environ) que de morceaux à cuisson rapide. L'apport d'enzymes exogènes permet d'optimiser les réactions normalement catalysées par les enzymes endogènes et ainsi d'améliorer la tendreté de certains muscles.

Les protéases exogènes comme la papaïne, la ficine et la bromélaïne d'origine végétale, la collagénase d'origine bactérienne ou la trypsine et la pancréatine provenant du pancréas d'animaux ont des efficacités différentes pour dégrader soit les protéines myofibrillaires soit le collagène.

La papaïne reste la seule enzyme utilisée dans le monde. Différents modes d'application sont possibles. La papaïne incorporée dans des sels attendrisseurs est autorisée. Ces sels améliorent sa diffusion. L'injection *post-mortem* est aussi efficace mais le seul obstacle est la diffusion. Une contrainte mécanique peut être nécessaire en parallèle. Enfin un autre mode d'injection est possible, il s'agit de l'injection *ante-mortem* dans la veine jugulaire au moment de l'abattage mais qui n'est pas autorisée en France.

Pour l'instant, les autres techniques reposant sur l'utilisation d'autres enzymes ne restent qu'expérimentales et n'ont fait l'objet d'aucun transfert vers l'industrie.

Par ailleurs, l'utilisation d'enzyme comme attendrisseur de viande est limitée par des effets secondaires indésirables des enzymes approuvées comme la papaïne et la bromélaïne. Une nouvelle protéase, aspartique protéase (AP) exprimée par *Aspergillus oryzae* pourrait être utilisée, car elle n'engendre pas ces désagréments. À la différence de la papaïne, la nouvelle enzyme agit seulement sur les protéines myofibrillaires, mais pas sur le tissu conjonctif. De plus, la viande, en présence de cette enzyme, peut être stockée sans aucun changement du produit. Son effet se manifeste principalement pendant la cuisson. Enfin, certaines conditions de cuisson (de fortes températures) finissent par inactiver son activité (Ashie *et al.*, 2002).

3.4. Le bovin : le modèle d'étude

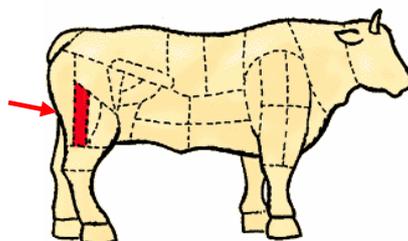


Figure 16 : Schéma des muscles de bovin. Le muscle utilisé est le gîte à la noix ou *Biceps femoris* (indiqué en rouge par la flèche).

La consommation de viande bovine en France provient de diverses origines : bœuf ou bovin mâle castré, vache de réforme, génisse, taurillon. Cette consommation de viande rouge est à nouveau stable depuis quelques années suite à la crise de la vache folle ; elle se situe à environ 22,5 kg équivalent carcasse par habitant. En Europe, la France se trouve au premier rang de consommation de viande bovine avec 1,65 millions de tonnes équivalent carcasse. Dans le cas présent, les muscles qui serviront à l'étude proviennent de vache laitière, c'est-à-dire de vache abattue à l'issue de leur carrière de laitière ou d'allaitante, entre 3 ans et 8 ans. La consommation de viande de vache laitière dans notre pays représente environ 60 à 70 % de la consommation.

Le muscle utilisé au cours de l'étude se situe plus précisément dans la cuisse arrière de la carcasse (cf. figure 16) : il s'agit du gîte à la noix (*Biceps femoris*).

4. L'évolution de la chair de poisson après la capture

Contrairement à la viande, la maturation n'est pas favorable au muscle de poisson, car elle entraîne une altération de la texture qui conduit à une perte de fermeté. Cet effet est non désiré par le consommateur.

La fermeté est un facteur important permettant d'évaluer de la qualité la chair d'un poisson cru. Il est maintenant accepté que les muscles de poisson se dégradent durant la conservation au froid.

La perte de fermeté se déroulerait à la suite d'un relâchement du tissu causé par la dégradation des protéines de structure de la chair.

4.1. Les différentes phases

Par opposition à la viande de boeuf, le poisson est directement consommable après sa mort. Le muscle dans un premier temps est détendu et la texture de la chair est souple et élastique. Cette phase *pre-rigor* ne dure que quelques heures.

Après quoi, le muscle se durcit et le corps du poisson se raidit (en moins de 24 heures pour le bar). Progressivement, les fibres musculaires du poisson vont se contracter de manière désordonnée. Au cours de cette phase, le muscle reste relativement mou. Les sarcomères relaxés restent encore extensibles. A cet instant, le pH du muscle est aux alentours de 7. Cette étape ne dure qu'un jour en moyenne puis cette caractéristique du muscle tend à disparaître. Elle se définit comme le durcissement du muscle et la perte de son extensibilité *post-mortem*. Durant la période de rigidité cadavérique, les fibres musculaires se contractent ; le squelette ainsi que le tissu musculaire font barrière à cette contraction en résistant pour conserver la structure. A partir d'une certaine pression, cette résistance diminue pour être nulle. Cela est principalement dû à un affaiblissement du tissu musculaire (Bremner & Hallett, 1985; Hallett & Bremner, 1988; Lavety *et al.*, 1988; Bremner, 1992). Les conséquences du durcissement du muscle sont une contraction partielle des sarcomères ainsi qu'une rupture incomplète des myocommes. Lors de cette phase, le pH chute à 6. Cette rigidité cadavérique s'installe à des temps différents selon les espèces de poisson. A température ambiante, elle se met en place entre 1 et 7 heures après la mort du poisson. Tandis que dans des conditions réfrigérées, elle s'installe au bout de 5 à 22 heures. Elle dure entre 30 et 120 heures selon le mode de conservation, sachant que cette période sera plus longue si le poisson est conservé au froid. Cette phase dure plus longtemps chez les poissons que chez les mammifères.

Le muscle entre alors dans la phase *post-rigor*. Le muscle devient à nouveau souple. Le passage dans cette dernière configuration dépend de l'espèce considérée, de la température de conservation, de la condition physique du poisson, de la taille de l'animal, de la saison et le

mode d'abattage. On peut contrôler certains de ces paramètres permettant ainsi d'optimiser au maximum la période *rigor*.

Après un certain temps, les principaux mécanismes biochimiques vont se mettre en place conduisant à une altération progressive du muscle (Dunajsky, 1979). La structure du collagène des tissus se dégrade. On observe aussi une désorganisation progressive de l'appareil contractile et une libération de certains acides gras. Au cours de cette phase, le pH remonte à 7.

4.2. Mécanismes physico-chimiques

La température est un paramètre important pour la conservation du poisson. Sur l'ensemble des muscles du poisson, l'installation de la *rigor* est différente. Il est admis que l'apparition de la *rigor* est plus rapide, si la température est élevée. Mais il existe des cas contraires, où une faible température accélère son apparition : par exemple, pour les poissons d'origine tropicale, la différence est significative entre 0°C et 10°C.

Au moment de sa capture le pH est de 7 et dans l'heure qui suit il descend entre 6,5 et 6,8. Ceci concerne principalement les espèces océaniques. Pour les espèces marines, la nature du muscle influe sur son pH initial. Il est de 6,25 pour la chair rouge et de 6,85 pour la chair blanche. Suite à la mort de l'animal, le muscle est privé d'oxygène. Alors une glycolyse anaérobie se met en place et produit de l'acide lactique. Cet acide contribue à diminuer le pH jusqu'à une valeur considérée comme ultime. Cette valeur est corrélée avec la durée de la phase *rigor mortis*. A la fin de la *rigor mortis*, le pH va remonter pour attendre une valeur comprise entre 6,8 et 7, 9 jours après la mort de l'animal.

Par comparaison avec les mammifères, le pH descend moins bas au cours de la phase de rigidité cadavérique et redevient proche de la neutralité à la résolution de la *rigor-mortis*, alors que celui des animaux terrestres reste acide.

4.3. Mécanismes enzymatiques

L'effet des enzymes protéolytiques dans la chair de poisson contribue à dégrader les tissus conduisant au ramollissement du muscle. L'activité de ces enzymes est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques et endogènes, par des cofacteurs, par le pH et la température de l'environnement. De plus, l'activité protéolytique varie énormément selon les espèces, le sexe, la saison de pêche, la période de frai, la maturité sexuelle et d'autres variables (Jiang, 2000).

Les deux principales protéases, les enzymes lysosomales et les calpaines, jouent un rôle important dans l'évolution *post-mortem* du poisson tout comme chez les mammifères. Les mécanismes seront plus détaillés dans le paragraphe § 6.4.1.

4.4. Le bar : le modèle d'étude

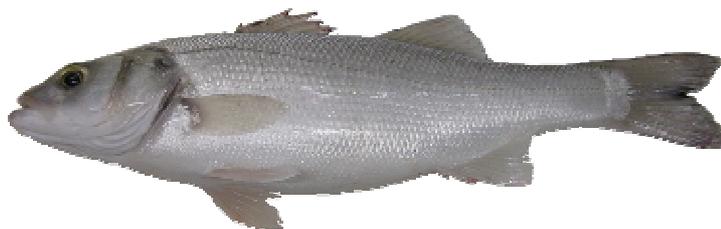


Figure 17 : Photo de bar, *Dicentrarchus labrax* L.

Son nom scientifique est *Dicentrarchus labrax* L. (cf. figure 17). On lui attribue plusieurs noms communs en fonction des régions : bar, loup,... C'est un poisson marin de la famille des Perciformes, il est l'un des plus gros prédateurs de la bordure côtière. C'est un poisson très vorace qui se nourrit de crevettes, de mollusques et d'autres poissons. Le bar est un poisson dit eurymalin, c'est à dire capable de supporter des variations de la salinité de l'eau très importantes justifiant ainsi sa présence dans les eaux saumâtres. A titre indicatif, il peut fréquenter des zones comprises entre 0,5/1000 et 40/1000 de salinité. Le bar séjourne en eaux saumâtres et peut même pénétrer en eaux douces; il fréquente de préférence les eaux les plus superficielles mais peut descendre jusqu'à 100 m. On peut le rencontrer, à l'état naturel, sur les côtes de l'Amérique du Nord, de l'Europe et de l'Afrique du Nord

Selon les lieux où il vit, il a des périodes de frai différentes ; cela dépend principalement de la température de l'eau. Par exemple, la période de reproduction dans la Manche est généralement en février, dans l'Atlantique Nord en janvier/février et dans la Méditerranée en décembre/janvier.

La reproduction a lieu de mars à juin, près des côtes ou même parfois dans les estuaires en eaux saumâtres voire douces. Les oeufs sont pélagiques; l'incubation dure environ 6 jours et la croissance du jeune est rapide. En automne, les jeunes quittent les abords des côtes, tout comme les adultes.

L'élevage des espèces de pisciaires s'est énormément développé comme celui des animaux terrestres, surtout avec l'explosion de la production en Asie. Le bar d'élevage est principalement élevé en Europe dans des bassins en mer du Nord, en façade atlantique et dans des cages flottantes en mer Méditerranée, et aussi sur les côtes du continent américain.

5. Les différents systèmes protéolytiques responsables de la dégradation des protéines myofibrillaires

Les deux principaux groupes de protéases de la cellule musculaire, les enzymes lysosomales et les calpaïnes, et leurs inhibiteurs endogènes respectifs, sont considérés comme

impliqués dans l'amélioration de l'attendrissement de la viande et la détérioration de la chair de poisson. L'implication du protéasome reste encore très floue et incertaine (Lamare *et al.*, 2002).

La plupart des protéases sont des enzymes lysosomales ou cytosoliques, mais quelques unes sont dans le sarcoplasme (cytoplasme de la fibre) et associées aux myofibrilles ou aux macrophages. Après la dégradation des tissus, les enzymes se trouvent principalement dans la fraction des protéines sarcoplasmiques. Toutes ces protéases sont répertoriées dans le tableau suivant :

Enzymes	Localisation cellulaire	pH optimal	Facteurs de régulations
Cathepsines	lysosomale	5,0-6,0	Libération des lysosomes, pH inhibiteurs (cystatines)
Cathepsine B Cathepsine D Cathepsine H Cathepsine L			
Calpaïnes	sarcoplasmique	7,0-7,5	pH, calcium, inhibiteur (calpastatine)
μ -calpaïne m-calpaïne			
Protéasome	sarcoplasmique	7,0-9,0	pH, inhibiteurs ?

Tableau 11 : Récapitulatif des différentes enzymes responsables des dégradations myofibrillaires.

5.1. Le système calpaïque

Les calpaïnes (E.C. 3.4.22.17) sont des protéases à cystéine cytoplasmiques calcium-dépendantes. Leur découverte a été réalisée par Guroff en 1964 dans le cerveau de rat. Les premiers travaux portant sur les calpaïnes dans le muscle squelettique ont été rapportés en 1972 par Bush *et al.* (1972). Elles sont largement répandues dans les cellules d'une grande variété d'organismes allant des mammifères aux invertébrés en passant par les plantes et les champignons. A ce jour, cette famille de protéases comprend environ 14 membres distribués dans différents types cellulaires. Mais la m- et la μ -calpaïne sont ubiquitaires.

Cette large famille est impliquée dans un grand nombre de régulations physiologiques aussi bien que dans certaines pathologies de façon directe ou indirecte. Par exemple, une activité augmentée de la m-calpaïne et de la μ -calpaïne est depuis longtemps considérée comme responsable de désordres neurologiques aigus (par exemple attaque d'apoplexie et dommages traumatiques du cerveau) et récemment de la maladie d'Alzheimer. La mutation non fonctionnelle du gène de la calpaïne 3 a été identifiée comme étant la cause de la dystrophie

musculaire de type 2A. Le gène de la calpaïne 10 serait quant à lui responsable du diabète de type 2. La calpaïne 9 jouerait un rôle dans les cancers gastriques.

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

5.1.1. Les calpaïnes ubiquitaires

Notre étude portera plus particulièrement sur deux isoformes, la micro- et la milli-calpaïne que l'on trouve dans tous les types cellulaires. Les calpaïnes sont décrites comme des protéases neutres à activités calcium dépendante (CANP : Calcium Activated Neutral Proteases). Ces deux enzymes, distribuées de façon ubiquitaire dans le cytosol des cellules à travers le monde animal, résident plus précisément dans le sarcomère, dans le sarcoplasme et sont aussi associées avec le sarcolemme. Il a été mis en évidence que ce système se situait principalement dans les zones intracellulaires (Kumamoto *et al.*, 1992). Au sein du muscle, les calpaïnes ont été localisées au niveau de la bande I, au voisinage de la strie Z ainsi qu'au niveau du sarcolemme. La *m*-calpaïne et *μ*-calpaïne sont nommées en fonction des concentrations calciques requises pour leur activité ; elles ont besoin de 0,2 à 1 mM de calcium pour la *m*-calpaïne et de 50 μ M pour la *μ*-calpaïne. Elles sont encore appelées respectivement calpaïne II et calpaïne I. Cette numérotation correspond à l'ordre d'élution sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions (type DEAE). La calpaïne II a un caractère plus acide (pI = 4.6) que la calpaïne I (pI = 5.3) (Yoshimura *et al.*, 1983).

Ces protéases appartiennent à la famille des protéases à cystéine de par la présence d'un acide aminé cystéine dans leur site actif.

Chez les poissons, il a été montré qu'il existait une variation de l'expression des calpaïnes. Cette variation significative est complexe. Elle dépend de la maturité sexuelle et de la période de frai (Love, 1970), qui ont un impact sur la physiologie du poisson due à l'action de différentes hormones.

Il a aussi été montré que dans le muscle de poisson, l'expression de différentes formes de protéases variait au cours d'une année (Ando *et al.*, 1985). Par conséquent, à la mort de l'animal, les différentes formes peuvent avoir une action distincte sur les protéines myofibrillaires. De plus, durant la période de frai, dans le muscle blanc de bar, une nouvelle forme de calpaïnes a été détectée (Ladrat *et al.*, 2000).

Ces protéases ont une structure hétérodimérique composée d'une grosse et d'une petite sous-unité (cf. figure 18). La plus grosse sous-unité est la partie active qui porte le site actif, elle est dite catalytique et la petite sous unité est la partie régulatrice. Le rôle de cette dernière n'est pas clairement défini, mais il pourrait être de stabiliser la sous-unité catalytique.

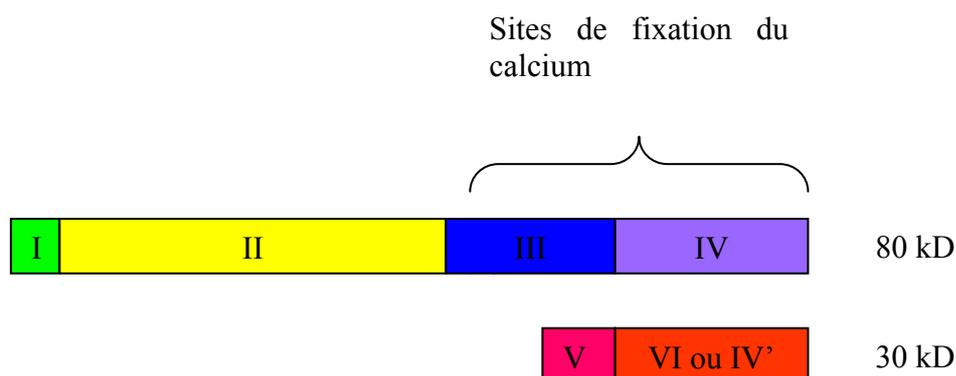


Figure 18 : Schéma des calpaïnes I et II.

(Abréviations : I = Domaine N-terminal ; II = Domaine catalytique; III = Domaine III; IV = Domaine de la sous-unité de 80 kDa catalytique liant le calcium; V = Domaine N-terminal de la petite sous-unité de 30 kDa; VI ou IV' = Domaine de la petite sous-unité liant le calcium)

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

La structure des calpaïnes est partagée en 6 domaines. Les domaines I, II, III et IV constituent la grosse sous-unité et les domaines V et VI composent la petite sous-unité. Chaque domaine a un rôle précis. On peut souligner que le domaine II montre une similarité avec d'autres protéinases à cystéine que sont la papaïne et les cathepsines B, L et H.

Les domaines I et V jouent un rôle dans l'autolyse de l'enzyme. Le domaine II correspond au site actif de l'enzyme. Le domaine III subit un changement conformationnel lors de la fixation des ions calcium. Il est aussi sujet à la fixation de la calpastatine. Les domaines IV et VI présentent 5 motifs « main-EF », structures de fixation des ions calcium.

Cette image de la structure cristallographique de la calpaïne sur la figure 19 illustre la structure de la protéase. Les différentes sous-unités ainsi que le site catalytique de la protéase sont visualisables par différentes couleurs.

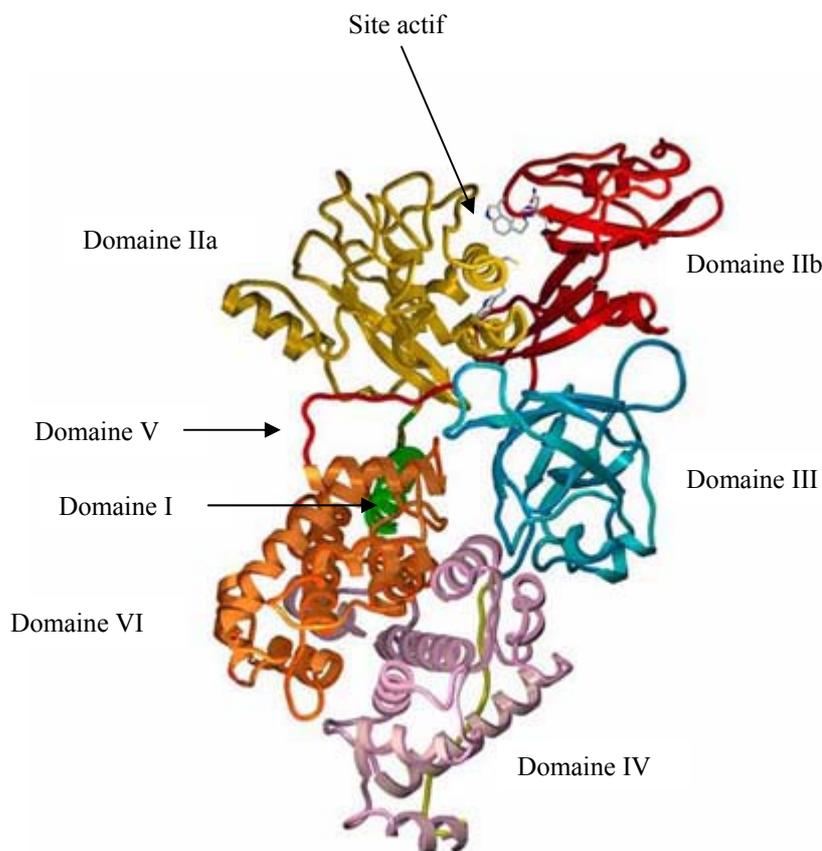


Figure 19 : Schéma de la structure cristallographique en ruban de la m-calpaïne humaine en l'absence du calcium .

5.1.2. La calpastatine

La calpastatine est l'inhibiteur spécifique des calpaïnes (cf. figure 20). Elle est intracellulaire comme les calpaïnes. Cette protéine est polymorphe. Son poids moléculaire est compris entre 50 et 120 kDa.

Son rôle est double. Elle permet de bloquer le phénomène d'autolyse et aussi empêcher l'activité protéolytique de l'enzyme activée. La calpastatine se comporte comme inhibiteur réversible des calpaïnes. Elle se lie au domaine IV de la grosse sous-unité et au domaine IV' ou VI de la petite sous-unité. Le calcium a un rôle clef dans le mécanisme d'inhibition de la calpaïne par la calpastatine. Il joue un rôle de liant entre la calpastatine et la calpaïne. Sa fixation se fait entre les domaines IV et VI de la calpaïne et les domaines A, B et C de la calpastatine. De plus, cette interaction devient réversible après la complexation des ions calcium par de l'EDTA.

Il est clair que la calpastatine joue un rôle important dans la régulation de l'activité de la μ - et de la m-calpaïne, mais il s'avère que la régulation des calpaïnes par son inhibiteur au sein des cellules vivantes n'est pas encore pleinement comprise. Les observations suggèrent que les trois sites de fixation sont nécessaires pour qu'elle exprime son entière activité inhibitrice. De plus, il

a été rapporté que les calpaïnes peuvent s'autolyser en présence d'un niveau de calpastatine inhibant totalement l'activité des calpaïnes.

Toutefois, beaucoup de mécanismes sur la régulation et sur l'interaction calpaïne/calpastatine ont été élaborés sans savoir s'ils sont proches de la réalité (Goll *et al.*, 2003).

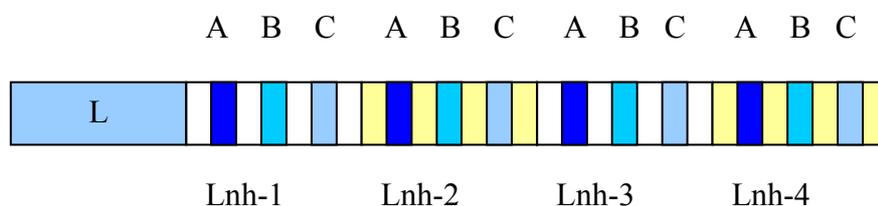


Figure 20 : Schéma de la structure de la calpastatine, inhibiteur spécifique des calpaïnes.

(Abréviations : L = Domaine N-terminal de la calpastatine; Inh-1 à 4 = Domaines inhibiteurs répétitifs de la calpastatine; A, B, C = Régions particulières nécessaires pour l'activité inhibitrice.)

Elle comporte généralement quatre domaines semblables dont chacun montre une activité inhibitrice pour les calpaïnes et un domaine N-terminal (domaine L) de taille variable, dont la fonction n'est pas connue.

Il existe plusieurs isoformes de calpastatine résultant de divers événements cellulaires comprenant : l'épissage alternatif, des emplacements différents du début de la transcription et de la traduction, des états différents de phosphorylation.

La présence de deux isoformes de la calpastatine, exprimées principalement dans des muscles à contraction rapide (premier pic élué d'une colonne échangeuse d'anions) et des muscles à contraction lente (coéluée avec la m-calpaïne ou plus tard dans le gradient de sel), ont été rapportés dans le muscle d'ovine, de bovin et de porc (Ouali & Talmant, 1990). L'isoforme principal de calpastatine dans des muscles à contraction lente pourrait correspondre à la forme phosphorylée de calpastatine, ce serait la forme mineure dans des muscles à contraction rapide.

La calpastatine est plus rapidement dégradée par la μ -calpaïne que par la m-calpaïne (Doumit & Koohmaraie, 1999). Elle est aussi résistante à la dénaturation par un traitement de chauffage jusqu'à environ 90°C (Geesink & Koohmaraie, 1999).

Par ailleurs, il a été montré que l'augmentation de la dureté juste après l'abattage était corrélée avec une augmentation de la calpastatine (Roncalés *et al.*, 1995).

5.1.3. Les différents rôles du calcium

Le calcium a un rôle clef dans la régulation du système calpaïque. Cette dépendance a été prouvée en même temps que leurs découvertes. Ces fonctions s'articulent autour de 4 grands

étapes : la dissociation des deux sous-unités, l'autolyse, l'activité protéolytique et la régulation par la calpastatine.

In vivo, les calpaïnes requièrent une concentration en calcium micromolaire et macromolaire respectivement. Les conditions activatrices sont entre 3 et 50 μM pour la μ -calpaïne et entre 0,2 et 1 mM pour la m-calpaïne (Goll *et al.*, 1992). Néanmoins, les deux calpaïnes semblent être actives pour des concentrations physiologiques de calcium de l'ordre de 100 à 300 nM, ce qui suggère que le calcium seul n'est pas exigé pour une activité *in vivo*. En fait, des activateurs de protéines et certains facteurs augmentent la sensibilité du calcium. Plus récemment, un activateur spécifique des μ -calpaïnes a été mis en évidence dans le cerveau de rat (Melloni *et al.*, 1998). Cet activateur est une protéine liant le calcium qui forme un complexe avec la μ -calpaïne, mais pas avec la m-calpaïne et augmente ainsi la sensibilité au calcium de dix fois.

D'autres activateurs pour la m-calpaïne ont été découverts dans le muscle squelettique. Ils forment aussi des complexes avec la m-calpaïne, abaissent ainsi la valeur du K_a de 400 μM à 15 μM facilitant ainsi l'autolyse. Ces deux activateurs fonctionnent sur la membrane de la cellule car ils se lient à elle de façon calcium dépendante.

De nombreuses évidences indiquent que la m-calpaïne ne peut être impliquée dans le processus d'attendrissement *post-mortem* de la viande sans un niveau en calcium dans le muscle augmenté de façon artificielle (Doumit & Koohmaraie, 1999).

□ La dissociation des deux sous-unités :

La dissociation est souvent citée comme la première étape de l'activation des calpaïnes. Le calcium conduit à ce phénomène de dissociation de deux sous-unités (Bessière *et al.*, 1999a). La fixation du calcium se fait sur des sites spécifiques des calpaïnes : les motifs « main-EF » et d'autres sites comme sur les domaines IIa et IIb pour la μ -calpaïne. Le K_d (constante d'affinité pour le ligand) reflète leur besoin respectif en calcium. La μ -calpaïne a un K_d compris entre 21-61 μM et la m calpaïne a un K_d compris entre 322 et 1300 μM (Goll *et al.*, 2003).

De plus, on peut ajouter que dans des conditions particulières de calcium, c'est-à-dire pour une concentration de 1 mM, les calpaïnes s'agrègeraient ou précipiteraient.

□ L'autolyse :

L'autolyse des calpaïnes a lieu rapidement en présence de calcium. Elle se matérialise par une modification de la partie N-terminale des deux sous-unités (Elce, Hegadorn *et al.*, 1997). L'autolyse de la m-calpaïne a été rapidement observée ; par la suite, des résultats similaires ont été montrés pour la μ -calpaïne. Elle se caractérise par une diminution de taille de la grosse et de la petite sous-unité : de 80 kDa à 78 kDa pour la m-calpaïne et de 80 kDa à 76 kDa avec une étape intermédiaire à 78 kDa pour la μ -calpaïne. L'autolyse libère aussi des formes intermédiaires. Mais cependant les grosses sous-unités de 78 kDa et 76kDa restent actives. En ce qui concerne la petite sous-unité, elle voit sa masse passer de 28 kDa à 18 kDa (Goll *et al.*, 2003). Dans le muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.), la sous-unité de 80 kDa est

rapidement autolysée en 73 et 69 kDa et la petite sous-unité de 24 kDa est autolysée en trois bandes de 22, 19,3 et 17,8 kDa (Ladtrat *et al.*, 2002).

Les estimations faites sur les besoins pour leurs activations en calcium montrent que les formes autolysées requièrent moins de calcium que les formes non autolysées : entre 0,6-0,8 μM pour la μ -calpaïne et entre 50 et 150 mM pour la m-calpaïne (Elce, Davies *et al.*, 1997). L'intérêt de l'autolyse serait donc d'augmenter la sensibilité des calpaïnes au calcium de façon significative (Mellgren, 1991). Cette hypothèse n'est plus discutée et on considère que l'autolyse des deux isoformes abaisse la valeur du K_a . Mais un problème critique se pose néanmoins, ce qui entraîne des controverses au sujet de l'autolyse. Les calpaïnes autolysées sont actives avec une quantité moindre de calcium par rapport aux concentrations physiologiques, mais pour passer de la forme native à la forme autolysée, la protéase nécessite du calcium. Il s'avère que ces concentrations en calcium pour l'autolyse sont similaires ou légèrement plus fortes que celles nécessaires pour l'activité protéolytique (Tompa *et al.*, 1996 ; Jiang, 2000).

Une autre question reste discutable. Il s'agit de classer ou non les calpaïnes parmi les proenzymes, c'est-à-dire des enzymes actives seulement grâce à une autolyse d'une partie de leur structure. Dans ce cas de figure, le dimère constitué des unités 30 et 80 kDa serait la proenzyme et la forme autolysée 76 et 18 serait la forme active (Saido *et al.*, 1994). La plupart des membres de la famille des cystéines protéinases sont des proenzymes. Tous les travaux réalisés jusqu'à présent apportent des avis différents sur ce problème. Certaines études soutiennent que les calpaïnes non autolysées sont enzymatiquement actives et d'autres pensent que l'activation des calpaïnes passe par une étape d'autolyse. L'autolyse ne semble pas être nécessaire pour l'expression de l'activité protéasique mais elle aurait un effet important sur la dissociation et ainsi sur l'activation des calpaïnes. Tout du moins, il semble que l'autolyse joue un rôle important dans les fonctions de la calpaïne mais ce rôle reste mystérieux.

□ L'activité protéolytique :

Les mécanismes d'activation proposés ne vont pas tous dans le même sens et même certains sont sans cesse discutés (cf. figure 21). Tout reste hypothétique (Johnson & Guttmann, 1997 ; Suzuki and Sorimachi, 1998). Deux cheminements sont suggérés quant à l'activation de ces enzymes : soit elles sont actives après une dissociation des sous-unités induite par une fixation des ions calcium (Yoshizawa *et al.*, 1995, Michetti *et al.*, 1997). Cette dernière hypothèse reste la plus souvent citée (voie 1 sur la figure 21). Pour étayer cette hypothèse, la calpaïne est déjà dissociée quand le calcium est lié. Et cette dissociation permet d'ouvrir le site actif (Bessière *et al.*, 1999a). Ou soit elles sont actives sous la forme hétérodimérique avec des ions calcium fixés (Zhang & Mellgren, 1996).

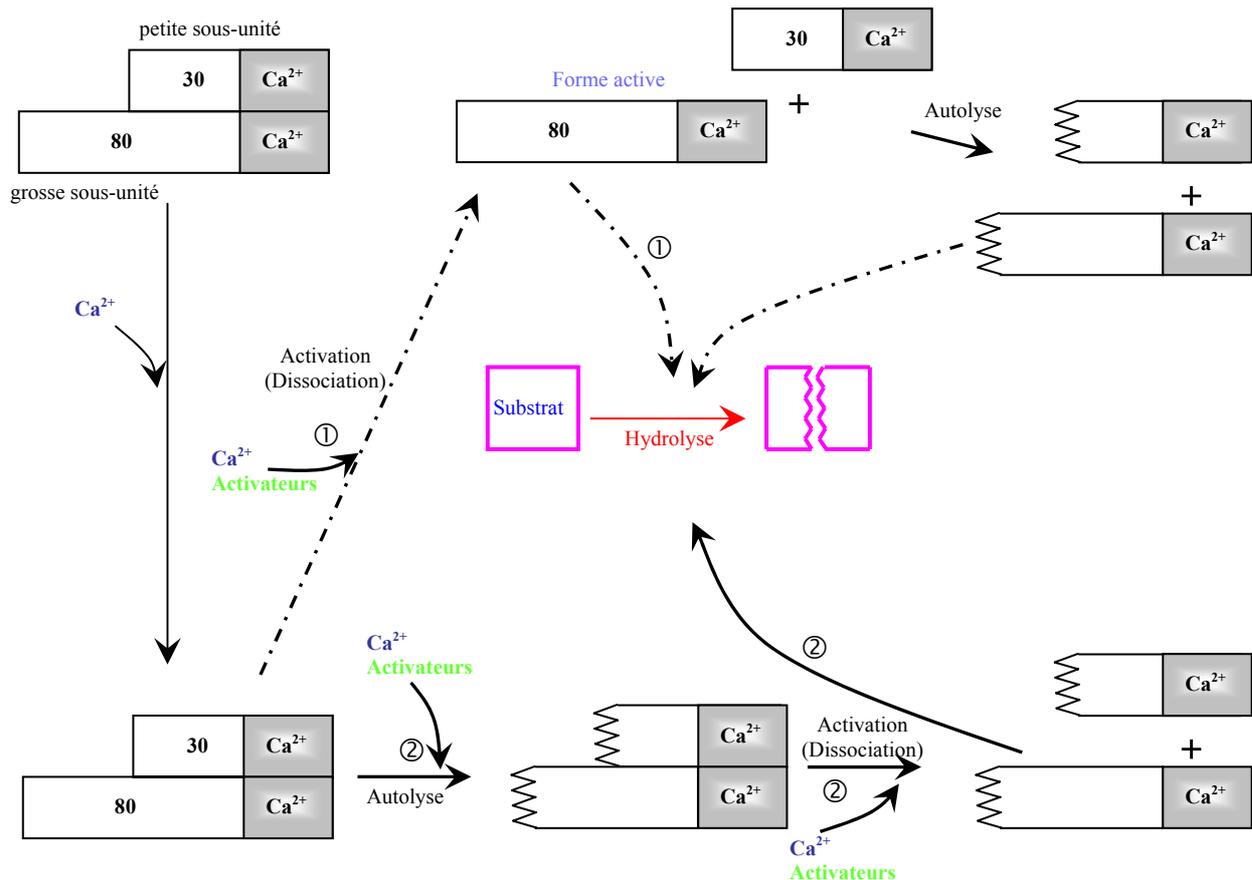


Figure 21 : Schéma des mécanismes d'activation possibles des calpaïnes.

□ La régulation par la calpastatine

Les ions calcium sont indispensables et jouent un rôle primordial lors de l'inhibition de la calpaïne par la calpastatine (Cottin *et al.*, 1981; Murachi *et al.*, 1981). La concentration nécessaire pour que la calpastatine se lie à la calpaïne est significativement plus faible que celle nécessaire pour initier l'activité protéolytique de cette dernière.

5.1.4. Autres activateurs

□ Le rôle des phospholipides :

Un autre dispositif important concerne l'activation des calpaïnes par des phospholipides suggéré à l'origine par Coolican et Hathaway (1984). À cet égard, la fonction possible du domaine III des calpaïnes a été suggérée par l'étude de la structure de la m-calpaïne. Ce domaine a des similitudes avec le domaine C2 à l'origine identifiés dans la protéine kinase C (Rizo & Sudhof, 1998). Le domaine C2 peut lier des phospholipides d'une façon calcium-dépendante et est capable d'orchestrer la régulation du calcium de l'activité enzymatique. Pour la m-calpaïne, le domaine III s'est avéré être un domaine liant les phospholipides et régulant le calcium. La liaison des phospholipides au domaine III augmente entre 1 et 10 fois la capacité de liaison du calcium de ce domaine (Tompa *et al.*, 2001).

Les phospholipides, spécifiquement les acides phospholipidiques, réduisent considérablement la concentration nécessaire en calcium pour l'autolyse et aussi pour l'activation (Saïdo *et al.*, 1994; Melloni *et al.*, 1998).

En leur présence, la μ -calpaïne devient pleinement active pour des concentrations micromolaires ou de plus faible concentration, en considérant que les phospholipides sont insuffisants pour activer la m-calpaïne dans des concentrations physiologiques de calcium. Bien que d'autres activateurs et facteurs incluant l'ADN aient été rapportés, leur nature, les implications physiologiques et les mécanismes d'activation ne sont pas encore bien compris.

□ Les conditions environnementales :

Les conditions environnementales jouent un rôle important dans l'activité de ce système enzymatique et plus particulièrement, les niveaux de pH et de température.

Le pH d'activité de ce système est relativement neutre compris entre 7,2 et 8,2 avec un maximum d'activité vers 7,5 (Goll *et al.*, 2003).

Quant à la température d'activité, la gamme est comprise entre 5 et 37°C avec une température pour une activité optimale de 25°C.

Le cumul d'un pH de 5,5 et d'une température de 5°C définit les conditions retrouvées pendant la période *post-mortem*, après 24 heures de stockage pour la viande. Concernant la μ -calpaïne, Koohmaraie (1986) montre qu'il y a environ 25 % d'activité à 5°C et à un pH de 5,5 (conditions *post-mortem*), donc qu'elle peut être impliquée dans la dégradation *post-mortem*.

□ Les fonctions physiologiques :

Les substrats des calpaïnes ont été étudiés. Les peptides de petites tailles sont rarement des substrats de ces enzymes. Par contre des structures de plus grande taille sont sujetes aux hydrolyses par les calpaïnes. Parmi ces substrats, on trouve des protéines membranaires, cytosquelettiques, myofibrillaires, des enzymes comme la phosphorylase kinase B, la protéine kinase C (Ono *et al.*, 1998) et aussi des cytokines (facteurs de transcription)...

On a de fortes raisons de croire que le système jouerait un rôle majeur dans l'attendrissement de la viande et dans l'altération de la chair de poisson. Les calpaïnes participeraient à la fragilisation de la strie Z. Cela serait la principale modification structurale obtenue.

5.2. Les enzymes lysosomales

Il existe une large variété d'enzymes lysosomales. Elles sont stockées dans des lysosomes, qui sont de très petits organites sphériques (microscopiques) présents dans la plupart des cellules animales (Goll *et al.*, 1983). Ils sont plus petits que les mitochondries et ont une seule membrane. On s'intéressera plus particulièrement aux enzymes du muscle squelettique qui sont impliquées dans la protéolyse *post-mortem*. On peut aussi noter que le niveau de ces enzymes protéolytiques dans le muscle est plus faible que dans les autres tissus à savoir le cœur, le foie...

Les cathepsines lysosomales sont présentes dans tous les types cellulaires à l'exception des globules rouges. Les propriétés des cathepsines lysosomales dans les différentes espèces animales et les différents types cellulaires sont similaires. Ces endopeptidases lysosomales sont petites avec un poids moléculaire compris entre 20 et 50 kDa. Elles ne sont pas synthétisées directement sous une forme active. Elles acquièrent leur capacité protéolytique au cours de mécanismes de glycosylation, de phosphorylation,... Leurs activités optimales se situent pour des valeurs de pH acide et elles demeurent instables pour des pH alcalins et neutres.

Parmi les quatre classes de protéinases que sont les acide aspartique-, les cystéine-, les sérine- et les métallo-protéases, l'attention est portée plus particulièrement, dans cette étude, sur les principales endopeptidases lysosomales que sont les peptidases à cystéine et à acide aspartique.

Les cathepsines font partie d'un groupe majeur d'enzymes protéolytiques du muscle. Elles sont identifiées dans différentes espèces incluant l'homme, le rat, la souris, le poulet et le poisson. Des propriétés similaires seront observées pour différents muscles indépendamment de leur type de métabolisme et de contraction.

Quatre d'entre elles (les cathepsines B, D, H et L) sont considérées comme importantes dans la dégradation des protéines du muscle *post-mortem*. On peut les classer en deux groupes : les protéases à cystéine (B, L, H) et une protéase à acide aspartique, la cathepsine D (présentées dans le tableau 12).

Les différentes études utilisant des systèmes modèles ont indiqué que les protéines myofibrillaires sont susceptibles d'être hydrolysées par des cathepsines.

Noms	Nombre E.C.	Classification et type	Taille (kDa)	Gamme de pH optimum	pI
Cathepsine B	3.4.22.1	Famille des protéases à cystéine (famille des papaïnes)	30 (5+25)	5,5-6,5	4,5-5,5
Cathepsine D	3.4.23.5	Famille des protéases à acide aspartique	45 (30+15)	3,0-5,0	6,8
Cathepsine H	3.4.22.16	Famille des protéases à cystéine	28 (23+5)	6,5-6,8	6,0-7,1
Cathepsine L	3.4.22.15	Famille des protéases à cystéine	28 (24+4)	5,5-6,5	5,0-6,3

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des cathepsines d'intérêt dans cette étude.

5.2.1. Les protéases à acide aspartique

La cathepsine D est la plus abondante des enzymes lysosomales. Elle a un poids moléculaire de 42 kDa et son pH optimal est compris entre 3 et 5. La cathepsine D lyse les

protéines comme l'hémoglobine, la myosine, les protéines sarcoplasmiques mais elle a très peu d'effet sur le collagène (Okitani *et al.*, 1981).

Dans le muscle, la cathepsine D hydrolyse la chaîne lourde de la myosine, l' α -actinine, la tropomyosine et les troponines T et I à pH 3 (Matsumota *et al.*, 1983).

5.2.2. Les endopeptidases à cystéine

Elles ont une cystéine dans leur site actif qui doit rester réduite. Seule l'activité de cette famille d'endopeptidases semble soumise à une régulation par des inhibiteurs intracellulaires.

La cathepsine B hydrolyse la chaîne lourde de la myosine, l'actine, la troponine T, et plus lentement la troponine I et la tropomyosine. La cathepsine H dégrade principalement la troponine T. La cathepsine L dégrade la plupart des protéines myofibrillaires à l'exception de la troponine C et de la tropomyosine.

La régulation enzymatique des cathepsines peut se faire par le biais de différents inhibiteurs. Parmi les cathepsines, il existe une famille d'inhibiteurs qui agit sur les protéases à cystéine, ce sont les cystatines. Les cystatines sont des inhibiteurs naturels des protéases à cystéine présentes dans les tissus des animaux et des graines végétales. Au sein de cette super famille d'inhibiteurs, il demeure des différences tant dans les propriétés moléculaires que dans la distribution biologique. Ces cystatines peuvent se lier fortement, de façon réversible et compétitive contribuant ainsi à une inhibition spécifique envers les cystéine protéinases comme les cathepsines lysosomales animales B, H et L. Dans le règne animal, les cystatines se localisent dans le cytosol alors que sa cible enzymatique se trouve au sein des lysosomes (Koohmaraie *et al.*, 1991).

Les cystatines sont stables au pH alcalin et à forte température. De plus, il existe des différences d'affinités ; les cystatines sont plus spécifiques des cathepsines L qu'aux cathepsines B (Koohmaraie *et al.*, 1991).

Chez le poisson, la cystatine est un inhibiteur qui permet d'empêcher la protéolyse de la myosine par les cathepsines et donc le ramollissement de la chair. Sachant que les cathepsines B et L ont une forte affinité pour la myosine et qu'il est difficile de les éliminer complètement lors du processus visant à fabriquer du surimi, l'addition de cystatine est un moyen de contrecarrer ce problème (Chen *et al.*, 2001). La cystatine de poisson est homologue à celle des tétrapodes. Elle a des actions communes sur les cathepsines B, H et L (Koide & Noso, 1994). Chez les mammifères, il existe des différences quantitatives : le porc contient plus de cystatines que l'agneau et le bœuf (Koohmaraie *et al.*, 1991).

5.3. Le protéasome

Il a été décrit pour la première fois en 1980 dans l'hypophyse de bovin (Orlowski & Wilk, 1981). Le protéasome est aussi appelé complexe protéolytique multicatalytique (MCP) car la présence de multiples activités distinctes a été mise en évidence (Rivett, 1993). Il est présent

dans la plupart des cellules vivantes aussi bien dans le cytosol que dans le noyau (Rivett, 1989). Les activités d'hydrolyse de la chymotrypsine, de la trypsine et de la peptidyl-glutamyl-peptide ont toutes été découvertes au cours du même travail expérimental.

5.3.1. Sa structure et les différents isoformes

Le poids moléculaire du protéasome est estimé entre 700 et 800 kDa (Tanaka *et al.*, 1986 ; Tanaka *et al.*, 1988).

L'étude par microscopie électronique montre la présence d'une partie cylindrique avec une structure dimérique formée par deux disques distincts (Tanaka *et al.*, 1988). A l'intérieur se trouvent les sites actifs assurant la protéolyse. On peut différencier deux isoformes selon leurs coefficients de sédimentation, le 20 *S* et le 26 *S* (Goldberg, 1992; Rechsteiner, 1992). Le rôle physiologique du protéasome de 20 *S* est inconnu, mais il doit avoir un intérêt puisqu'il est très largement distribué dans les différents types cellulaires et aussi dans un grand nombre d'espèces allant des Archéobactéries aux mammifères. Quant au protéasome de 26 *S*, il catalyserait une voie protéolytique responsable de l'élimination sélective de protéines endogènes impliquées dans la régulation métabolique (Goldberg, 1992; Rechsteiner, 1992). Les activités protéolytiques nécessitent une gamme de pH comprise entre 6 et 8 (Dutaud *et al.*, 1996).

5.3.2. Les fonctions physiologiques

Jusqu'à présent, il n'a jamais été mis en évidence que le protéasome jouerait un rôle dans le processus d'attendrissement de la viande.

L'incubation de myofibrilles d'ovins avec une préparation de protéasome montre que la troponine C et les chaînes légères de la myosine sont dégradées (Koomaraie, 1992). Dans les conditions réelles de stockage, après la mort de l'animal, ces protéines myofibrillaires ne sont habituellement pas dégradées.

Aussi, l'incubation de myofibrilles bovines avec des protéasomes de 20 *S* montre que les protéines myofibrillaires sont des substrats relativement spécifiques du complexe protéosomique de 20 *S* (Taylor *et al.*, 1995a). La myosine, l'actine et la desmine sont dégradées avant l' α -actinine, la troponine T et la tropomyosine. Ces changements sont différents de ceux rencontrés lors de l'évolution *post-mortem* de la viande.

Il a été plus souvent suggéré que le protéasome n'était pas impliqué dans les premiers stades de maturation *post-mortem* de la viande ou dans la désorganisation des myofibrilles ; ce rôle est le plus souvent attribué aux calpaïnes (Robert *et al.*, 1999). Néanmoins, une possible hydrolyse par le protéasome est envisageable mais qui supposerait une action synergique de différentes protéases comme la calpaïne et le protéasome. La calpaïne donnerait des peptides hydrolysés par la suite par le protéasome (Robert *et al.*, 1999).

5.4. Le rôle des protéases dans la dégradation *post-mortem* du muscle de poisson et dans la viande

5.4.1. Dans le muscle de poisson

Les mécanismes de dégradation *post-mortem* restent complexes et encore mal connus. Cependant, la contribution des protéases dans l'altération de la chair de poisson est indéniable. Deux voies sont généralement décrites comme impliquées dans la dégradation des protéines myofibrillaires au cours du stockage *post-mortem* réfrigéré : la voie calpaïque et la voie lysosomale. Elles agissent de façon complémentaire et synergique au cours du long processus de dégradation *post-mortem*. L'activité protéolytique varie selon l'espèce de poisson considérée ainsi que selon la saison, la maturation sexuelle, la période de frai, le sexe.

L'implication des différentes protéases dépend des conditions environnementales. Aussitôt après la mort du poisson, le pH du muscle chute. Cette diminution rapide du pH pourrait rendre les protéases lysosomales actives. Si l'on se base sur les conditions optimales de pH, les cathepsines B et L seraient plus impliquées que la cathepsine D dans la dégradation des protéines de structure du muscle. Néanmoins, cette dernière, présente en quantité importante, pourrait tout autant exercer un rôle. L'un des inconvénients de cette famille d'enzymes est leur localisation dans des lysosomes, or la baisse du pH peut permettre de libérer les cathepsines de leurs vésicules lysosomales.

L'activité des cathepsines est la plus souvent citée comme impliquée dans les dégradations *post-mortem* du muscle de poisson (Jiang, 1998). Ces cathepsines seraient pour la plupart inactives dans le muscle vivant et seraient libérées à la suite d'un accident physico-chimique ou d'une congélation/décongélation *post-mortem*. Deux cathepsines sont mises en avant quant à leur activité *post-mortem*; il s'agit de la cathepsine D et L. Des incubations *in vitro* de cathepsines B, D et L avec des protéines myofibrillaires de muscle blanc de bar révèlent que la chaîne lourde de la myosine (MHC), l' α -actinine, la desmine, l'actine, la troponine T et d'autres protéines non identifiées peuvent être substrats de ces enzymes lysosomales. Une corrélation entre l'activité de cette cathepsine L et la texture molle de la chair du poisson a aussi été suggérée par Yamashita et Konagaya (1992). Les dégradations induites par la cathepsine D sont similaires aux modifications observées sur les protéines myofibrillaires lors de la conservation du muscle sur glace (Ladrat *et al.*, 2003).

Les conditions de pH requises pour l'activité des calpaïnes sont celles atteintes lors de la période *post-mortem* du muscle. Ce système protéolytique joue donc aussi un rôle dans la dégradation des protéines myofibrillaires. Néanmoins, il demeure encore quelques interrogations, car il reste un décalage entre la concentration en calcium physiologique dans le muscle et les besoins des différentes isoformes. La concentration du calcium intracellulaire augmente au cours de la période *post-mortem*. Cette concentration est suffisante pour une action des calpaïnes, mais l'implication de certains activateurs est sûrement nécessaire.

Les calpaïnes sont aussi associées à l'autolyse du muscle de poisson. Chez le poisson, elles digèreraient principalement la myosine (surtout la chaîne lourde) (Muramoto & Seki, 1988 ;

Verrez-Bagnis *et al.*, 2002). Par ailleurs, il a été montré que la m-calpaïne dégrade *in vitro* d'autres protéines myofibrillaires comme la tropomyosine, l' α -actinine et la desmine (Verrez-Bagnis *et al.*, 2002). Mais aussi, l'activité de ces calpaïnes ne modifieraient pas l'activité des cathepsines. L'équipe de Muramoto et Seki a montré que les calpaïnes de poisson seraient actives à des températures plus basses par comparaison à celles des mammifères.

Certaines protéases comme des métalloprotéases peuvent aussi avoir un rôle dans le changement *post-mortem* du muscle spécialement sur les composants de la matrice extra cellulaire comme le collagène (Kubota *et al.*, 2001).

5.4.2. Dans la viande

La dégradation *post-mortem* des muscles est soumise à de nombreuses controverses. Les travaux décrits dans la littérature tendent à expliquer la maturation de la viande par l'implication du système lysosomal et du système calpaïque.

L'utilisation d'un inhibiteur de protéases à cystéine comme l'E-64 entraîne l'absence de protéolyse des myofibrilles et donc d'attendrissement du muscle. Cet inhibiteur spécifique exerce son action sur les calpaïnes et les cathepsines à cystéine (cathepsines B, H et L). Ce résultat souligne que cette classe de protéases joue un rôle primordial dans la dégradation *post-mortem* de la viande (Hopkins & Thompson, 2001b).

Le système lysosomal est capable de dégrader les protéines myofibrillaires durant la maturation *post-mortem*. Des études *in vitro*, où les protéines myofibrillaires sont incubées avec des enzymes lysosomales, révèlent qu'elles sont capables dégrader la troponine T, la titine, l'actine, la myosine, l' α -actinine (Mikami *et al.*, 1987, Ouali *et al.*, 1987). Ces résultats confirment les observations faites suite à la dégradation *post-mortem* du muscle *in vivo* ; la durée de la période réfrigérée de stockage reste un paramètre important à prendre en compte.

Le système lysosomal est spécifique car ces protéases sont emprisonnées dans des vésicules, les lysosomes ; ce qui les prive d'un contact direct avec leur substrat, les myofibrilles. Il a été montré que les membranes de ces lysosomes étaient rompues après la mort de l'animal et au cours de la période *post-mortem*, permettant une libération de ces enzymes. Ces résultats sont confirmés par une augmentation de l'activité de certaines enzymes considérées comme des indicateurs de rupture de la membrane des lysosomes : la β -glucuronidase et la phosphatase acide (Duston & Lawrie, 1974 ; Ertbjerg P. *et al.*, 1999; Holtzman E., 1989 ; Oshumi *et al.*, 1983).

Les protéases lysosomales sont actives dans une zone de pH acide. Après la mort de l'animal, une accumulation d'acide lactique va provoquer une diminution du pH à des valeurs proches de 5,4 (Ouali, 1990). La chute du pH entraîne une rupture des membranes des lysosomes et donc une libération de leurs contenus. L'ensemble de ces informations peut suggérer une activité potentielle des cathepsines au cours de la dégradation *post-mortem* du muscle.

En contradiction avec cela, Hopkins et Thompson (2001b) ont réalisé l'injection d'inhibiteurs des cathepsines B et L dans la viande et ensuite, ils ont observé les différents indicateurs de la maturation de la viande. Ils n'observent pas de différence significative avec ou sans inhibiteurs de ces enzymes, ce qui peut laisser douter quant à l'implication de ces protéases dans la dégradation *post-mortem* du muscle. Par contre des hypothèses quant à l'absence d'effet des inhibiteurs sur ces protéases peuvent être émises : une concentration en inhibiteurs trop faible, une précipitation de l'inhibiteur, une localisation différente de l'inhibiteur et des enzymes lysosomales.

Les calpaïnes, contrairement aux cathepsines, sont localisées dans le sarcoplasme. Elles peuvent être en contact direct avec leurs substrats, les protéines myofibrillaires. La concentration en calcium libre dans le sarcoplasme augmente durant la contraction du muscle après la mort de l'animal. Cette concentration en calcium (110 μM) est suffisante pour activer la μ -calpaïne (Hopkins & Thompson, 2001) mais pas pour activer la m-calpaïne (Edmunds *et al.*, 1991). L'activation des calpaïnes conduit progressivement à leur autolyse. Une autolyse trop importante peut conduire à une inactivation de la calpaïne. La diminution de l'activité de la μ -calpaïne au cours de la maturation peut être due à son autolyse (Boehm *et al.*, 1998). Toutes ces observations conduisent à suggérer que la μ -calpaïne est principalement responsable de la dégradation *post-mortem*, et que la m-calpaïne joue un rôle mineur (Dransfield, 1993 ; Koohmaraie *et al.*, 1996 ; Veiseth *et al.*, 2001).

Tout comme pour les cathepsines, des inhibiteurs spécifiques des calpaïnes ont été injectés dans la viande. L'addition de ces inhibiteurs montre que la protéolyse diminue et que la dureté du muscle ne varie pas par rapport à un témoin (Uytterhaegen *et al.*, 1994). Cela suggère que les calpaïnes sont bien impliquées dans la dégradation *post-mortem* du muscle mais elles ne participeraient pas à l'attendrissement de la viande.

La réponse à la question : « quelle protéase est impliquée dans la dégradation *post-mortem* du muscle » est loin d'être connue. L'implication des calpaïnes est plus souvent mise en avant que celle des cathepsines. Mais une action synergique entre les calpaïnes et les cathepsines n'est pas à exclure. Dans cette hypothèse, le système calpaïque exercerait son action au début de la période *post-mortem* et plus précisément avant la chute du pH ; et ensuite, le système lysosomal exercerait son rôle.

6. Effet des hautes pressions sur les enzymes de dégradation de la viande et du poisson

Les hautes pressions sont susceptibles de modifier la conformation, le repliement, de dissocier des sous-unités, d'agréger et donc de perturber les activités enzymatiques.

6.1. Le système calpaïque

Koohmaraie *et al.* (1984) ont étudié l'effet des hautes pressions sur l'activité des calpaïnes lorsque le muscle de bovin est pressurisé en phase *pre-rigor*. Ces travaux montrent qu'après traitement à environ 100 MPa, l'activité des calpaïnes diminue. Par ailleurs, il a été montré par Elgasim & Kennick (1982) qu'un traitement par hautes pressions du muscle entraîne une augmentation de la concentration en calcium. Ceci serait dû à une libération du calcium présent dans les mitochondries et dans le réticulum sarcoplasmique dégradé par le traitement. L'augmentation de la concentration en calcium favorise l'autolyse des calpaïnes et peut expliquer la baisse de leurs activités. Ces résultats ont été montrés par Deschamps *et al.* (1992) qui se sont intéressés à l'effet des hautes pressions sur l'activité des calpaïnes de muscle squelettique de lapin (cette activité diminue à partir de 200 MPa). Et aussi par Homma *et al.* (1995) qui ont montré une diminution de l'activité au dessus de 100 MPa pour être nulle après un traitement à 300 MPa. Par ailleurs, cette même équipe révèle que la calpastatine qui est l'inhibiteur endogène serait sensible à des traitements plus doux.

D'autres travaux entrepris par Bessière *et al.* (1999a) montrent que sous hautes pressions, la structure des calpaïnes est modifiée et se manifeste par une dissociation des sous-unités, et de plus, cette dissociation est presque non réversible. Bessière *et al.* (1999b) ont aussi étudié l'activité des calpaïnes sous pressions jusqu'à 200 MPa. Il semble que la μ -calpaïne soit plus sensible à la pressurisation que la m-calpaïne.

6.2. Le système lysosomal

L'activation de ces enzymes n'est possible qu'après une libération dans le cytosol lors d'une rupture de la membrane. Lors la maturation naturelle du muscle, la rupture de la membrane intervient majoritairement lors de la chute du pH environnemental (Duston, 1983). Afin de caractériser cette déchirure, deux enzymes ont été définies comme des marqueurs de rupture : la β -glucuronidase (Elgasim *et al.*, 1982) et la phosphatase acide (Homma *et al.*, 1994 ; Ohmori *et al.*, 1992). Leur activité n'est réellement révélée que si elles sont libérées des vésicules lysosomales. Cet outil a permis de mettre en évidence l'effet des hautes pressions sur les lysosomes. Les hautes pressions exercent une contrainte physique qui dégrade la membrane. Il a été montré qu'à 100 MPa, une modification de forme des lysosomes est observée. Pour des pressions plus élevées, l'intégrité des lysosomes est altérée (Jung *et al.*, 2000a). A partir de 200 MPa, les lysosomes sont détruits. La membrane est déchirée ce qui conduit à la libération dans le cytosol des protéases contenues (Ohmori *et al.*, 1991).

Lorsque le muscle est pressurisé, l'activité de la cathepsine D augmente ainsi que celle de la phosphatase acide. Ces résultats, rapportés par Jung *et al.* (2000a), mettent en évidence que les hautes pressions entraînent la rupture des lysosomes, à la suite de quoi les protéases sont libérées ce qui permet d'expliquer l'augmentation de l'activité. Dans cette même étude, la cathepsine D et la phosphatase acide, toutes deux sous forme commerciale, ont été pressurisées. L'activité de

la cathepsine D augmente significativement avec le niveau de pressurisation. Tandis que l'activité de la phosphatase acide augmente seulement de 4%. Ce qui conforte le fait qu'elle soit considérée comme un outil révélant la rupture de la membrane lysosomale. D'autres travaux, dans lesquels l'extrait protéique est pressurisé montrent l'évolution de l'activité en fonction du traitement par hautes pressions. Ohmori *et al.* (1992) ont étudié l'effet des hautes pressions sur les protéases extraites de lysosome de foie de bovin. Ces travaux ont montré que le traitement par hautes pressions entre 101 et 506 MPa entraînait une diminution de l'activité enzymatique de la phosphatase acide et des cathepsines B, D et L, mais à des degrés différents.

On peut retenir de ces travaux que les hautes pressions modifient l'intégrité de la membrane lysosomale libérant ainsi le contenu protéasique, et par ailleurs l'activité de ces mêmes protéases.

Matériels & Méthodes

Matériels & Méthodes

1. Le matériel animal

1.1. Le bar (*Dicentrarchus labrax* L.)

Les bars (*Dicentrarchus labrax* L., 4 ans, 250-350 g) proviennent d'une ferme aquacole située à Beauvoir sur mer (Vendée). Les poissons sont rapportés vivants au laboratoire où ils sont tués par décapitation. Les filets sont prélevés et le muscle rouge est retiré, car il présente une composition chimique assez différente du muscle blanc. L'ensemble des muscles blancs est haché grossièrement afin d'obtenir un mélange homogène et ainsi de minimiser l'effet des différences entre individus. Enfin, les échantillons sont conditionnés sous vide en sachet de 30 g.

1.2. Le bœuf (muscle *Biceps femoris*)

Les muscles utilisés sont prélevés sur des carcasses de vaches laitières de réforme (300-400 kg ; 47-62 mois) de race Frisonne Française à Pie Noir (FFPN). L'abattage des animaux est effectué au Lion d'Angers (SOVIBA, département du Maine et Loire). Le muscle que nous avons choisi pour sa taille importante est le *Biceps femoris* provenant du rond de gîte. Avant d'être saignés, les animaux sont étourdis. Ils sont ensuite étêtés, dépecés et éviscérés. Les demi-carcasses ainsi obtenues subissent une période de ressuyage (12 heures). Au cours de cette période, la température de la carcasse diminue de 37°C à environ 7°C et une perte d'eau est observée. Enfin, les muscles sont découpés de la carcasse et conditionnés sous vide. Par conséquent, le muscle est récupéré 24 heures *post-mortem*.

Pour homogénéiser les échantillons, le muscle est haché grossièrement, conditionné sous vide en sachet de 50 g.

1.3. Les conditions de stockage

Les différents broyats, après avoir été conditionnés en sachet sous vide, sont conservés à -80°C. Des résultats non présentés ont montré que la congélation à -80°C n'avait aucun effet sur les activités enzymatiques. De plus, des résultats récents l'ont également montré (Kristensen, Christensen et Ertbjerg, 2006)

Tous les composés chimiques utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), sauf ceux qui sont spécifiés.

2. La préparation des extraits de protéines

Toutes les opérations sont réalisées à 4°C ou dans la glace.

2.1. L'extraction des protéines sarcoplasmiques de muscle de bar (*Dicentrarchus labrax* L.)

Trente grammes de muscle sont homogénéisés deux fois 30 secondes à l'aide d'un Ultra Turrax (T25, IKA, Labortechnik, Staufen, Allemagne) (22000 tpm) avec 60 ml de tampon A. La tige de l'Ultra Turrax est rincée avec 30 ml de tampon A contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de β -mercaptoéthanol, 1 mM d'EDTA. Après centrifugation à $10000 \times g$ (GR 20.22, Jouan, France ; rotor R140) pendant 40 minutes à 10°C, le surnageant est récupéré et constitue l'extrait sarcoplasmique. Cet extrait est filtré au travers de deux filtres consécutifs de 1 μm et de 0,45 μm .

2.2. L'extraction des myofibrilles du muscle de bar (*Dicentrarchus labrax* L.)

Trente grammes de muscle sont homogénéisés deux fois 30 secondes à l'aide d'un Ultra Turrax avec 60 ml de tampon A contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de β -mercaptoéthanol, 1 mM d'EDTA. La tige de l'Ultra Turrax est rincée avec 30 ml de tampon A. Après centrifugation à $10000 \times g$ pendant 40 minutes à 10°C, le culot est repris avec 4 volumes de tampon A, homogénéisé et centrifugé. Cette opération est répétée une nouvelle fois. Enfin, le culot est solubilisé dans un tampon phosphate de potassium 0,04 M ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) à pH 6,0 contenant 0,6 M de KCl.

2.3. L'extraction des protéines sarcoplasmiques du muscle de viande (*Biceps Femoris*)

Cinquante grammes de muscle sont homogénéisés deux fois 30 secondes à l'aide d'un Ultra Turrax (T25, IKA, Labortechnik, Staufen, Allemagne) dans 100 ml de tampon A contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de β -mercaptoéthanol, 1 mM d'EDTA. On réserve environ 50 ml de tampon A pour rincer l'Ultra Turrax.

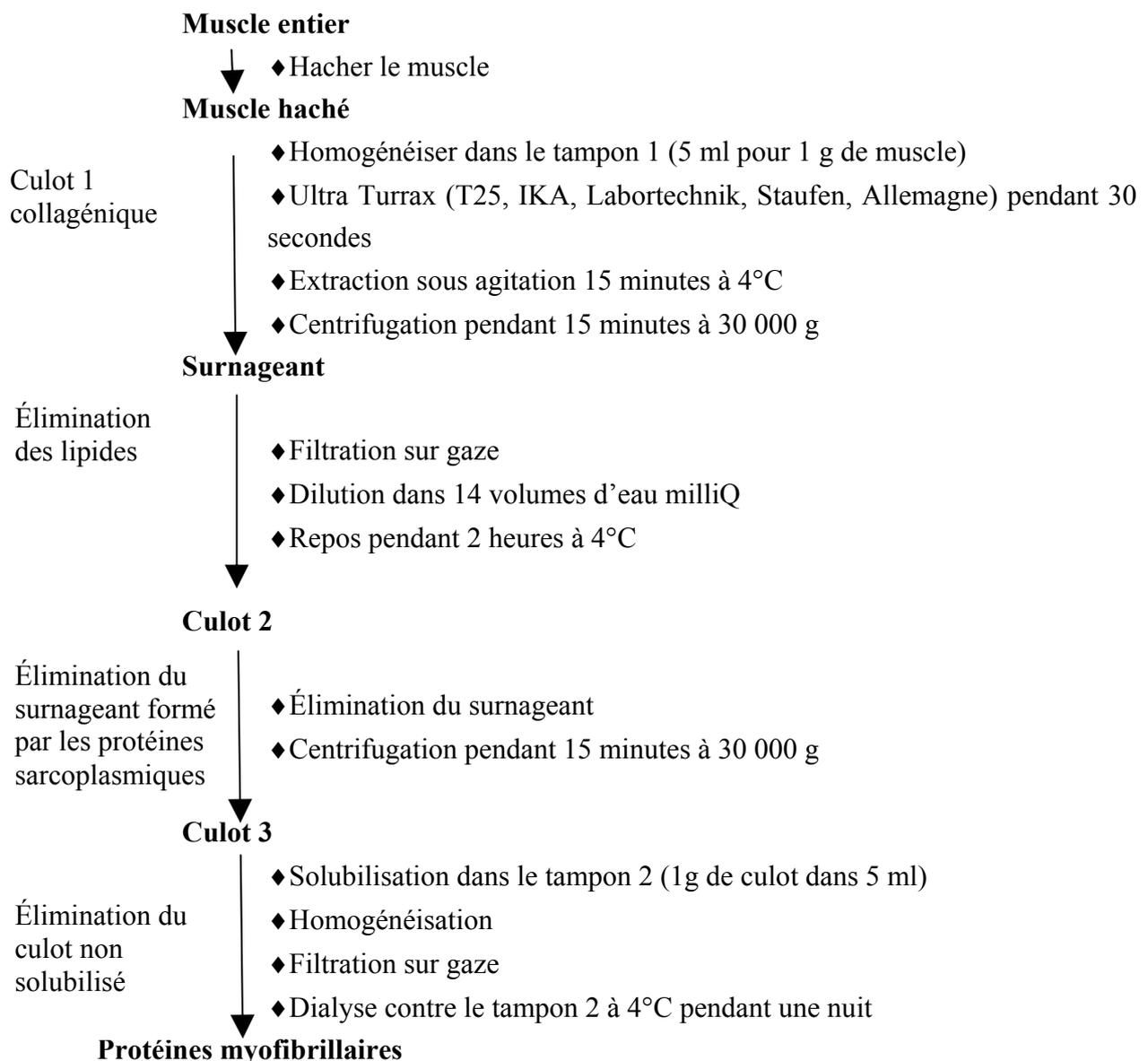
Après centrifugation à $25000 \times g$ (Jouan, GR 20.22) pendant 20 min à 4°C, le surnageant est récupéré et filtré à travers de la fibre de verre (1 μm), puis à travers un filtre de 0,45 μm en acétate de cellulose.

2.4. L'extraction des myofibrilles du muscle de bovin (*Biceps femoris*)

Les protéines myofibrillaires sont extraites selon un protocole inspiré de celui de Offer *et al.* (1973). Cette méthode extractive joue sur les variations de solubilisation selon la force ionique des protéines. Les protéines sarcoplasmiques sont solubles à une faible force ionique ($\mu \leq 0,15$), alors que les protéines myofibrillaires le sont à une plus forte force ionique ($\mu \geq 0,3$).

Le muscle de viande haché est homogénéisé, tout d'abord, dans le tampon 1 (cf. figure 22) selon les proportions suivantes : 1 gramme pour 5 ml de tampon 1, puis à l'aide d'un Ultra Turrax 30 secondes à une vitesse de 10000 tpm. Cet extrait constitué est placé sous agitation modérée à 4°C pendant 15 minutes avant d'être centrifugé 15 minutes à 30000 g à 4°C. Le surnageant obtenu est filtré sur gaze pour éliminer les lipides. Par la suite, sont additionnés à ce surnageant, 14 volumes d'eau milliQ et incubés pendant deux heures à 4°C, afin de précipiter les protéines myofibrillaires. Enfin, les protéines myofibrillaires sont concentrées par centrifugation à 30000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot sera repris dans du tampon 2 (cf. figure 22) à forte force ionique pour resolubiliser les protéines myofibrillaires.

Le protocole plus détaillé est présenté sur la figure 22.



Tampon 1 pH 6,0 : KH_2PO_4 , potassium di-hydrogénophosphate à 0,15 M
 K_2HPO_4 , di-potassium hydrogénophosphate à 0,15 M
KCl, chlorure de potassium à 0,3 M
 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 10 H_2O , pyrophosphate de sodium à 0, 01

Tampon 2 pH 6,0 : KH_2PO_4 , potassium di-hydrogénophosphate à 0,04 M
 K_2HPO_4 , di-potassium hydrogénophosphate à 0,04 M
KCl, chlorure de potassium à 0,6 M

Figure 22 : Extraction des protéines myofibrillaires de muscle de bovin

2.5. Préparation d'une solution de caséine à 4%

La caséine est solubilisée dans de l'eau milliQ en maintenant le pH à 12 avec ajout de soude 10 M. Lorsque la totalité de la caséine est solubilisée, le pH est ramené lentement à 7 avec de l'acide chlorhydrique concentré. Enfin, le volume est ajusté avec de l'eau milliQ.

3. Caractérisations biochimiques et physico-chimiques des protéines

3.1. Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées de différentes façons. La méthode utilisée dépend des quantités de protéines dans les solutions : la méthode du Biuret (Gornall *et al.*, 1949) et la méthode de Bradford (1976) (Réactif de Biorad Protein Assay).

3.1.1. Dosage protéique par la méthode du Biuret

Ce dosage est basé sur une réaction colorimétrique. Les liaisons peptidiques dans un milieu alcalin réagissent avec des ions cuivriques pour former des complexes bleus absorbant à 540 nm (spectrophotomètre Unicam, UV1).

La procédure expérimentale est la suivante. À 200 μl d'échantillon, on ajoute dans l'ordre 200 μl de cholate de sodium à 4%, 2,3 ml d'hydroxyde de sodium 10% et 300 μl de sulfate de cuivre à 1%. Pour chaque échantillon, des triplicats sont effectués. Pour réaliser le blanc, la solution échantillon est remplacée par 200 μl d'eau milliQ.

Une solution étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) est utilisée comme standard.

La gamme de sensibilité de ce dosage est comprise entre 2 g/l et 10 g/l de protéines équivalent BSA.

3.1.2. Le dosage protéique par une méthode dérivée de la méthode de Bradford (1976)

Cette méthode utilise la fixation du bleu de Coomassie sur les protéines. Ce colorant existe sous 3 formes : une forme anionique colorée en bleu ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$), une forme cationique rouge ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$) et une forme neutre verte ($\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$). La forme anionique se fixe préférentiellement aux protéines grâce à des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des protéines (plus particulièrement les groupements fonctionnels basiques et/ou aromatiques).

Une solution étalon de BSA est utilisée comme standard.

Lors des manipulations, le kit « Biorad Protein Assay », qui fait appel à cette technique de dosage, est utilisé. Dans chaque puits d'une microplaque, 150 μl de réactif Biorad dilué au 5^{ème} sont mis en réaction avec 150 μl d'extrait protéique. La gamme étalon est réalisée de la même façon. Les concentrations de la gamme étalon de ce dosage sont comprises entre 5 $\mu\text{g/ml}$ et 250 $\mu\text{g/ml}$. Les mesures d'absorbance se font à 595 nm sur un spectrophotomètre (Unicam, UV1). Ce dosage est essentiellement utilisé lors de la détermination de l'activité des cathepsines D.

3.2. Mesure de pH

Les mesures de pH sont réalisées soit en solution à l'aide d'une électrode combinée à corps en verre (Prolabo), soit directement dans le muscle à l'aide d'une électrode à solide (Mettler Toledo Inlab). Ces deux électrodes sont reliées à un pH-mètre (P107, Consort Bioblock Scientific).

4. Le procédé hautes pressions

4.1. Les caractéristiques du pilote hautes pressions

L'ENITIAA dispose d'une installation hautes pressions conçue par les ACB de Nantes (Ateliers et Chantiers de Bretagne, rue du Ranzai, Nantes) (cf. figure 23). Les différentes expérimentations ont été réalisées sur ce pilote, qui peut atteindre une pression maximale de 600 MPa (6000 bar).

Le système est composé d'une enceinte en position verticale, réalisée en acier inoxydable, dont le volume interne est de 3 litres, avec un diamètre interne de 120 mm et une hauteur utile de 300 mm. Le volume de cette enceinte peut être réduit grâce à des cylindres en aluminium. Un obturateur à vis permet de fermer hermétiquement cette enceinte. La vitesse de compression utilisée dans les divers essais est de 40 bar par seconde et la décompression est quasi instantanée (2-3 secondes).

L'appareil est équipé d'un système de régulation automatique de la pression, ce qui permet de programmer une cinétique de montée en pression, d'obtenir un palier stable et de contrôler la

descente en pression (cf. figure 24). Le système de pressurisation utilisé fonctionne selon le mode indirect.

Afin de réguler la température à l'intérieur de l'enceinte, le pilote est équipé d'une double enveloppe dans laquelle un fluide caloporteur circule. Ce fluide peut être régulé en température entre -20 et 60°C par l'intermédiaire d'un cryothermostat qui fait circuler l'eau thermostatée dans la double enveloppe de l'enceinte.



Figure 23 : Photo du pilote hautes pressions de l'ENITIAA (Nantes)

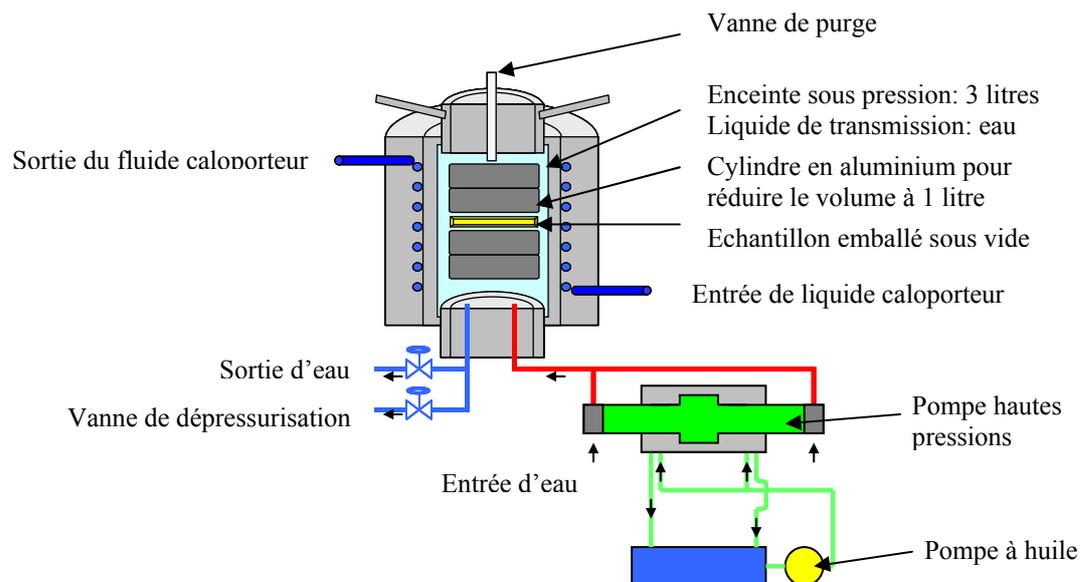


Figure 24 : Schéma du pilote hautes pressions

4.2. Le mode opératoire

Les échantillons sont conditionnés sous vide (Multivac, Wolferstschwenden, Allemagne) dans des sachets souples en polyéthylène d'une épaisseur de 65 μm (La Bovida, Nantes). La souplesse de ces sachets permet la transmission des pressions extérieures. De plus, ces emballages, aptes au contact alimentaire, sont parfaitement étanches et résistent aux contraintes mécaniques et thermiques.

Les échantillons sont maintenus à 4°C avant et après le traitement. Lors de l'essai, les échantillons sont placés dans l'enceinte entre deux cylindres en aluminium. Le traitement peut être lancé selon les critères de temps et de pression sélectionnés. Le schéma des conditions du traitement hautes pressions est représenté sur la figure 25.

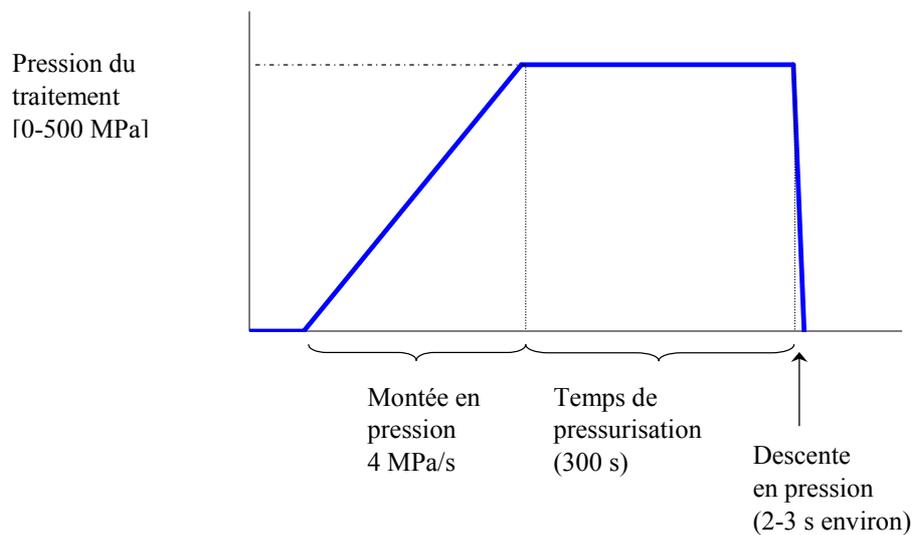


Figure 25 : Schéma des conditions du traitement hautes pressions

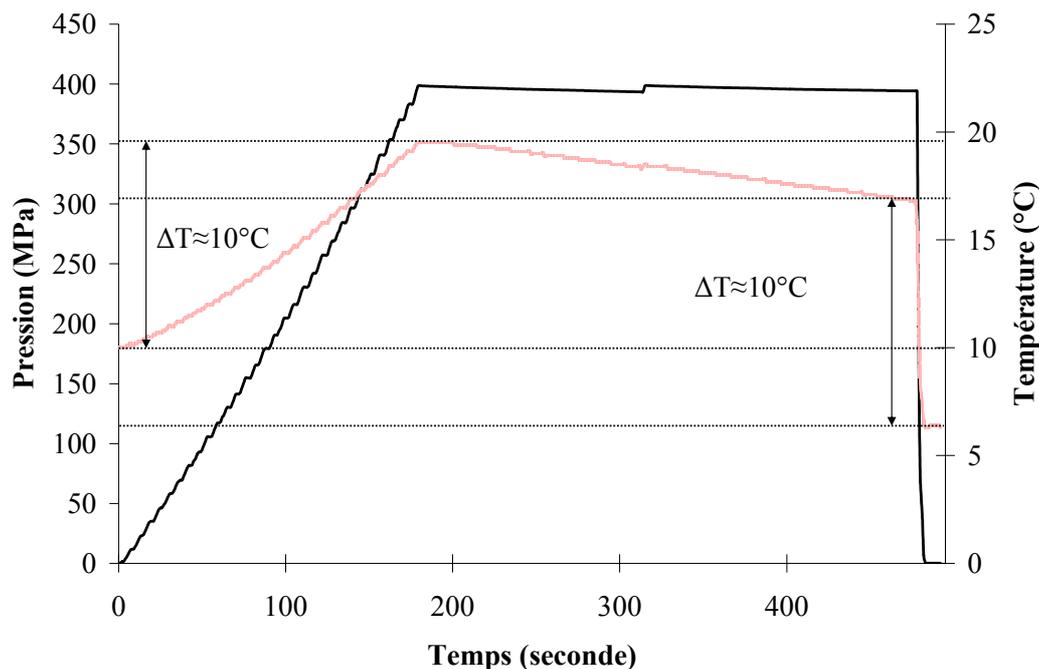


Figure 26 : Courbe d'évolution de la température à l'intérieur de l'enceinte réalisée pour une mise sous pression à 400 MPa puis une détente (Pression : — ; Température :).

La figure 26 présente les variations de température lors de la mise sous pression et lors de la détente. Au cours de la montée en pression, il se produit un échauffement et lors de la dépressurisation, c'est l'effet inverse. Plus le niveau de pression est important et plus la variation de température est grande. Dans le cas présent, pour une mise sous pression de 400 MPa, il est noté une élévation de température de 10°C et lors de la détente, il y a une diminution de température de 10°C. De façon générale, la variation de température est d'environ 2°C par palier de 100 MPa.

Pour nos différents traitements, nous régulerons la température de l'enceinte à 10°C à l'aide de la double enveloppe, pour permettre de maintenir l'échantillon entre 5 et 20°C.

5. La méthode de purification et de séparation des calpaïnes et de la calpastatine : chromatographie d'interactions hydrophobes

La chromatographie est une technique d'analyse qui permet de séparer les différents constituants d'un mélange. Cette séparation repose sur les propriétés spécifiques de la molécule d'intérêt et plus particulièrement sur ses propriétés hydrophobes. La méthode de purification a été mise au point par Ladrat *et al.* (2000).

5.1. Le principe de la chromatographie d'interactions hydrophobes

Dans le cas présent, les protéines sont entraînées par la phase mobile. Elles interagissent avec le support (ou la matrice) que l'on appelle la phase stationnaire. La matrice est composée

d'un gel portant des groupements hydrophobes caractérisés par un noyau phényle situé à l'extrémité d'une chaîne carbonée (le gel utilisé, ici, est un gel Phényl Sepharose CL-4B, cf. figure 27). Ce gel retient les protéines grâce des interactions hydrophobes.

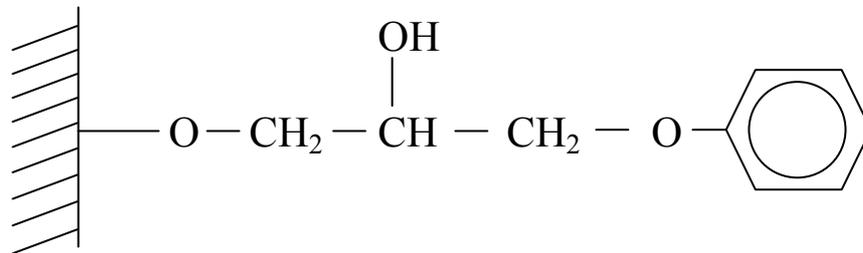


Figure 27 : Représentation du ligand Phenyl Sepharose CL-4B couplé à une matrice d'agarose.

L'extrait à séparer est déposé au sommet de la colonne en présence de sels pour favoriser les interactions hydrophobes. Le rinçage, toujours en présence de sels, consiste à éliminer les protéines non fixées. L'élution est réalisée ensuite par une diminution de la concentration en sel. Les modifications, induites par des interactions intermoléculaires, permettent ainsi un décrochage des protéines d'intérêt (cf. figure 28).

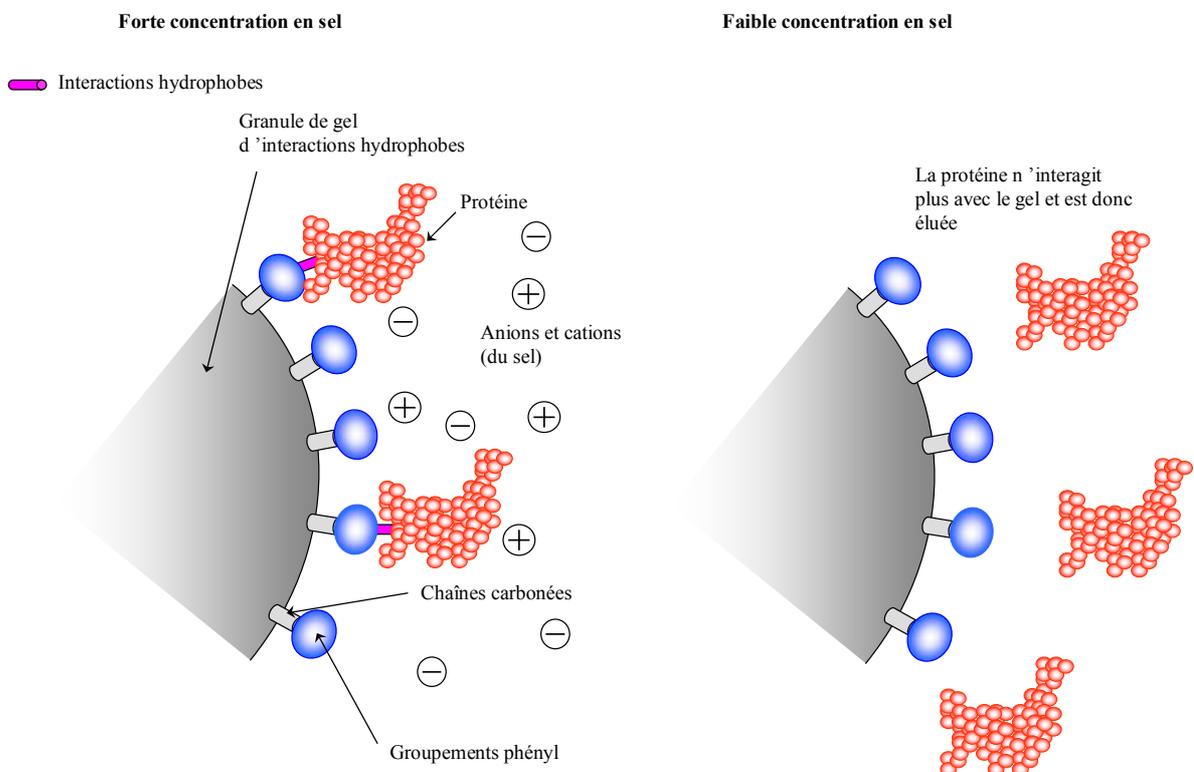


Figure 28 : Schématisation de chromatographie d'interactions hydrophobes

5.2. Le protocole de chromatographie d'interactions hydrophobes

La procédure est réalisée à 4°C. On utilise une colonne de chromatographie (Akta Basic, Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) (Phényl Sépharose CL-4B, 26 mm de diamètre, 105 mm de longueur, Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) équilibrée avec 50 % de tampon A contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de β-mercaptoéthanol, 1 mM d'EDTA et 50 % de tampon B (tampon A avec 1 M de NaCl). Cinquante millilitres d'extrait de protéines sarcoplasmiques contenant 0,5 M de NaCl sont injectés dans la colonne à un débit de 3 ml/min. Les protéines non fixées, comprenant la calpastatine (inhibiteur endogène spécifique des calpaïnes), sont éluées avec 50 % de tampon A et 50 % de tampon B. La fraction fixée, comprenant les calpaïnes, est éluée dans une seconde étape avec 100% de tampon A. Les différentes fractions sont récupérées dans la glace. La visualisation des protéines éluées est faite grâce à des détecteurs ultraviolet (UV) à deux longueurs d'onde : 280 nm et 254 m. La lecture à 280 nm permet de détecter les acides aminés tryptophane et tyrosine des protéines, et la lecture à 254 nm permet de détecter les acides aminés phénylalanine.

6. La méthode de purification et de séparation des différentes calpaïnes : chromatographie échangeuse d'anions

Cette technique chromatographique va permettre de mieux séparer les différentes isoformes des calpaïnes. Cette séparation repose sur les propriétés spécifiques de la molécule d'intérêt et plus particulièrement sur ses capacités à former des interactions ioniques avec la matrice chargée dans le cas présent, positivement. La méthode de purification a été mise au point par Ladrat *et al.* (2000).

6.1. Le principe de la chromatographie échangeuse d'anions

Les protéines sont entraînées par la phase mobile et interagissent avec la matrice, composée d'un gel portant des groupements diéthylaminoéthyl chargés positivement (cf. figure 29). Ce gel retient les protéines grâce à la formation des interactions ioniques.

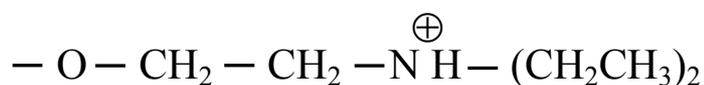


Figure 29 : Représentation du ligand diéthylaminoéthyl (DEAE).

L'extrait à séparer, sans sel, est déposé au sommet de la colonne. Le rinçage, toujours à une concentration nulle en sel, consiste à éliminer les protéines non fixées. L'éluion est réalisée ensuite par un gradient de sel. Les modifications permettent ainsi un décrochage des protéines d'intérêt.

6.2. Le protocole de la chromatographie échangeuse d'anions

La procédure est réalisée à 4°C. On utilise une colonne de chromatographie (Akta basic, Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) (DEAE Sepharose Fast Flow, 16 mm de diamètre, 160 mm de longueur, Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) équilibrée avec 100 % de tampon A. La fraction, éluée de la colonne d'interactions hydrophobes, est injectée sur cette colonne à un débit de 3 ml/min. Les protéines non fixées, sont éluées avec 100 % de tampon A. Les protéines fixées sont éluées selon un gradient de 0 à 400 mM de NaCl en 500 ml. Les différentes fractions sont collectées tous les 5 ml dans la glace.

7. Les dosages des activités enzymatiques

Chaque point d'activité correspond à la moyenne de trois manipulations. Pour chaque manipulation, trois mesures sont réalisées.

Pour chaque point d'activité, la barre verticale représente l'écartype.

7.1. Le dosage de l'activité des calpaïnes

L'activité des calpaïnes est déterminée en replicat à une température de 30°C. Le mélange réactionnel est constitué de 34 µl de tampon A, 3 µl de CaCl₂ à 0,5 M, 6 µl de CHAPS 5% {3-[3-(cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate et 5 µl de substrat synthétique fluorescent (N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin ou Suc-L-T) préparé à 20 mM dans du DMSO. Pendant 40 minutes, la cinétique est suivie à l'aide d'un lecteur de microplaques en fluorescence FLUOstar OPTIMA POLARstar OPTIMA (BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France). La longueur d'onde d'excitation est de 355 nm et celle d'émission est de 460 nm. La cinétique commence lors de l'ajout de 255 µl de la fraction calpaïnes. Le CHAPS est un détergent zwitterionique qui permet une augmentation du taux d'hydrolyse sans affecter les interactions enzyme-substrat, la conformation de l'enzyme ainsi que l'affinité de l'enzyme vis à vis du calcium (Mallya *et al.*, 1998).

Les unités des différentes activités sont pour :

-activité spécifique en FU.min⁻¹.g⁻¹.l⁻¹ : [pente (FU.min⁻¹)] / [concentration en protéines (g.l⁻¹)]

-activité totale en FU.min⁻¹ : {[pente (FU.min⁻¹)] / [volume de calpaïnes mis dans le mélange réactionnel (ml)]} × volume total de la fraction retenue contenant les calpaïnes

7.2. Le dosage de l'activité des cathepsines B, H et L

Les activités sont révélées par la dégradation d'un substrat fluorescent comme précédemment. Ces réactions se font à une température de 30°C. Le mélange réactionnel contient

70 µl de tampon acétate/acide acétique à 0,4 M (pH 4), 10 mM de β-mercaptoéthanol, 1 mM d'EDTA, 6 µl de CHAPS 5%, 16 µl de Brij[®] 35 à 5% (w/v) et 5 µl de substrat fluorescent. Le Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride, le Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride et le L-Arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride sont utilisés respectivement comme substrat de la cathepsine B, des cathepsines B+L, et de la cathepsine H. Ces substrats fluorescents sont préparés dans du méthanol à 20 mM. Les cinétiques commencent lors de l'ajout de 200 µl de solution enzymatique.

Les unités des différentes activités sont pour :

-activité spécifique en FU.min⁻¹.g⁻¹.l⁻¹ : [pente (FU.min⁻¹)] / [concentration en protéines (g/l)]

-activité totale en FU.min⁻¹ : {[pente (FU.min⁻¹)] / [volume d'extrait enzymatique mis dans le mélange réactionnel (ml)]} × volume total d'extrait enzymatique récupéré lors de l'extraction.

7.3. Le dosage de l'activité de la cathepsine D

L'activité de la cathepsine D est déterminée par l'hydrolyse de l'hémoglobine selon la méthode d'Anson (Anson, 1938). Les réactions se déroulent à 37°C. Le mélange réactionnel contient 250 µl de tampon acétate/acide acétique 0,2 M (pH 4,0), 10 mM de β-mercaptoéthanol, 1 mM d'EDTA, 250 µl d'hémoglobine dénaturée 4% (m/v). La cinétique commence lors de l'addition de 500 µl d'extrait de protéines sarcoplasmiques. La réaction est stoppée en ajoutant 125 µl d'acide trichloracétique à 10% à 125 µl de mélange réactionnel. Le mélange est laissé une nuit à 4°C, centrifugé à 14000 rpm pendant 15 minutes à 10°C. La quantité de protéines présente dans le surnageant est déterminée par la méthode Biorad (Cf. paragraphe 3.1.2.). Les mesures sont réalisées à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre FLUOstar.

Les unités des différentes activités sont pour :

-activité spécifique en absorbance à 595 nm (ou g.l⁻¹ de peptides libérés).min⁻¹.g⁻¹.l⁻¹ : [pente (absorbance à 595 nm (ou g.l⁻¹ de peptides libérés).min⁻¹)] / [concentration en protéines (g.l⁻¹)]

-activité totale en absorbance à 595 nm (ou g.l⁻¹ de peptides libérés).min⁻¹ : {[pente (absorbance à 595 nm (ou g.l⁻¹ de peptides libérés).min⁻¹)] / [volume d'extrait enzymatique mis dans le mélange réactionnel (ml)]} × volume total d'extrait enzymatique récupéré lors de l'extraction

7.4. Le dosage de l'activité de la phosphatase acide

L'activité de la phosphatase acide est déterminée selon une méthode d'Ohmori *et al.* (1992). Le 4-nitrophenylphosphate est utilisé comme substrat. Ce substrat permet de déterminer l'activité de l'enzyme selon une réaction chromogène.

Cent microlitres d'extrait sont ajoutés à 450 µl de tampon acétate de sodium pH 5,5 à 0,1 M. La réaction commence lors de l'ajout du réactif composé de 4 mM de 4-nitrophenylphosphate et de 1 mM d'EDTA préparé dans le tampon acétate de sodium pH 5,5 0,1 M. Le mélange est incubé sous agitation à 37°C. La réaction est stoppée au bout de 20 minutes par ajout de 2 ml de NaOH 0,1 M. Une lecture du mélange final à 400 nm est effectuée dans des microcuvettes sur un spectrophotomètre (Unicam, UV1). Pour le blanc, le même mélange sans incubation est lu immédiatement après ajout de substrat. L'activité est exprimée en absorbance à 400 nm.g⁻¹.

7.5. Le dosage de l'activité inhibitrice de la calpastatine

L'activité de la calpastatine est déterminée en réplicat. Les réactions sont réalisées à une température de 30°C. Le mélange réactionnel est constitué de 34 µl de tampon A, 3 µl de CaCl₂ à 0,5 M, 6 µl de CHAPS 5% et 5 µl de substrat synthétique fluorescent (N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-méthylcoumarin ou Suc-L-T) préparé à 20 mM dans du DMSO. Pendant 40 minutes, la cinétique est suivie à l'aide d'un lecteur de microplaques en fluorescence FLUOstar. La longueur d'onde d'excitation est de 355 nm et celle d'émission est de 460 nm. La cinétique commence lors de l'ajout de 200 µl de la fraction retenue, correspondant aux calpaïnes et de 55 µl de la fraction calpastatine. Le témoin est réalisé en remplaçant les 55 µl de la fraction calpastatine par du tampon A. La différence entre les deux est calculée pour déterminer l'activité inhibitrice de la calpastatine.

Les unités des différentes activités sont :

-activité spécifique en FU.min⁻¹.g⁻¹.l⁻¹: [pente (FU.min⁻¹)] / [concentration en protéines (g.l⁻¹)]

-activité totale en FU.min⁻¹: {[pente (FU.min⁻¹)] / [volume de calpaïnes mis dans le mélange réactionnel (ml)]} × volume total de la fraction retenue (calpaïnes)

Ainsi, une unité de calpastatine est définie comme la quantité inhibant une unité de calpaïne.

7.6. Le dosage de l'activité des calpaïnes de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) sous pression

L'activité des calpaïnes est déterminée sous pression dans un spectro-fluorimètre (SLM Série 2, Aminco Bowman, France) dans laquelle se trouve une cellule haute pression (cf. figure

30). La pression est générée par une pompe manuelle. Le fluide de pressurisation est de l'eau milliQ.

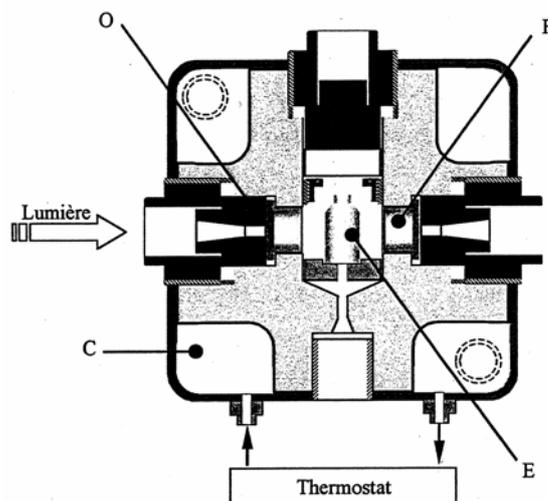


Figure 30 : Cellule permettant d'effectuer des mesures de fluorescence sous pression jusqu'à 700 MPa qui comporte des fenêtres en saphir synthétique (F), un circuit de thermostatisation (C) et un obturateur (O). L'échantillon est contenu dans la cuvette (E) qui l'isole du fluide transmetteur de pression (eau milliQ).

Les échantillons d'enzymes sont placés dans une cuve en quartz de 600 μl fermée par une membrane en polyéthylène maintenue par un anneau en caoutchouc. Cette cuve est introduite dans la cellule haute pression pour mesurer la fluorescence. Le mélange réactionnel est constitué de 78 μl de tampon A, 7 μl de CaCl_2 à 0,5 M, 14 μl de CHAPS 5% et 12 μl de substrat synthétique fluorescent (N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-méthylcoumarin ou Suc-L-T) préparé à 20 mM dans du DMSO. La réaction commence lors de l'ajout des 589 μl de la fraction calpaïnes de bar (*Dicentrarchus labrax* L.). Une période de latence de 2 minutes est considérée avant le début de chaque mesure. Cette période comprend l'introduction de l'échantillon dans la cellule et la mise sous pression de l'échantillon. La longueur d'onde d'excitation est de 355 nm (avec une bande passante de 4 nm) et celle d'émission est de 440 nm (avec une bande passante de 16 nm). Les réactions sous pression ont été réalisées à une température de 30°C.

8. Les techniques électrophorétiques

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique.

8.1. Le SDS-PAGE

Cette séparation électrophorétique est réalisée en condition dénaturante selon le principe de Laemmli (1970), sur des gels verticaux de polyacrylamide (8,0 cm de largeur, 7,3 cm de

hauteur). Les gels sont composés de deux parties. Une première partie du gel constitue le gel d'alignement ou de concentration permettant d'aligner les protéines avant leur migration (à 5 % en acrylamide) et une seconde beaucoup plus importante par la taille permet la séparation des protéines (à 12 % en acrylamide).

Les échantillons protéiques (3 volumes) sont dénaturés par ajout d'un tampon (1 volume) contenant 1 ml de Tris-HCl à 0,5 M (pH 6,8), 1,6 ml de glycérol, 3 ml d'eau milliQ, 1,6 ml de SDS 10 %, 0,4 ml de bromophenol et 0,4 ml de β -mercaptoéthanol (14,3 M) et par un chauffage à 100 °C pendant 5 minutes. Le but de cette dénaturation est de dissocier les sous-unités protéiques par chauffage avec la présence obligatoire d'un réducteur de ponts disulfures S-S (DTT ou β -mercaptoéthanol) et de charger toutes les protéines négativement par chélation avec le SDS. Les protéines ainsi chargées migreront uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

Le gel d'alignement est un gel à 5 % en acrylamide composé de 1,25 ml de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, de 2,775 ml d'eau milliQ, de 25 μ l de persulfate d'ammonium 10%, de 0,835 ml d'une solution d'Acrylamide-bis 37,5 :1 à 30% en acrylamide et de 5 μ l de TEMED. Le gel de séparation est un gel à 10% en acrylamide composé de 1,25 ml de tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, de 1,95 ml d'eau milliQ, de 25 μ l de persulfate d'ammonium 10%, de 1,66 mL d'une solution d'Acrylamide-bis 37,5 :1 à 30% en acrylamide et de 5 μ l de TEMED.

Chaque migration est réalisée dans du tampon de migration contenant 1,5 g de Tris, 14,4 g de glycine et 1 g de SDS pour 1 litre de solution finale, à 15 mA pendant 10 minutes pour aligner les protéines et ensuite à 30 mA jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel de séparation.

Ces protéines sont révélées par la suite selon deux colorations.

Les deux colorations utilisées sont la coloration au bleu de Coomassie et la coloration au nitrate d'argent.

Le choix de la coloration dépend de la sensibilité désirée. Le bleu de Coomassie est moins sensible que la coloration au nitrate d'argent.

La coloration au bleu de Coomassie débute par une étape de fixation/coloration dans une solution contenant 50 % de méthanol, 10 % d'acide acétique, 15 % d'eau milliQ et 25 % de bleu de Coomassie R 250 (préparé à 1 g.l⁻¹). Ensuite, elle se poursuit par une étape de décoloration qui peut durer une nuit dans une solution composée de 30 % de méthanol, 10 % d'acide acétique et 60 % d'eau milliQ. Les bains de décoloration seront renouvelés régulièrement. Enfin, les gels peuvent être séchés et stockés.

La coloration au nitrate d'argent est une succession d'étapes dans différentes solutions et durant différents temps. Les étapes sont :

-la fixation dans une solution composée de 40 % d'éthanol, de 50 % d'eau milliQ et de 10 % d'acide acétique (45 minutes).

-le lavage dans une solution composée de 5 % d'éthanol, de 90 % d'eau milliQ et de 5 % d'acide acétique (une nuit).

- la réduction dans le réactif thiosulfate composé de 0,02 % de thiosulfate de sodium (1 minute).

- la coloration dans le réactif au nitrate d'argent composé de 0,2 % de nitrate d'argent, de 0,02 % de formaldéhyde (37 %) (20 minutes).

-le développement dans 3 % de carbonate de sodium, 0,05 % de formaldéhyde (37%) et 0,0005 % de thiosulfate de sodium (quelques minutes).

-et enfin de l'arrêt de la coloration dans 0,5 % de glycine (5 minutes).

Le tableau récapitule le déroulement de cette coloration.

Étapes	Solutions utilisées	Temps
Fixation	Solution de fixation	Environ 45 minutes
Lavage	Solution de lavage	Une nuit
Lavage	Eau milliQ	3 fois 20 secondes
Réduction	Réactif thiosulfate	1 minute
Lavage	Eau milliQ	3 fois 20 secondes
Incubation	Réactif au nitrate d'argent	20 minutes
Lavage	Eau milliQ	3 fois 20 secondes
Développement	Développeur	3-5 minutes
Lavage	Eau milliQ	3 fois 20 secondes
Arrêt de réaction	Solution d'arrêt	5 minutes
Lavage	Eau milliQ	

Tableau 13 : Déroulement de la coloration au nitrate d'argent

Deux marqueurs de taille sont utilisés, un de bas poids moléculaires : 66, 45, 36, 29, 24 et 20 kDa et un de hauts poids moléculaires : 205, 116, 97,4, 66, 45 et 29 kDa (Sigma markers, Saint Louis, USA).

8.2. La méthode du zymogramme

Grâce à la technique du zymogramme, il est possible de détecter des différences de structure d'enzymes en les faisant migrer sur des gels d'acrylamide dans des conditions non dénaturantes. Les enzymes sont ensuite révélées *in situ* grâce à une coloration qui indique où l'enzyme est active. Dans le cas présent, l'objectif est d'identifier l'activité des calpaïnes. Le substrat utilisé est la caséine.

Les gels, comprenant de la caséine, sont composés de deux parties. La première partie du gel constitue le gel d'alignement permettant d'aligner les protéines avant leur migration (à 5 % en acrylamide /bis 37,5 :1) et la deuxième beaucoup plus importante par la taille pour permettre la séparation des protéines (à 10 % en acrylamide /bis 37,5 :1).

Le gel d'alignement est un gel à 5% en acrylamide composé de 1,25 ml de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, de 2,775 ml d'eau milliQ, de 25 µl de persulfate d'ammonium 10%, de 0,835 mL d'une solution de Bis-Acrylamide 30% bis 37,5 :1, de 5µl de TEMED et de 250 µl de caséine 4%. Le gel de séparation est un gel à 10% en acrylamide composé de 1,25 ml de tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, de 1,95 ml d'eau milliQ, de 25 µl de persulfate d'ammonium 10%, de 1,66 ml d'une solution de Bis-Acrylamide 30% 37,5 :1, de 5µl de TEMED et de 250 µl de caséine 4%.

A chaque échantillon protéique (1 volume) est ajouté du tampon (1 volume) contenant 2,5 ml de Tris-HCl à 0,5 M (pH 6,8), 2 ml de glycérol, 3 ml d'eau, 0,1% de bleu de bromophénol, 5 mM d'EDTA et 5 mM de β-mercaptoéthanol.

Lorsque le dépôt des échantillons est effectué, la migration est réalisée à 4°C dans du tampon de migration contenant 3 g de Tris, de 14,4 g de glycine, de 2 mL d'EDTA à 0,5 M et 0,352 ml de β-mercaptoéthanol pour 1 litre de solution finale. La migration se déroule à un voltage constant de 20 Volts pendant 18 heures.

La révélation de l'action des calpaïnes se fait durant une nuit d'incubation à température ambiante dans une solution composée de 100 mL de Tris-HCl 200 mM pH 7,5, 1 ml de CaCl₂ 0,5 M, 1 ml de cystéine 0,5 M et 35 µl de β-mercaptoéthanol.

Lors de la révélation après l'électrophorèse, les enzymes dégradent la caséine au sein du gel après séparation et incubation dans un milieu réactionnel et après par une coloration dans du bleu de Coomassie, l'emplacement où l'enzyme a agi est visualisé par une bande blanche.

9. Autre technique biochimique : mesure de l'hydrophobie de surface des protéines

L'hydrophobie de surface des protéines est mise en évidence grâce à un réactif fluorescent, l'ANS (anilidonaphthalène-8-sulfonate). Cette molécule a une affinité pour les acides aminés hydrophobes et forme des complexes fluorescents avec ceux qui sont accessibles à la surface des protéines. Cette fluorescence est révélée par une émission à 490 nm après avoir excité les molécules à 380 nm. Grâce à cette technique, les modifications structurales des protéines peuvent être évaluées après un traitement par hautes pressions.

Différentes dilutions des extraits de protéines, sont réalisées. Pour chaque échantillon, 2 ml sont ajoutés à 10 µl d'ANS préparé à 0,8 mM dans de l'eau milliQ. Après 2 heures de réaction, une lecture de fluorescence est effectuée avec une excitation de 380 nm et une émission de 490 nm. Pour chaque échantillon, la pente est déterminée grâce aux différentes valeurs de fluorescence obtenues en fonction des différentes dilutions. Les échantillons peuvent ainsi être comparés entre eux.

10. L'analyse de la microstructure

Cette analyse permet de quantifier les modifications histologiques au sein du muscle de poisson.

Les échantillons de muscle de poisson sont découpés transversalement aux fibres du muscle dans la partie la plus épaisse du filet (taille de 10×5×5 mm environ) comme indiqué sur le schéma ci-dessous (cf. figure 31).

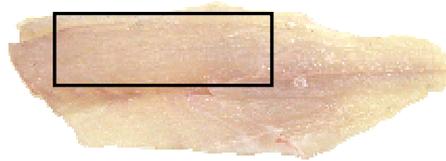


Figure 31 : Schéma d'un filet de poisson. La zone encadrée correspond à la zone de prélèvement.

L'analyse de la microstructure commence par une étape de fixation. Les échantillons sont fixés le plus rapidement possible dans une solution de Carnoy (cette solution est composée de 60 % d'éthanol absolu, de 30 % de chloroforme et de 10% d'acide acétique glacial, v/v) à 4°C pendant 24 heures.

Les échantillons sont ensuite déshydratés à température ambiante par des passages successifs dans plusieurs solutions d'alcool : un bain de deux heures dans une solution d'éthanol, puis deux bains de deux heures dans une solution d'éthanol et un dernier d'une nuit dans une solution de butanol.

Les échantillons déshydratés sont alors nettoyés dans différentes solutions de toluène afin d'éliminer l'alcool: une heure dans une solution de toluène 50%-butanol 50%, et deux fois une heure dans une solution à 100% en toluène.

Suite à cette étape, les échantillons sont inclus dans de la paraffine à une température de 56-58°C. Cette dernière étape se fait en augmentant progressivement la concentration en paraffine : paraffine 30%-toluène 70% pendant deux heures, paraffine 60%-toluène 40% pendant une heure, paraffine 100% pendant une heure et paraffine 100% pendant une heure avec agitation. La dernière étape d'incorporation dans la paraffine est réalisée dans des moules pour permettre d'obtenir un bloc régulier facilitant ainsi la découpe de l'échantillon en fines tranches.

Les échantillons ainsi préparés sont découpés à l'aide d'un microtome Leica SM2000 (Leica, Solms, Allemagne) en coupes d'une épaisseur de 10 µm.

La coupe est déposée sur une lame en verre en présence d'ovalbumine, le tout posé sur une platine chauffante. Cette étape permet de fixer l'échantillon à la lame.

Enfin, l'étape de coloration permet d'identifier différents constituants de la coupe. Le colorant orange G colore les fibres musculaires et le bleu d'aniline colore le collagène. Sur les différentes coupes, quelques gouttes d'une solution orange G (0,5 g d'orange G, 1 ml d'acide acétique dissous dans 99 ml d'eau distillée, filtration à 0,45 µm) sont déposées sur les coupes. Après avoir laissé agir 5 minutes, un lavage à l'eau distillée est opéré avec précaution. La deuxième coloration avec le bleu aniline (0,01 g de bleu d'aniline, 1 ml d'acide acétique dissous dans 99 ml d'eau distillée et filtré à 0,45 µm) dure à nouveau 5 minutes. Les différentes lames

sont lavées une dernière fois à l'eau distillée. Elles sont ensuite séchées à température ambiante avant de réaliser le montage avec une lamelle fixée avec un baume d'inclusion Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France).

Les échantillons sont examinés avec un microscope photonique (Leica DML, Solms, Allemagne) équipé d'un appareil photo CCD RVB (MACC-C71, Sony, Japon).

11. La mesure colorimétrique

11.1. Le principe

Les mesures de couleur sont réalisées à l'aide d'un colorimètre. Cet instrument permet de quantifier les couleurs par une expression chiffrée qui s'intègre dans l'espace couleur tel que le système $L^*a^*b^*$. Ce système CIE $L^*a^*b^*$ introduit dès 1976, aussi nommé diagramme chromatique psychométrique, permet l'évaluation des différences de couleur. Ce système essaie de rapprocher les écarts de couleurs mesurés aux écarts de couleurs tels qu'ils sont perçus par l'œil. Ainsi, chaque point peut être représenté dans un espace selon trois coordonnées L^* , a^* , b^* où L^* représente la clarté (indice de luminosité relatif allant de 0 pour le noir à 100 pour le blanc absolu), a^* représente la composante chromatique rouge-vert (rouge quand la valeur est positive et vert quand la valeur est négative) et b^* représente la composante chromatique jaune-bleu (jaune quand la valeur est positive et bleu quand la valeur est négative) (cf. figure 32).

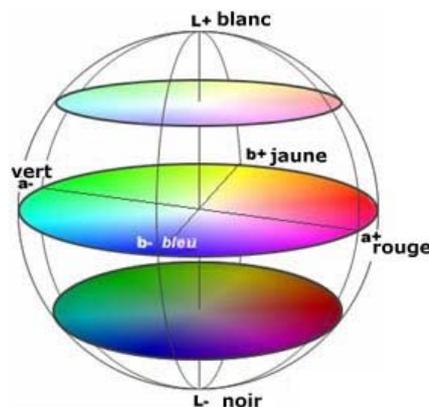


Figure 32 : Schéma du diagramme de couleur du système $L^*a^*b^*$ (CIE, 1976)

Nous nous sommes aussi intéressés à certaines données de l'espace $L^*C^*h^*$ obtenu en passant l'espace $L^*a^*b^*$ en coordonnées semi-polaires. La composante C^* représente le chroma (ou saturation) et h^* la teinte. Ces valeurs sont calculées grâce aux formules suivantes :

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$h^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

11.2. La préparation des échantillons

Les échantillons proviennent de filets de poisson ayant subi différents traitements par hautes pressions et conservés pendant différentes périodes de stockage. A l'aide d'un emporte-pièce de 2 cm, des rondelles sont découpées dans la partie supérieure des filets (cf. figure n°29). Pour chaque condition de traitement et de stockage, dix échantillons sont réalisés.

11.3. La mesure de la couleur

Les mesures de couleur sont faites avec un spectrophotomètre Minolta CM-3500d (Minolta, Carrières-sur-Seine, France). Cet appareil fonctionne en mode réflectance, ce qui signifie que la surface de l'échantillon est éclairée et grâce à un récepteur qui capte la lumière réfléchiée les valeurs sont enregistrées. Les mesures sont alors basées sur la quantité de lumière réfléchiée par une surface. Chacune d'entre elles réfléchit différentes quantités de lumières à plusieurs niveaux du spectre compris entre 400 et 700 nm. Le colorimètre donne les valeurs L^*, a^*, b^*, C^* et h^* de l'échantillon.

12. La mesure d'exsudation

L'exsudat est défini comme le liquide qui est libéré ; il dépend dans le cas présent du traitement appliqué et du temps de stockage. Pour cela, chaque filet est pesé avant le traitement. Les filets sont égouttés sur du papier absorbant après traitement et à nouveau pesés. La différence entre deux pesées permet de déterminer la quantité de liquide exsudé. Chaque valeur expérimentale représente la moyenne de quatre échantillons ayant subi le même protocole.

13. La mesure de la capacité de rétention d'eau

La capacité de rétention d'eau (Water Holding Capacity) est un terme qui est employé pour décrire la capacité d'une matrice moléculaire (souvent des macromolécules) à emprisonner une grande quantité d'eau pour empêcher l'exsudation. Pour faire le prélèvement, la même zone du filet que celle pour évaluer la couleur est choisie (cf. figure 29). Les échantillons sont hachés grossièrement. Dix grammes de ce broyat sont transférés dans un tube qui est soumis à une

centrifugation de $10000 \times g$ pendant 15 minutes à 20°C (GR 20.22, Jouan, France). Suite à cette centrifugation, les tubes sont retournés et laissés à s'égoutter. Le tube est à nouveau pesé. En faisant la différence entre la pesée avant et après l'opération de centrifugation suivie de l'égouttage, la capacité de rétention en eau peut être déterminée. Elle est exprimée en pourcentage d'eau emprisonnée dans le muscle.

14. La mesure de texture

La texture du muscle est caractérisée par l'analyse du profil de texture (TPA : Texture Profil Analysis). Ce mode d'analyse a été mis au point par Bourne en 1978 et a pour but d'obtenir plusieurs paramètres texturaux, dont la corrélation avec certaines appréciations sensorielles est élevée.

Toutes les mesures sont réalisées avec un texturomètre (Lloyd Instruments LR5K, Montigny-Le-Bretonneux, France) équipé d'un capteur de 50 Newtons. L'ensemble de ces manipulations est réalisé à température ambiante ; les échantillons sont équilibrés à cette température pendant une heure avant la mesure. Ce mode opératoire se caractérise par deux compressions successives. Dix échantillons de 20 millimètres de diamètre sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce dans la partie dorsale des filets et de façon perpendiculaire aux fibres musculaires. Pour chaque cylindre obtenu, la hauteur est mesurée (épaisseur entre 11 et 14 mm). Chaque échantillon est comprimé entre une plaque en acier et une platine de 40 mm de diamètre.

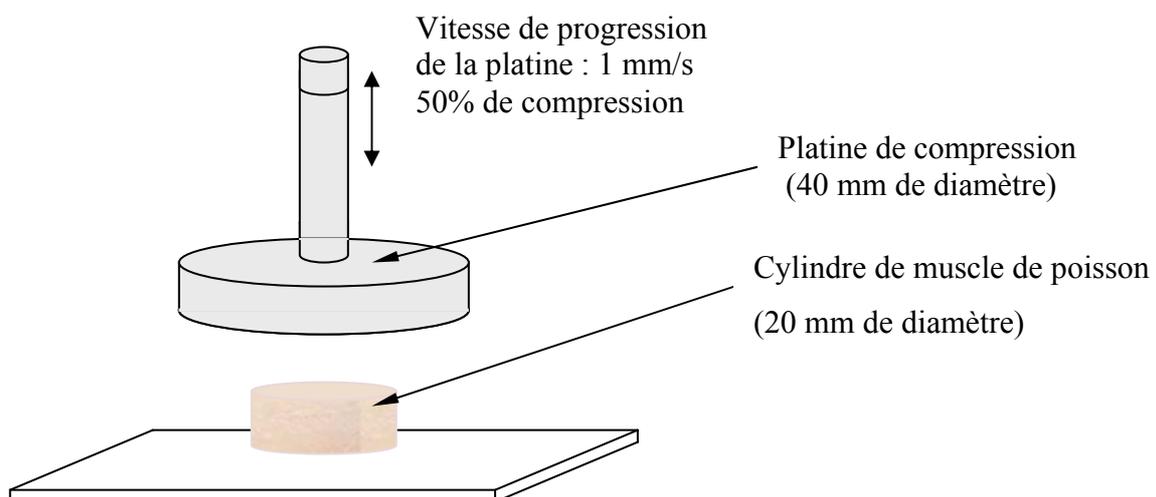


Figure 33 : Principe de mesure en compression pour établir une analyse du profil de texture.

Le cycle de mesure est composé de deux compressions de 50% de la hauteur du cylindre avec 30 secondes de « repos » entre les deux (cf. figure 33). La vitesse de déplacement de la platine de compression est de 1 mm/s. Ce type de compression permet d'avoir un profil de courbe comme présenté dans la figure 34 à partir duquel on détermine plusieurs caractéristiques :

- la dureté qui correspond à la force maximale nécessaire pour obtenir la déformation imposée

- la cohésion qui correspond au degré auquel l'échantillon se déforme avant la rupture ($(A3+A4) / (A1+A2)$), où $(A1+A2)$ et $(A3+A4)$ sont les énergies totales exigées, respectivement, pour la première compression et la deuxième compression

- l'élasticité qui correspond à la capacité que l'échantillon a pour retrouver sa forme initiale après la compression ($L2/L1$), où $L1$ est l'allongement de la première compression et $L2$ est l'allongement de la deuxième compression

- la gommosité qui est l'énergie requise pour désagréger un aliment de l'état semi-solide à un état prêt pour l'ingestion (dureté x cohésion)

- la masticabilité qui correspond au travail nécessaire pour avoir un échantillon à une consistance apte à l'ingestion (élasticité x gommosité)

- la résilience qui est la force que le produit doit exercer pour retrouver sa position initiale ($A2/A1$), où l'aire $A1$ est l'énergie totale nécessaire pour la première compression et l'aire $A2$ est l'énergie totale nécessaire pour la décompression de la première compression.

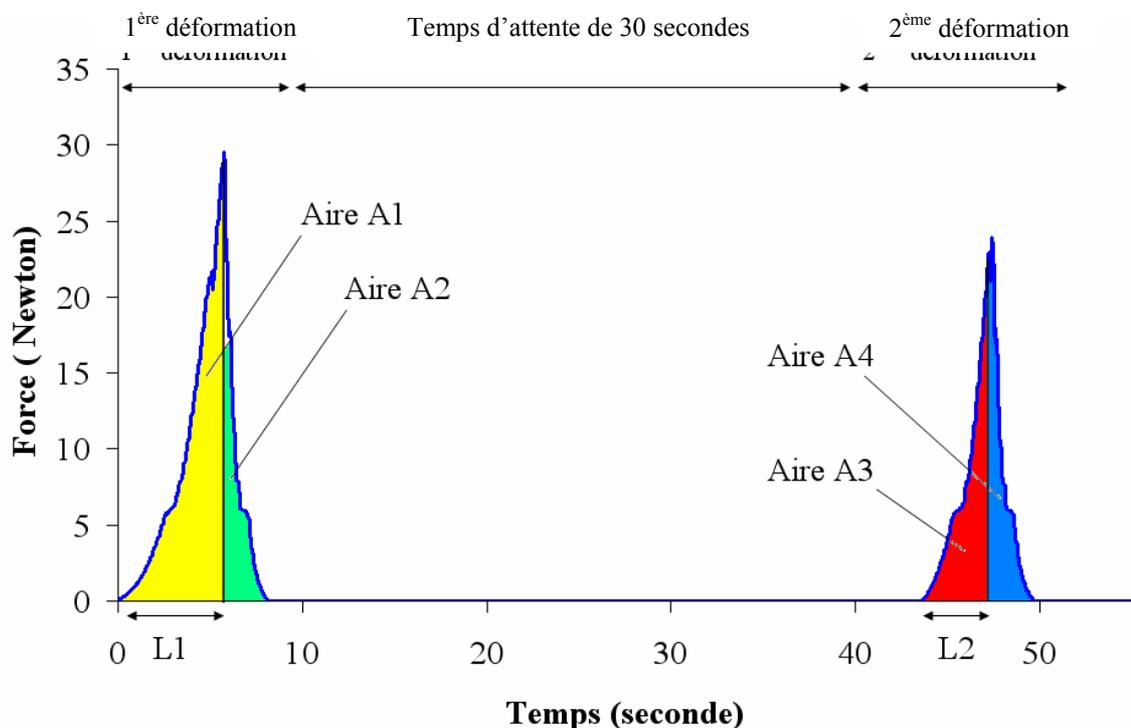


Figure 34 : Représentation de l'allure typique d'un profil de texture TPA.

15. L'analyse microbiologique

Le but de cette analyse est de quantifier la flore totale après la mort du poisson au cours du stockage à 4°C, selon les différents traitements par hautes pressions.

15.1. Préparation des échantillons

Suite aux différents traitements par hautes pressions, dans des conditions stériles, des aliquots de 10 g de filets de bar sont préparés dans des sacs stériles (Grosseron, Nantes) pour être ensuite homogénéisés à l'aide d'un Stomacher (Grosseron, Nantes) durant 30 secondes dans 90 ml d'eau peptonée stérile (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

15.2. L'ensemencement et le dénombrement

Des séries de dilution au dixième de l'homogénat obtenu précédemment sont réalisées successivement. Pour chacun des échantillons, trois réplicats sont effectués. Cette opération réalisée, les ensemencements sont effectués dans la masse sur un milieu P.C.A. (Plate Count Agar) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

Après une incubation de 72 heures à 30°C, la quantité des colonies formées est comptée (CFU : Colony Forming Unit). Selon les dilutions, seules les boîtes avec des CFU comprises entre 25 et 300 sont comptées. Les résultats présentés sont exprimés en CFU par g d'échantillons de filets.

Résultats & Discussion

Partie 1.

| Études préliminaires

Résultats & Discussion

1. Études préliminaires

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser spécifiquement une réaction biochimique. Elles sont soumises à certaines régulations par des cofacteurs et/ou des inhibiteurs. De plus, leurs activités peuvent être perturbées par un changement du milieu environnant (pH, température,...) ainsi que par un changement de leur conformation.

1.1. L'effet du vide sur l'activité des enzymes

Chaque traitement par hautes pressions nécessite, au préalable, la mise sous vide de l'échantillon quel que soit son état (liquide ou solide). L'échantillon est emballé dans un sac en plastique déformable, dans lequel sera fait le vide.

Des études préliminaires effectuées au laboratoire avaient conduit à l'hypothèse que le contact des protéases avec le vide avait des conséquences sur l'activité enzymatique. Cette expérimentation avait donc pour but d'étudier l'influence du vide sur les activités enzymatiques. L'influence du vide a été étudiée sur l'activité enzymatique des calpaïnes de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.). La comparaison de deux échantillons, dont l'un a été mis sous vide, permet de constater que l'évolution des deux activités est similaire (cf. figure 35). Le vide n'interfère donc pas avec l'activité de ces protéases. Les calpaïnes sont souvent citées comme des protéases fragiles : elles peuvent être beaucoup plus sensibles à de telles interactions. On supposera que les autres enzymes ne sont pas sensibles à l'emballage. Par la suite, tous les échantillons traités par hautes pressions seront mis sous vide, qu'ils soient sous forme solide (muscle) ou liquide (extrait).

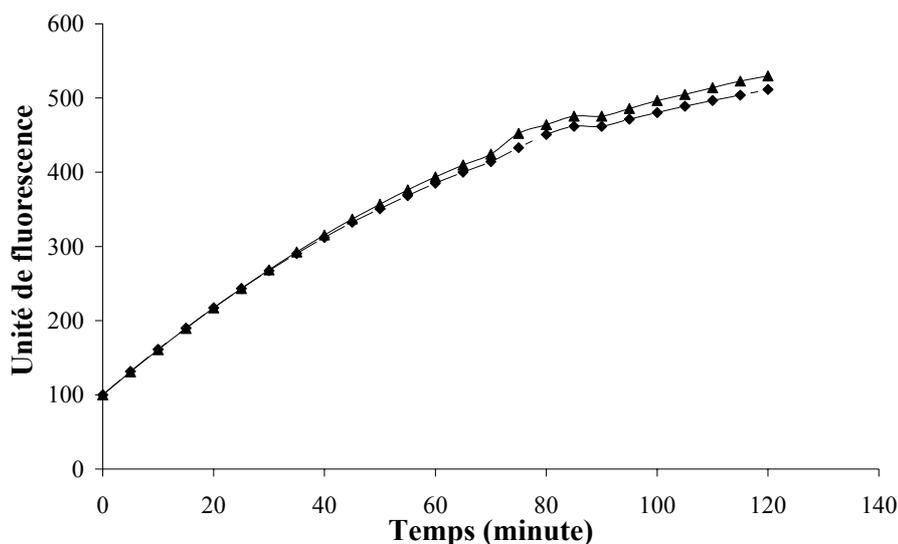


Figure 35 : Effet de la mise sous vide sur l'activité enzymatique des calpaïnes de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) (◆: échantillon mis sous vide ; ▲ : échantillon non mis sous vide).

1.2. Séparation des calpaïnes de leur inhibiteur, la calpastatine dans le muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) et dans le muscle bovin (*Biceps femoris*)

Les calpaïnes sont des protéases présentes dans les muscles de bovin et dans les muscles de poisson. *In vivo*, elles sont régulées par un inhibiteur endogène, la calpastatine, ce dernier étant souvent présent en excès dans les cellules (aucune activité calpaïne n'est détectable dans un extrait sarcoplasmique brut). Une séparation des calpaïnes de leur inhibiteur par chromatographie d'interactions hydrophobes est donc nécessaire pour étudier l'activité de ces protéases (Goll *et al.*, 2003). Cette chromatographie s'appuie sur les propriétés hydrophobes différentes des calpaïnes et de la calpastatine. Les calpaïnes, qui ont plus de sites hydrophobes exposés à la surface de la protéine, ont une meilleure affinité pour une colonne hydrophobe et seront donc éluées dans une deuxième étape alors que la calpastatine ne sera pas fixée.

Suite à cette séparation, deux profils distincts sont observés et caractérisent les deux types de muscle étudiés, le muscle blanc de bar et le muscle bovin.

La comparaison des figures 36 et 37 montre des différences se situant principalement au niveau du pic correspondant à la fraction non retenue. Celle-ci se matérialise par la présence d'un épaulement pour le profil d'éluion du muscle de bar. Cette absence de similitude est due au fait que le contenu protéique des deux extraits sarcoplasmiques est différent.

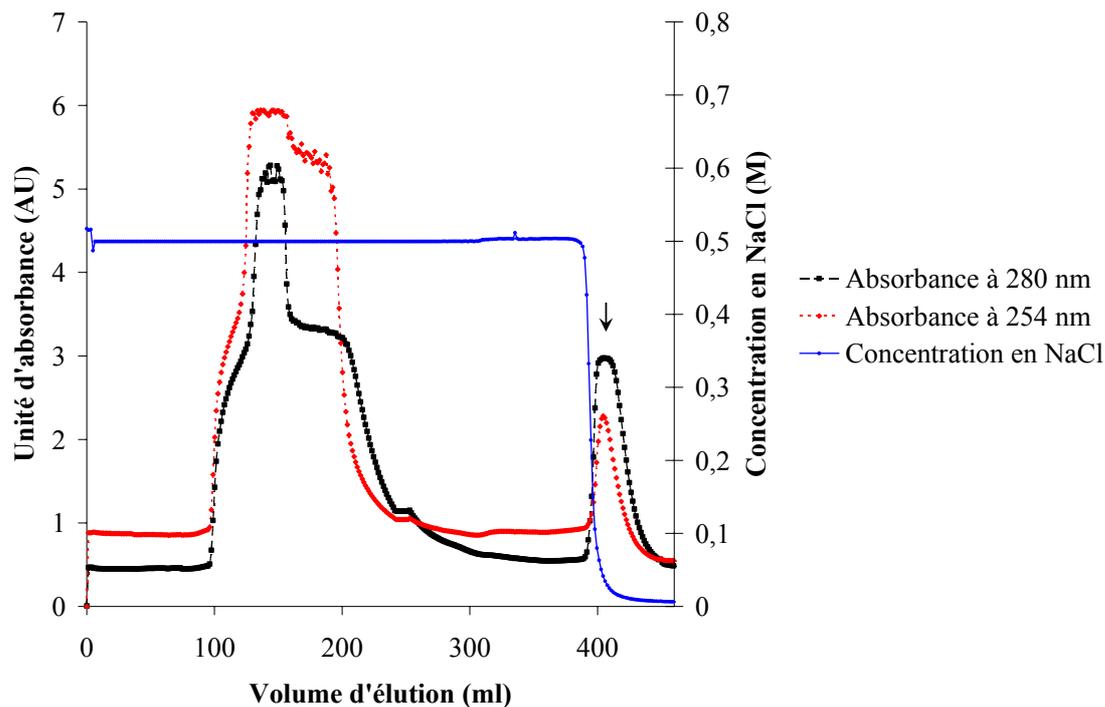


Figure 36 : Profil d'élution sur une colonne Phenyl Sepharose CL-4B d'un extrait de muscle de bar (*Dicentrarchus labrax* L.). La flèche indique la position du pic contenant les calpaïnes.

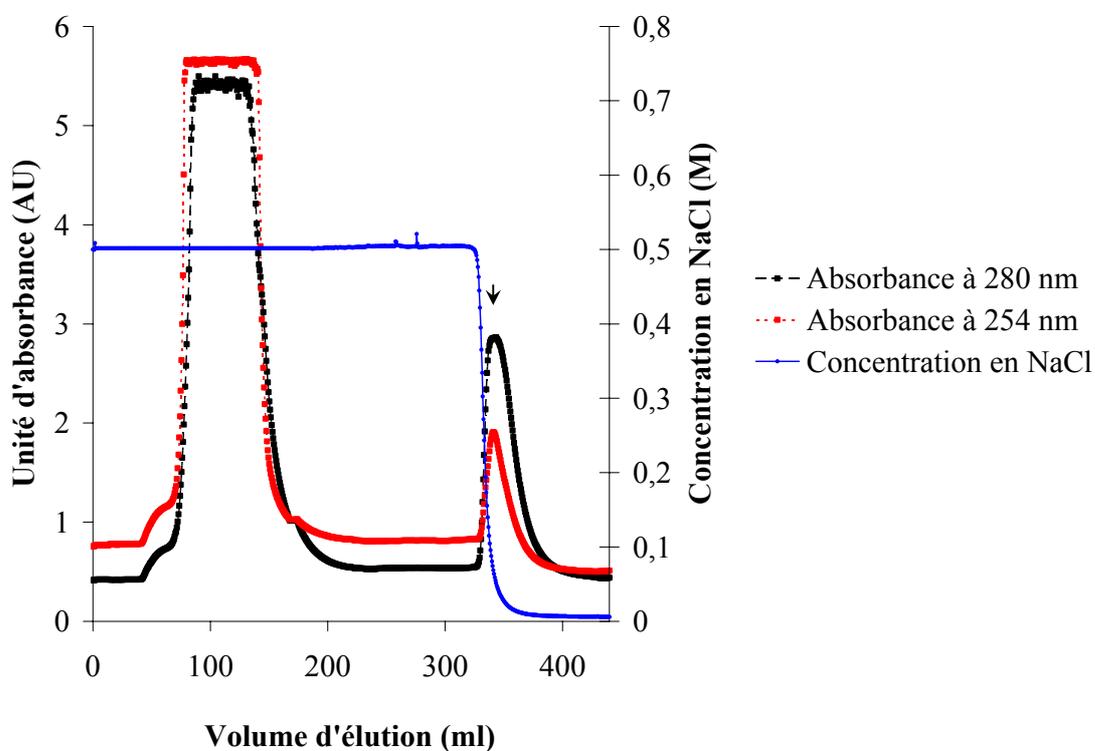


Figure 37 : Profil d'élution sur une colonne Phenyl Sepharose CL-4B d'un extrait de muscle bovin (*Biceps femoris*). La flèche indique la position du pic contenant les calpaïnes.

Partie 2.

Comparaison de l'activité des
enzymes entre la viande et le
poisson

2. Comparaison de l'activité des enzymes entre la viande et le poisson

L'attente du consommateur est différente pour le muscle de viande et la chair de poisson. Le consommateur recherche une texture de chair ferme dans le cas du poisson, alors que pour la viande rouge, la tendreté est la caractéristique la plus importante et la plus recherchée. Pour les deux muscles, la texture évolue au cours du stockage *post-mortem* et la fermeté diminue. Ce phénomène pourrait être dû à l'action de protéases cellulaires.

Aussi, au cours de cette étude, les principales enzymes protéolytiques cellulaires ont été identifiées, ainsi que quantifiées au sein du muscle de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) et du muscle de bovin (*Biceps femoris*). De plus, le but de cette étude est d'évaluer les différents rôles, lors de la dégradation myofibrillaire, des protéases dans les deux types de muscle.

Pour comparer les niveaux d'activités des différentes protéases, les mêmes conditions ont été utilisées pour les deux types de muscles étudiés.

Enzymes protéolytiques	Activités totales	
	Muscle de bar	Muscle bovin
Cathepsine D	1,8 ± 0,21	2,4 ± 0,03
Cathepsine H	170 ± 39	212 ± 26
Cathepsine B	2168 ± 79	73 ± 13
Cathepsine (B+L)	11823 ± 681	2507 ± 620
Cathepsine L*	9655	2434
Calpaïnes	1308 ± 261	1224 ± 76
Calpastatine**	22444 ± 4021	5705 ± 1492
Ratio calpastatine / calpaïnes	17,2	4,7

Tableau 14 : Activités totales des enzymes protéolytiques (cathepsine D, cathepsine B, cathepsine H, cathepsines (B+L) et calpaïnes) dans le muscle blanc de bar et dans la viande de boeuf. Les unités des différentes activités sont l'absorbance à 295 nm.min⁻¹.g⁻¹ de muscle pour les cathepsines D et FU.min⁻¹.g⁻¹ de muscle pour les activités des autres cathepsines, des calpaïnes et des calpastatines. *Les activités de la cathepsine L sont calculées par soustraction des activités des cathepsines (B+L) et de la cathepsine B. **Une unité de calpastatine est définie comme la quantité inhibant une unité de calpaïne.

Les résultats présentés dans le tableau 14 montrent des disparités quant aux activités des différentes protéases dans ces conditions *in vitro*. Les cathepsines B et L ont une activité beaucoup plus importante dans le muscle de poisson que dans la viande (de 29,7 et 4,7 fois plus importante pour les cathepsines B et (B+L), respectivement). La cathepsine H est détectée dans les deux types de muscles mais en faible quantité. L'activité de la cathepsine D est environ 1,4 fois plus importante dans la viande que dans le muscle de poisson. Par ailleurs, l'activité des

calpaïnes est similaire dans les deux muscles mais l'activité de son inhibiteur endogène, la calpastatine, montre une très forte activité dans le muscle de bar.

L'évaluation des proportions des différentes activités est un paramètre important. Zamora *et al.* (1996) font mention d'une forte corrélation entre un muscle initialement riche en enzymes et un attendrissement important. Mais il faut également tenir compte de la quantité en inhibiteur.

Dans le muscle de poisson, malgré les incertitudes encore présentes, les deux systèmes protéolytiques, calpaïque et lysosomal, sont les plus souvent cités comme impliqués dans les modifications *post-mortem* et plus précisément, les cathepsines B, L et les calpaïnes (Jiang, 2000 ; Ogata *et al.*, 1998 ; Aoki & Ueno, 1997 ; Jiang *et al.*, 1996 ; Jiang *et al.*, 1992). L'activité de ces protéases est souvent liée au pH *post-mortem* rencontré *in situ* (Jiang, 2000 ; Makinodan *et al.*, 1982).

Dans les muscles de mammifères, de nombreuses études réalisées, en phase *post-mortem*, associent les dégradations musculaires à une action des calpaïnes (Goll *et al.*, 1998; Koohmaraie *et al.*, 1996). Plus particulièrement, pour le muscle bovin, il semble clair que les calpaïnes ont un rôle majeur dans la maturation (Mestre Prates *et al.*, 2002; Nagaraj *et al.*, 2002 ; Sentandreu *et al.*, 2002; Hopkins & Thompson, 2001a).

Nos résultats montrent que dans la famille des cathepsines à cystéine, les cathepsines B et L peuvent jouer un rôle dans le ramollissement du muscle de bar, alors que seule la cathepsine L peut intervenir dans l'attendrissement du muscle de bovin. L'activité de la cathepsine H peut être considérée, elle, comme négligeable dans les deux types de muscles, car elle est présente en faible quantité par rapport aux cathepsines B et L. Son implication dans la dégradation *post-mortem* des protéines myofibrillaires est insignifiante. Aussi, elle n'est pas citée dans la bibliographie comme principalement impliquée dans les dégradations *post-mortem* des protéines myofibrillaires.

La cathepsine D est importante dans le muscle de bovin, mais elle peut jouer un rôle aussi dans le muscle de poisson.

L'activité calpaïque est similaire dans le muscle de bar et dans le muscle bovin. Par contre, l'activité de la calpastatine est très différente. Ce qui entraîne des différences de proportions entre la calpaïne et les calpastatines dans les deux muscles. Ce résultat est en accord avec ceux de Ouali et Talmant (1991) qui ont montré qu'il existe aussi des différences de proportions des calpastatines dans différents muscles de mammifères. L'activité des calpastatines est très forte dans le muscle de poisson, ce qui peut mettre en doute l'implication du système calpaïque dans la dégradation *post-mortem*. Dans l'extrait global, l'inhibiteur est en quantité suffisante et nécessaire dans les deux muscles pour inhiber la totalité de l'activité des calpaïnes. Goll *et al.* (2003) ont rapporté de tels résultats montrant que les calpastatines, présentes en excès dans l'ensemble du muscle, avaient la capacité d'inhiber la totalité des calpaïnes mais que selon le tissu ou les cellules considérées, les proportions étaient différentes. La régulation des calpaïnes par leur inhibiteur dépend donc aussi de leur localisation, et donc des proportions des deux dans

une zone précise du muscle. En effet, Koohmaraie (1996) a montré que le taux d'attendrissement de la viande était plus fortement corrélé avec le ratio entre la calpastatine et les calpaïnes qu'avec seulement le contenu en calpaïnes. Par suite, dans cette étude, le ratio calpastatine/calpaïnes dans le muscle bovin est relativement faible, ce qui peut appuyer l'implication du système calpaïque dans la protéolyse *post-mortem* du muscle bovin. Geesink *et al.* (2000) ont partiellement purifié les calpaïnes et quantifié leurs activités présentes dans le muscle de saumon ; ensuite, ils ont réalisé une comparaison avec les activités dans le muscle de mouton et de bœuf. Dans le saumon, il y a beaucoup plus de calpastatine et l'activité des calpaïnes est 100 fois plus faible ; ce qui sous-entend que le ratio calpastatine/calpaïnes est plus important dans le muscle de saumon que dans celui de mouton. Nos résultats présentés ci-dessus, vont aussi dans ce sens. Tout ceci n'est pas favorable à un rôle majeur du système calpaïque dans la dégradation du muscle de poisson, en général et du muscle de bar, plus particulièrement.

Par ailleurs, les conditions environnementales *in situ* sont aussi à prendre en compte, car elles peuvent favoriser ou non l'activité des différentes protéases. Nos résultats ne reflètent pas totalement la situation *in situ*. Les dosages ont été réalisés dans des conditions de pH proche de l'optimum. De plus, les cofacteurs, comme le calcium pour les calpaïnes, sont présents en quantité nécessaire pour une totale activation, et sont donc loin des concentrations physiologiques, bien que l'on sache qu'elles augmentent naturellement suite à la mort de l'animal. Des activateurs comme des phospholipides membranaires, d'autres cations, des activateurs protéiques, et des procédés de phosphorylation peuvent favoriser l'action des calpaïnes malgré de faibles concentrations en calcium par rapport à celles requises (Baki *et al.*, 1996 ; Johnson, 1990 ; Suzuki & Ohno, 1990). Ce point reste encore mal connu, car l'implication de la m- ou de la μ -calpaïne ou des deux, liée aux concentrations en calcium, n'a jamais été réellement démontrée.

Dans le muscle de poisson, après la mort du poisson et pendant la période de *rigor mortis*, le pH baisse de 7 à 6,5. Dans le muscle bovin, le pH est proche de 6,5 après la mort et diminue rapidement pour atteindre une valeur proche de 5,7-5,4 après 24 heures de stockage (Ouali, 1990). Ainsi, dans le muscle de poisson, les cathepsines B, L et les calpaïnes peuvent se trouver plus actives que la cathepsine D, puisque leur pH optimal est proche de celui retrouvé durant la période *post-mortem* (Jiang, 2000 ; Makinodan *et al.*, 1982). Dans le cas de la viande, le pH *post-mortem* serait plus propice à une activité des protéases lysosomales et précisément des cathepsines B, L et D. Mais aussi, les calpaïnes pourraient exercer pleinement leur activité au début de la période *post-mortem* dans le muscle bovin car le pH est, à ce moment précis, plus élevé.

Les conditions environnementales, comme le pH, ne sont pas les seules entraves à une dégradation protéolytique. Les cathepsines emprisonnées dans leurs lysosomes ne peuvent être actives dans le tissu vivant, du fait de l'absence d'un possible contact avec leurs substrats. Après la mort de l'animal, et suite à des mécanismes qui conduisent à une rupture de la membrane de ces vésicules, cette famille de protéases peut être libérée dans le cytosol.

Beaucoup de questions restent encore en suspens ou pas pleinement élucidées. L'ensemble de ces études suggère que la principale cause de dégradation *post-mortem* du muscle blanc de bar serait due à l'action des cathepsines B et L, mais aussi du système calpaïque, sûrement en tant que second rôle. Dans les mécanismes d'attendrissement du muscle de bovin, le faible ratio calpastatine/calpaïnes et la présence importante de cathepsine L montrent que ces deux systèmes peuvent agir de façon synergique. De plus, dans la viande, après quelques heures *post-mortem*, les conditions physiologiques de pH, peuvent devenir plus propices à une action de la cathepsine D.

En conclusion, les résultats présentés suggèrent que la dégradation *post-mortem* du muscle de bar est due en partie à l'activité des cathepsines B et L. Dans le muscle bovin, le ratio peu élevé entre la calpastatine et les calpaïnes montre que le système calpaïne peut être impliqué dans la maturation. De plus, la cathepsine D, de par son activité, a sûrement aussi un rôle à jouer : les conditions physiologiques de la viande peuvent permettre l'activité des cathepsines D.

Partie 3.

Effet de la pression sur
l'activité des enzymes
protéolytiques

3. Effet de la pression sur l'activité des enzymes protéolytiques

Il existe peu de travaux sur les modifications par la pressurisation des activités protéolytiques des muscles de poissons et de mammifères. L'effet de la pression dépend des niveaux de pressions utilisés, du temps de pressurisation, du type d'enzyme étudiée et de son origine.

3.1. Choix des hautes pressions

Pour le traitement par hautes pressions, trois paramètres sont à prendre en compte : l'intensité de la pression, le temps de pressurisation et la température de pressurisation.

L'intensité de la pression maximale sera de 500 MPa. Cette pression correspond à la pression maximale utilisée dans les industries agro-alimentaires. Le temps de pressurisation est de 5 minutes : cette durée correspond au temps minimum pour obtenir des effets sur la flore microbienne. Et enfin, lors du traitement, il faut conserver au maximum la chaîne du froid, pour cela, la température choisie de l'enceinte sera de 10 °C,.

Les travaux réalisés par Jung (2000) sur l'effet des hautes pressions sur la texture, l'ultra-structure et les enzymes lysosomales de viande bovine, ont utilisé des paramètres identiques de traitement.

3.2. Effet de la pression sur les calpaïnes

Deux protocoles distincts ont été mis en place : soit le muscle est pressurisé dans un premier temps et seulement après les calpaïnes sont extraites, soit les calpaïnes sont extraites et séparées de leur inhibiteur et ensuite le traitement par hautes pressions est appliqué sur cet extrait.

3.2.1. L'effet de la pression sur les calpaïnes présentes dans le muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) et dans le muscle de bovin (*Biceps femoris*)

L'effet de la pression sur les calpaïnes présentes dans le muscle blanc de bar et dans le muscle de bovin a été étudiée.

Les figures 38 et 39 montrent l'activité résiduelle, après le traitement par hautes pressions, des calpaïnes présentes dans le muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) et dans

le muscle de bovin (*Biceps femoris*) selon les deux protocoles décrits ci-dessus.

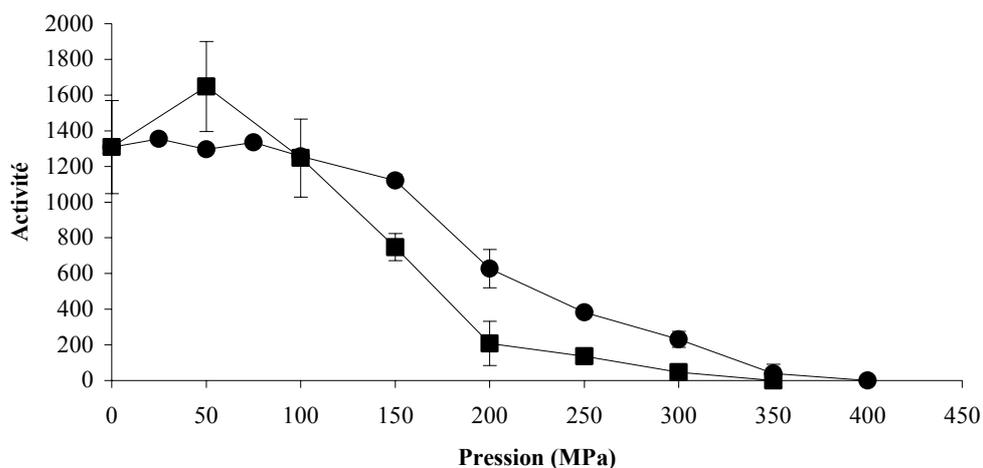


Figure 38 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité des calpaïnes de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) issues de muscle pressurisé (■) ou d'extrait pressurisé (●). L'activité est exprimée en $\text{FU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de muscle. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

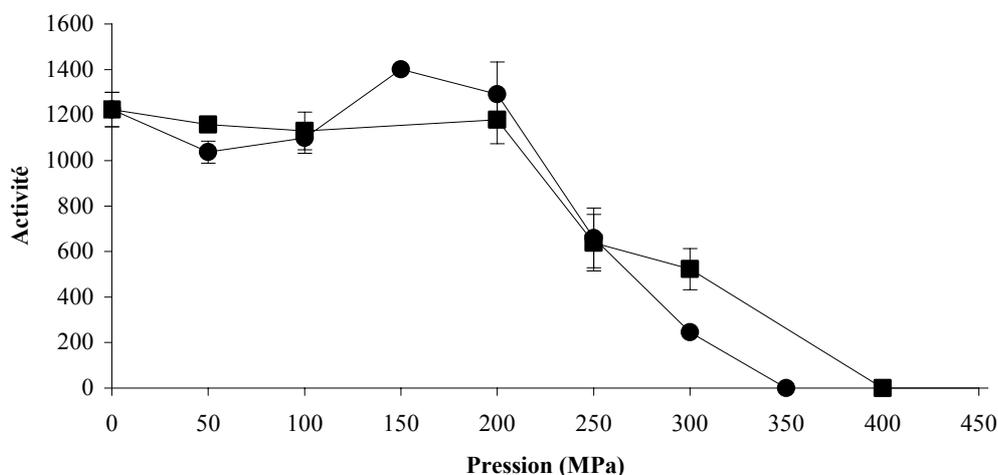


Figure 39 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité des calpaïnes de bovin (*Biceps femoris*) issues de muscle pressurisé (■) ou d'extrait pressurisé (●). L'activité est exprimée en $\text{FU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de muscle. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

Les allures générales des courbes sont semblables. Néanmoins, il demeure quelques différences.

Pour les calpaïnes du muscle de bar, lorsque le muscle est pressurisé, une baisse de l'activité se produit à partir de 100 MPa et l'activité est nulle à 350 MPa, et lorsque l'extrait

contenant les calpaïnes est pressurisé, l'activité baisse à partir de 100 MPa avec une pente plus faible et devient nulle à 400 MPa.

Pour le muscle bovin, les activités des calpaïnes sont stables jusqu'à des pressions de 200 MPa et ensuite elles diminuent sensiblement pour atteindre une valeur nulle à 350 MPa et 400 MPa, respectivement, pour l'extrait de calpaïnes pressurisé et le muscle pressurisé.

Ainsi, selon que le muscle ou l'extrait contenant les calpaïnes est pressurisé, les résultats sont légèrement différents. De plus, il existe aussi des différences entre le muscle de poisson et le muscle de mammifère.

Les calpaïnes sont des protéases hétérodimériques constituées d'une grosse sous-unité catalytique et d'une petite sous-unité régulatrice. L'effet des hautes pressions sur les modifications structurales de cette protéase a été étudié par Bessière *et al.* (1999) : leurs résultats ont montré que les hautes pressions permettent de dissocier les deux sous-unités.

La figure 40, issue des travaux de Bessière *et al.* (1999a), montre par une analyse en fluorescence, l'évolution de la structure de l'hétérodimère de la m-calpaïne de lapin. Les auteurs ont mentionné que les hautes pressions provoquent une dissociation de la forme hétérodimérique des calpaïnes. Le profil de cette courbe est quasi superposable aux courbes d'activités que nous avons obtenues. Cela permet de supposer qu'il y a une corrélation entre la dissociation de ce dimère et la diminution de l'activité de ces calpaïnes. Les calpaïnes, suite aux différents traitements appliqués, seraient dissociées et perdraient donc une grande partie de leur activité enzymatique. Il a été montré par Tsuji & Imahori (1981) que toute la machinerie nécessaire pour la protéolyse était présente dans la grosse sous-unité mais par contre, pour que la protéolyse soit la plus performante, la présence de la petite sous-unité était indispensable. Ces observations corroborent l'hypothèse que nous proposons.

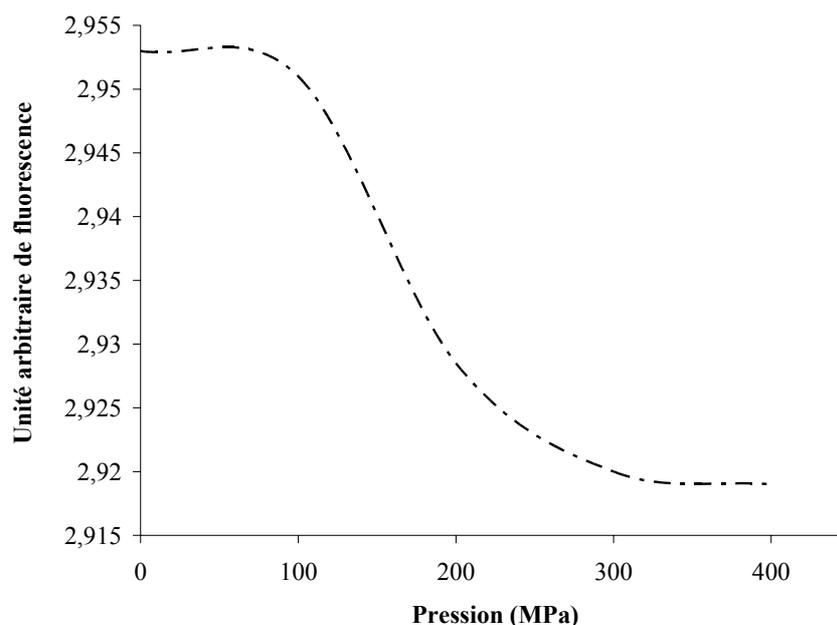


Figure 40: Effet du traitement hautes pressions sur la dissociation de la m-calpaïne de lapin d'après les travaux de Bessière *et al.* (1999a).

3.2.2. L'activité des calpaïnes de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) sous pression

Suite aux travaux précédents, il est possible de s'interroger sur le comportement des calpaïnes. L'extrait de calpaïnes de bar a été placé dans un spectro-fluorimètre dans lequel se trouve une cellule haute pression. Grâce à cet appareillage, l'activité des calpaïnes peut être suivie sous pression. La figure 41 ci-dessous présente l'activité à différentes pressions.

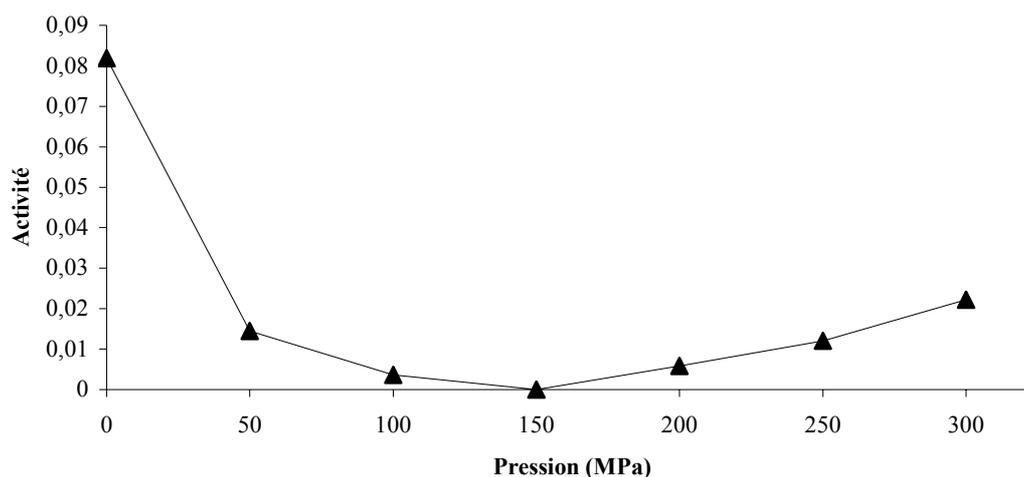


Figure 41 : Activité des calpaïnes de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) sous pression exprimée en FU.min⁻¹.

Dans la première partie de la courbe, pour les pressions comprises entre 0 et 150 MPa, l'activité des calpaïnes diminue. Dans la seconde partie de la courbe, on note une augmentation de la fluorescence.

La baisse effective de l'activité est liée à une modification de la structure de la calpaïne. Cette expérience confirme que les hautes pressions sont responsables de ces modifications. On peut suggérer que les hautes pressions entraînent une dissociation de la forme hétérodimérique et ensuite une modification de la structure tertiaire à partir d'un certain niveau de pression. Les modifications de la structure tertiaire restent en place, tant que la molécule est sous pression ; ce qui occasionne une diminution de l'activité. A 150 MPa, l'ensemble des calpaïnes a une structure tertiaire modifiée, ce qui explique l'absence d'activité. Par contre, on peut penser que ce phénomène est réversible, car les résultats précédents montraient que les calpaïnes étaient actives à 150 MPa.

Après un retour à une pression atmosphérique, à partir d'une pression de 200 MPa, une légère turbidité du mélange réactionnel a été observée lors de travaux réalisés par ailleurs. Cette turbidité peut être provoquée par une agrégation des molécules présentes dans le mélange réactionnel. Cette observation peut permettre de donner une possible explication à l'augmentation de la fluorescence pour des pressions supérieures à 150 MPa. Car on sait par ailleurs que la dissociation des calpaïnes est irréversible (Bessière *et al.*, 1999a) et que le

traitement par hautes pressions au-dessus de 150 MPa entraîne une agrégation, qui dépend souvent de la concentration en protéines. Les molécules agrégées provoquent une diffusion de la lumière, et donc une augmentation de la fluorescence. Cette augmentation de la fluorescence ne serait donc pas due à une augmentation de l'activité enzymatique.

3.2.3. Modification structurale des calpaïnes de muscle de bar après un traitement par hautes pressions

Les protéines sarcoplasmiques de muscle blanc de bar ont été séparées par électrophorèse en condition native sur un gel contenant de la caséine. La caséine est connue comme étant un excellent substrat *in vitro* des calpaïnes. Grâce cette technique du zymogramme, l'activité des calpaïnes peut être révélée par la dégradation de la caséine dans la zone où les protéases ont migré. La révélation de l'activité protéolytique de ces enzymes se caractérise par une zone blanche, la caséine non hydrolysée étant colorée par le bleu de Coomassie. Le zymogramme de la figure 42 présente l'effet des hautes pressions sur les calpaïnes de muscle blanc de bar.

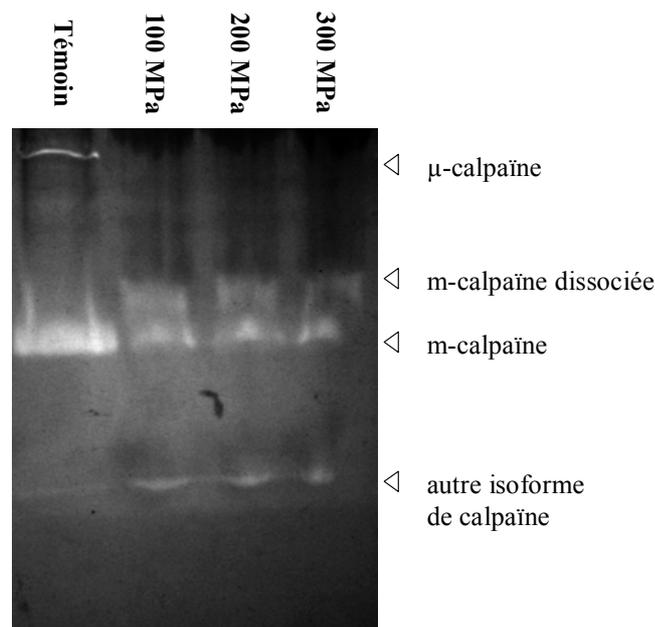


Figure 42 : Zymogramme de caséine des protéines sarcoplasmiques de muscle blanc de bar. Les flèches indiquent les différentes isoformes de calpaïnes (hypothétiques).

Sur cette figure, différentes bandes sont indiquées. Ces bandes correspondent à différentes isoformes actives. Ladrat *et al.* (2000) ont montré que le muscle blanc de bar pouvait contenir trois isoformes : la m-, la μ - et la m/ μ -calpaïne selon la saison. Ces trois isoformes sont présentes dans l'échantillon témoin mais pour les échantillons pressurisés, une bande disparaît et une autre apparaît. Dans ces conditions électrophorétiques natives, la migration se fait en fonction de la charge et du poids moléculaire des protéines. Les différentes isoformes de

calpaïnes ont des poids moléculaires quasi identiques. La seule variable est donc la charge des protéases. Dans les travaux de Ladrat *et al.* (2000), l'éluion des différentes isoformes de calpaïnes sur une colonne échangeuse d'anions, selon un gradient croissant de NaCl, se fait dans le sens suivant: la μ - sort en premier, ensuite la m- suit et enfin la m- majoritaire est éluée. Ces résultats, recoupés avec les travaux de Raser *et al.* (1995), où il est précisé que la m-calpaïne a une plus forte mobilité électrophorétique que la μ -calpaïne, permettent d'identifier les différentes isoformes hypothétiques de calpaïnes sur le zymogramme. Les échantillons, qui ont été pressurisés, ne présentent plus de bande correspondant à la μ -calpaïne. Par contre, la bande majoritaire, correspondant à la m-calpaïne, est affectée par le traitement. La nouvelle bande apparue pourrait correspondre à la grosse sous-unité encore active mais dissociée de la petite sous-unité par le traitement. La sous-unité catalytique, de 80 kDa de poids moléculaire, est beaucoup plus sensible à l'autolyse (et donc par la suite à une perte totale d'activité) que le dimère (Saido *et al.*, 1994). Les bandes, correspondant à la m-calpaïne sous ses deux formes, sont de moins en moins intenses avec l'élévation du traitement par hautes pressions. Ainsi, la m-calpaïne est de plus en plus fortement dissociée avec l'intensité du traitement et, à partir d'un certain niveau de pression, la structure de la protéase serait modifiée à un tel point, qu'elle perdrait aussi son activité même sous sa forme monomérique simple.

Les modifications de la structure de la calpaïne ont été étudiées par une autre approche électrophorétique, en condition native et en condition dénaturante. Les calpaïnes ont été purifiées par deux colonnes consécutives à savoir une colonne d'interactions hydrophobes suivie d'une colonne échangeuse d'anions. Les fractions actives révélées grâce au substrat fluorescent spécifique sont conservées, pressurisées et étudiées par électrophorèse.

Cette électrophorèse présente l'effet des hautes pressions sur la structure de la calpaïne (cf. figure 43). Elle est réalisée en condition native pour comprendre les différents effets de la pression sur la dissociation des deux sous-unités.



Figure 43 : Électrophorèse en condition native montrant l'effet du traitement par hautes pressions sur la structure de la calpaïne de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.).

Les résultats présentés montrent une bande pour l'échantillon témoin pouvant correspondre à la forme dimérique de la protéase. Il demeure une autre petite bande en dessous

qui peut correspondre à la grosse sous-unité dissociée. La petite sous unité ne serait pas visible car en trop faible quantité. Dès 100 MPa, la bande la plus haute disparaît pour laisser place à deux autres bandes en dessous correspondant probablement à la grosse sous-unité et à la petite sous-unité. Cette observation montre que les hautes pressions dissocient la quasi totalité des formes dimériques dès 100 MPa.

Pour confirmer les bandes visualisées sur le profil électrophorétique en condition native, la même étude est réalisée, cette fois-ci en condition dénaturante. Les résultats montrent, sur la figure 44, que pour les échantillons pressurisés ou non pressurisés (non présenté) deux bandes majoritaires sont majoritaires : la grosse sous-unité vers 80 kDa et quelques bandes de ce monomère autolysé et une bande vers 25 kDa correspondant sûrement à la petite sous-unité autolysée (elle est peu visible après que le gel a été scanné).

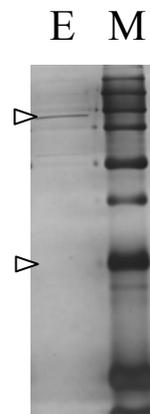


Figure 44 : Électrophorèse en condition dénaturante montrant l'effet du traitement par hautes pressions sur la structure de la calpaïne de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.). M : Marqueur (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15, 10 kDa) ; E : Extrait de calpaïnes pressurisées.

Si l'on compare ce profil électrophorétique et l'activité des calpaïnes en fonction de la pression, on peut dire que les hautes pressions conduisent à une dissociation des deux sous-unités. Cette dissociation ne conduit pas à une perte significative de l'activité, car pour le traitement à 100 MPa, la dissociation est apparemment totale alors que l'activité ne chute pas. Par contre, des intensités de pression importantes entraînent une perte de l'activité des calpaïnes. Ceci est dû probablement à une modification de la structure secondaire et tertiaire de la protéine empêchant une bonne affinité entre le substrat et le site actif de la protéase.

3.2.4. Effet du traitement par hautes pressions sur l'hydrophobie de surface des protéines sarcoplasmiques

Les résultats ci-dessus montrent que l'activité des calpaïnes diminue pour des pressions plus faibles lorsque le muscle de bar est pressurisé par comparaison avec l'extrait

sarcoplasmique pressurisé. Cette observation suggère que soit l'activité calpaïque diminue avec la pression, soit le traitement par hautes pressions affecte la fixation des calpaïnes sur la colonne par une modification de la structure de la protéase, ce qui entraînerait une fixation moindre, et donc une activité plus réduite. Or, la séparation des calpaïnes de leur inhibiteur se fait selon leurs propriétés hydrophobes et un des effets du traitement par hautes pressions des protéines est une possible modification des propriétés d'hydrophobie de surface.

Il est donc intéressant de connaître l'évolution de l'hydrophobie de surface des protéines contenues dans cet extrait sarcoplasmique après un traitement par hautes pressions, qui est présentée figure 45.

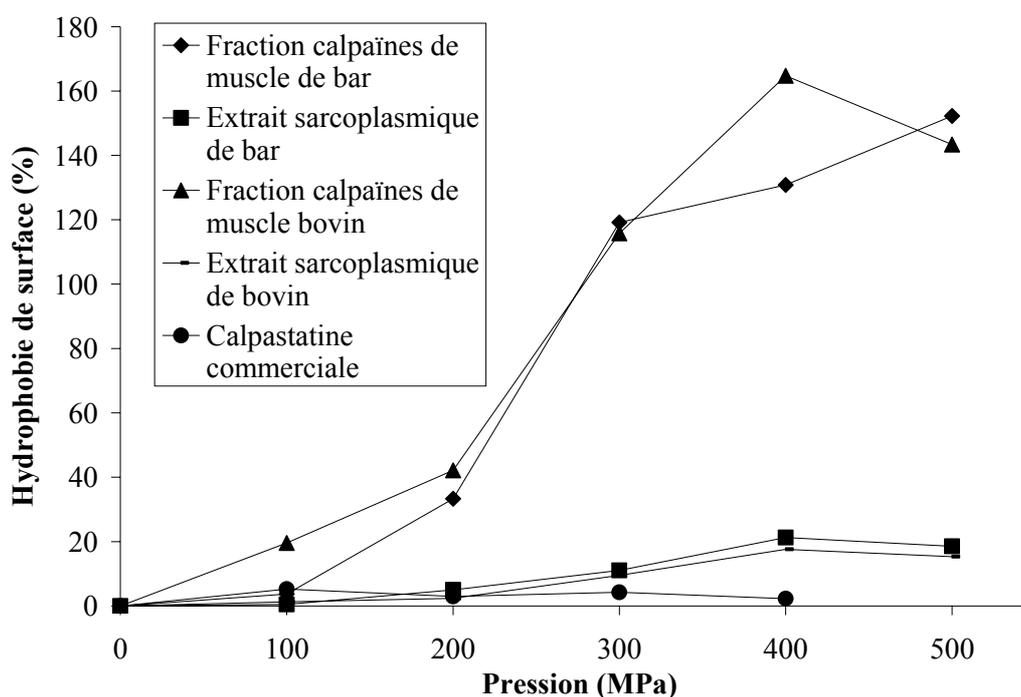


Figure 45 : Effet de la pression sur l'hydrophobie de surface des protéines présentes dans les extraits sarcoplasmiques, dans les fractions calpaïnes de muscles de bar et de bovin et de la calpastatine commerciale. L'hydrophobie de surface des protéines a été déterminée par un dosage à l'ANS.

L'analyse de l'hydrophobie de surface des fractions calpaïnes de muscle de bovin et de bar montre que le traitement par hautes pressions entraîne une augmentation importante de l'hydrophobie. Ce résultat permet de confirmer que la diminution de l'activité des calpaïnes, dans le cas où le muscle est pressurisé, est due à une inactivation des calpaïnes par les hautes pressions et non à une diminution de l'affinité entre les calpaïnes et le gel de chromatographie.

Pour confirmer ce résultat, il est intéressant de vérifier que l'hydrophobie de surface de la calpastatine et des protéines contenues dans l'extrait sarcoplasmique n'évolue pas. On peut supposer que si l'hydrophobie de surface de la calpaïne augmente, alors la même chose peut être observée pour la calpastatine. Il en découlerait que cette augmentation d'hydrophobie de la

calpastatine favoriserait son accrochage sur la colonne au même titre que la calpaïne. Dans ce cas, la calpastatine serait présente dans l'éluat avec les calpaïnes et perturberait l'activité calpaïque. Nos résultats permettent d'exclure toutes ces suppositions, car les mesures d'hydrophobie réalisées sur la calpastatine montrent des valeurs stables et pour l'extrait sarcoplasmique une faible évolution.

En définitive, les différences d'activité présentées dans le muscle bar seraient probablement dues à des sensibilités différentes aux hautes pressions des calpaïnes selon qu'elles sont dans la matrice musculaire ou extraites.

3.3. Effet de la pression sur les enzymes lysosomales

Au même titre que les calpaïnes, les enzymes lysosomales sont citées comme impliquées dans la protéolyse des protéines myofibrillaires du muscle au cours de la période *post-mortem*. L'étude porte sur les cathepsines B, D, H et, L et la phosphatase acide présentes dans deux types de muscles, le muscle blanc de bar et le muscle de bovin. Deux modalités ont été étudiées : les protéases sont extraites puis pressurisées ou le muscle est pressurisé et les protéases sont extraites ensuite.

Ces enzymes ont comme caractéristique d'être emprisonnées dans des vésicules, les lysosomes. Leur activité protéolytique ne peut donc s'exercer que si elles sont libérées de ces vésicules. Cette libération passe par une rupture de la membrane de ces organites. Un mécanisme peut provoquer cette rupture : une acidification due à une défaillance des pompes responsables des transferts ioniques suite à une déplétion en ATP lors de la période de *rigor* (Hopkins (2001) cité par Sentandreu *et al.*, 2002).

Lors de l'extraction des protéines sarcoplasmiques, le muscle est broyé permettant de casser les lysosomes. Bien entendu, la totalité des lysosomes n'est pas détruite et de ce fait l'extrait sarcoplasmique ne présente pas la totalité des protéases lysosomales. Par contre, dans la préparation de cet extrait, une centrifugation est réalisée. Cette centrifugation permet, en outre, de culotter les lysosomes non dégradés. De ce fait, dans l'extrait sarcoplasmique, aucun lysosome n'est présent.

3.3.1. La phosphatase acide

La phosphatase acide est intégrée à l'étude, en tant que marqueur de rupture de la membrane des lysosomes (Oshumi *et al.*, 1983). Les variations de son activité peuvent permettre de prédire l'état des lysosomes. La figure 46 montre l'activité de cette enzyme dans le muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) et dans le muscle de bovin (*Biceps femoris*), selon que le muscle ou l'extrait sarcoplasmique ont été pressurisé.

Dans le cas du poisson, l'activité de cette phosphatase acide diminue à partir de 100 MPa, lorsque l'extrait est pressurisé. Cette donnée montre que cette enzyme est dénaturée par la pression, ce qui affecte l'activité. Par contre, l'activité augmente, lorsque le muscle est pressurisé. Ces résultats confirment les données de la bibliographie (Jung *et al.*, 2000a; Ohmori

et al., 1992 ; Homma *et al.*, 1994) : lors de la pressurisation, les échantillons sont soumis à une contrainte physique telle, qu'elle provoque la rupture des membranes lysosomales. Cette dégradation membranaire permet une libération du contenu vésiculaire. Plus la pression exercée est importante, plus le nombre de lysosomes est dégradé et plus le nombre de protéases est libéré. L'augmentation de l'activité par la libération des lysosomes compense largement la perte d'activité due à la pression.

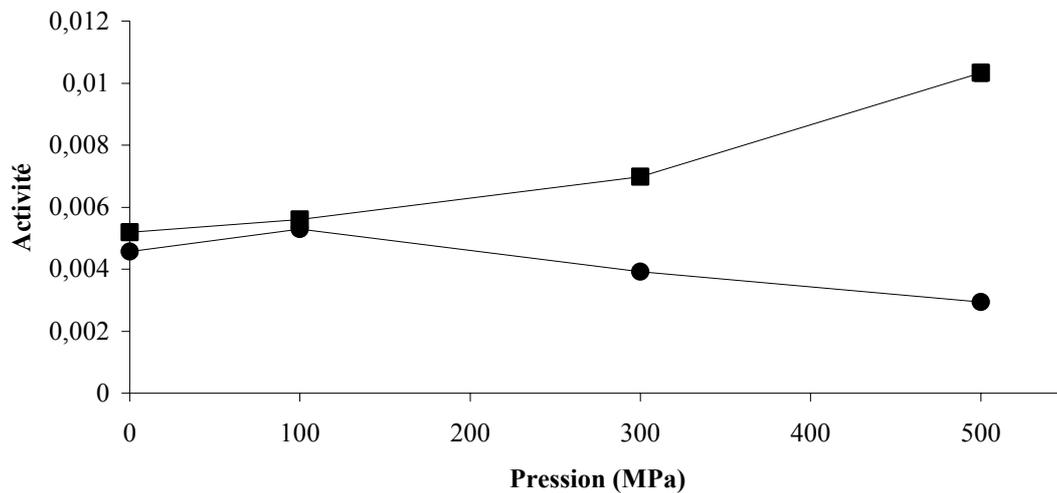


Figure 46 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la phosphatase acide de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) issue de muscle pressurisé (■) ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé (●). L'activité est exprimée en absorbance à 400 nm.min⁻¹.g⁻¹ de muscle. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

Tout comme dans le muscle de poisson, cette protéase a été étudiée dans la viande. La figure 47 illustre l'effet des hautes pressions sur l'activité de la phosphatase acide selon que les muscle ou l'extrait ait été pressurisé.

Les résultats obtenus indiquent que lorsque le muscle bovin est pressurisé, l'activité enzymatique de la phosphatase acide augmente jusqu'à 500 MPa alors que lorsque l'extrait est pressurisé l'activité diminue avec le niveau de pressurisation. Nous avons donc montré que les hautes pressions affectent l'activité de la phosphatase acide : le traitement permet dans un cas de libérer cette enzyme des vésicules lors du traitement du muscle mais aussi, lorsque l'extrait est pressurisé, de modifier leur structure perturbant l'activité comme dans le cas du muscle de bar.

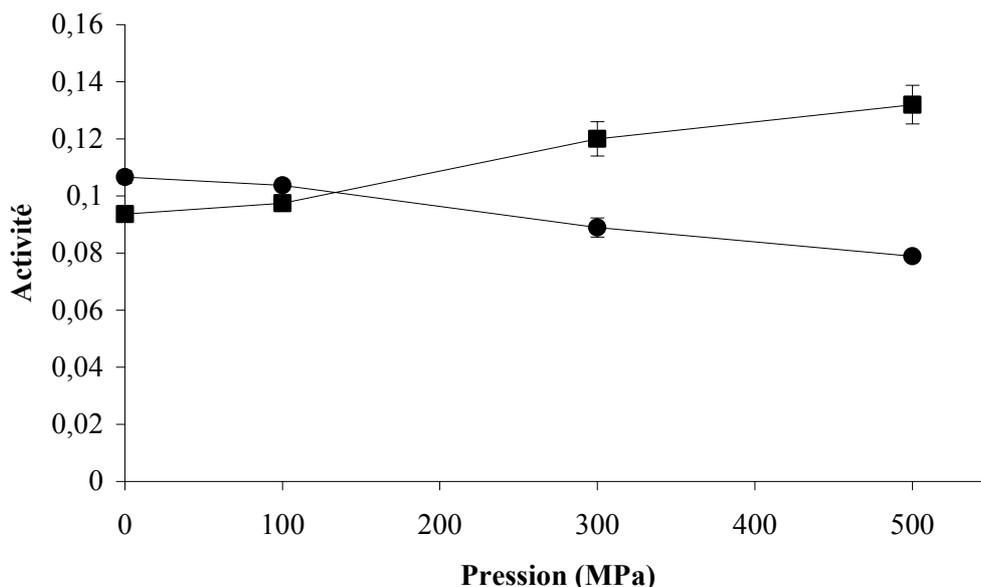


Figure 47 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la phosphatase acide de muscle de bovin (*Biceps femoris*) issue de muscle pressurisé (■) ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé (●). L'activité est exprimée en absorbance à 400 nm.min⁻¹.g⁻¹ de muscle. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

Pour confirmer ce dernier résultat, l'activité d'une phosphatase acide commerciale après un traitement hautes pressions a été suivie (cf. figure 48). L'activité de cette phosphatase acide est quasi stable jusqu'à 300 MPa, mais à 500 MPa l'activité diminue. Ce résultat confirme que les phosphatases acides sont sensibles, elles aussi, à la pressurisation.

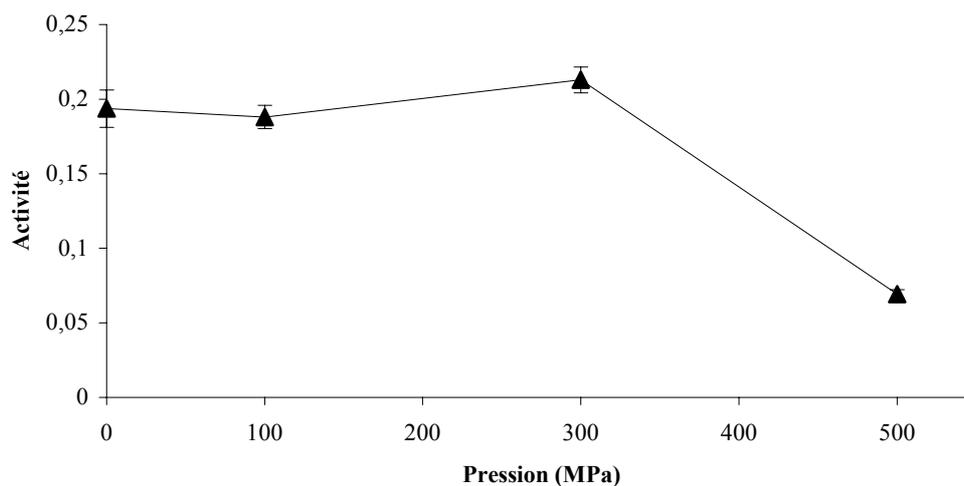


Figure 48 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la phosphatase acide commerciale. L'activité est exprimée en absorbance à 400 nm.min⁻¹.g⁻¹ de protéines. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

3.3.2. La cathepsine D

La cathepsine D apparaît dans la liste des protéases de dégradation du muscle en général. Son activité, suite à des traitements hautes pressions a été suivie pour les deux types de muscles étudiés. Les figures 49 présentent le résultat de cette étude selon que l'extrait sarcoplasmique ou que le muscle de bar a été soumis au traitement de pressurisation.

Concernant l'activité de la cathepsine D du muscle de poisson, les résultats présentés montrent une évolution positive de l'activité de cette protéase jusqu'à une pression de 300 MPa et ensuite à 500 MPa, une diminution jusqu'à une valeur équivalente aux échantillons non pressurisés. Cette activité augmente plus lentement lorsque l'extrait est pressurisé et de plus, elle est nulle à 500 MPa. Dans le cas où l'extrait est pressurisé, les résultats représentent la capacité des hautes pressions à activer ou à inhiber l'activité de la cathepsine D. La cathepsine D est activée pour des pressions comprises entre 0 et 300 MPa. Ces modifications permettent sans doute d'améliorer l'affinité avec son substrat et donc de favoriser son activité. Par contre, une pression de 500 MPa est néfaste, car elle inhibe totalement son activité. Cette pression conduit à une modification structurale trop importante, qui entraîne une dégradation irréversible et donc une perte totale de son activité. Dans le cas où le muscle est pressurisé, les évolutions positives des activités présentent un cumul de deux effets, à savoir, une libération des protéases de leurs vésicules lysosomales et une activation enzymatique jusqu'à 300 MPa. Pour le traitement à 500 MPa, les protéases sont majoritairement libérées de leurs lysosomes mais elles sont aussi dénaturées de façon importante, ce qui peut expliquer la baisse importante de l'activité.

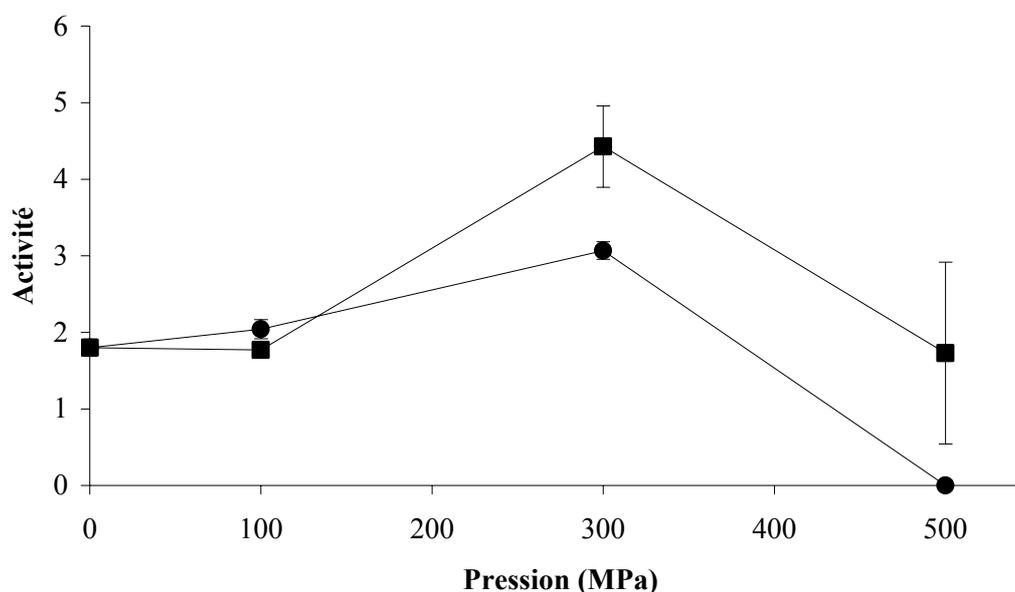


Figure 49 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la cathepsine D de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) issue de muscle pressurisé (■) ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé (●). L'activité est exprimée en absorbance à 295 nm.min⁻¹.g⁻¹ de

muscle. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

La même étude a été conduite pour la cathepsine D du muscle de bovin. Les résultats obtenus, présentés sur la figure 50, sont différents de ceux obtenus pour le muscle blanc de bar. L'activité de la cathepsine D issue de la pressurisation de l'extrait est stable jusqu'à 100 MPa et ensuite elle diminue. La cathepsine D de bar est beaucoup moins sensible aux hautes pressions que celle de bovin, de plus elle est même activée jusqu'à 300 MPa. Lorsque le muscle est pressurisé, on note une évolution similaire aux résultats obtenus pour la cathepsine D dans le muscle de bar. L'activité augmente, jusqu'à une pression de 300 MPa, suite à une altération des lysosomes, et ensuite, dans après 500 MPa, l'activité chute. Ce dernier résultat s'explique, comme dans le poisson, par une libération importante des cathepsines de leurs vésicules, qui est contrecarré par une dénaturation des protéases conduisant à une chute importante de l'activité protéolytique globale.

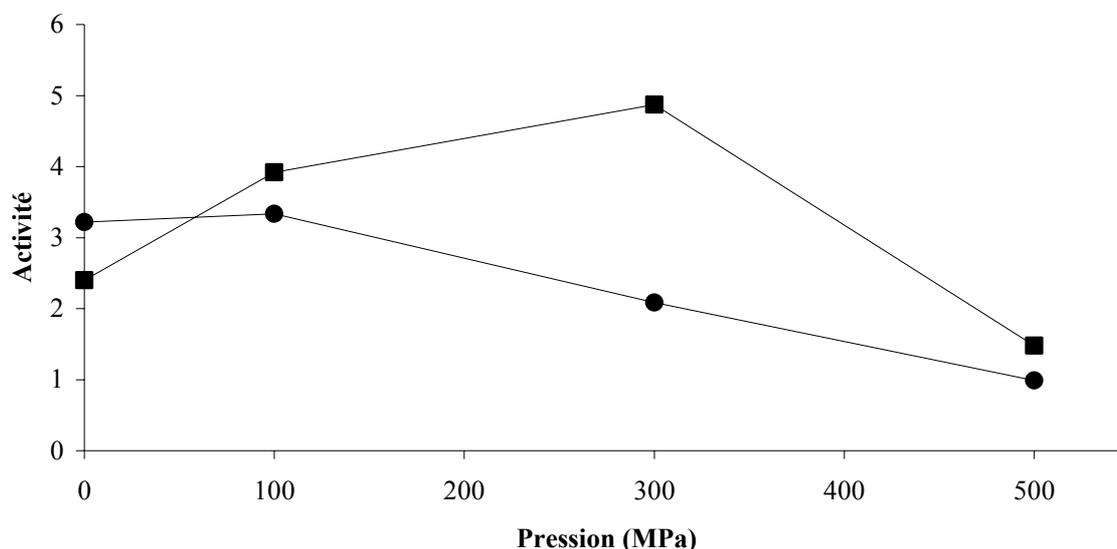


Figure 50 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité de la cathepsine D de muscle de bovin (*Biceps femoris*) issue de muscle pressurisé (■) ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé (●). L'activité est exprimée en absorbance à 295 nm.min⁻¹.g⁻¹ de muscle. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

3.3.3. Les cathepsines B, H et L

Cette classe d'enzymes est aussi impliquée dans la dégradation des protéines myofibrillaires. Mais par comparaison avec la cathepsine D, ce sont des cathepsines à cystéine alors que la cathepsine D appartient à la famille des cathepsines à acide aspartique. Elles présentent donc des structures différentes. Les figures 51 et 52, présentent l'activité de ces différentes protéases en fonction du traitement par hautes pressions dans les deux types de muscles.

Dans des résultats précédents, nous avons montré que certaines cathepsines, comme la cathepsine H, sont présentes en faible quantité ; par contre, les cathepsines B et L sont beaucoup mieux représentées.

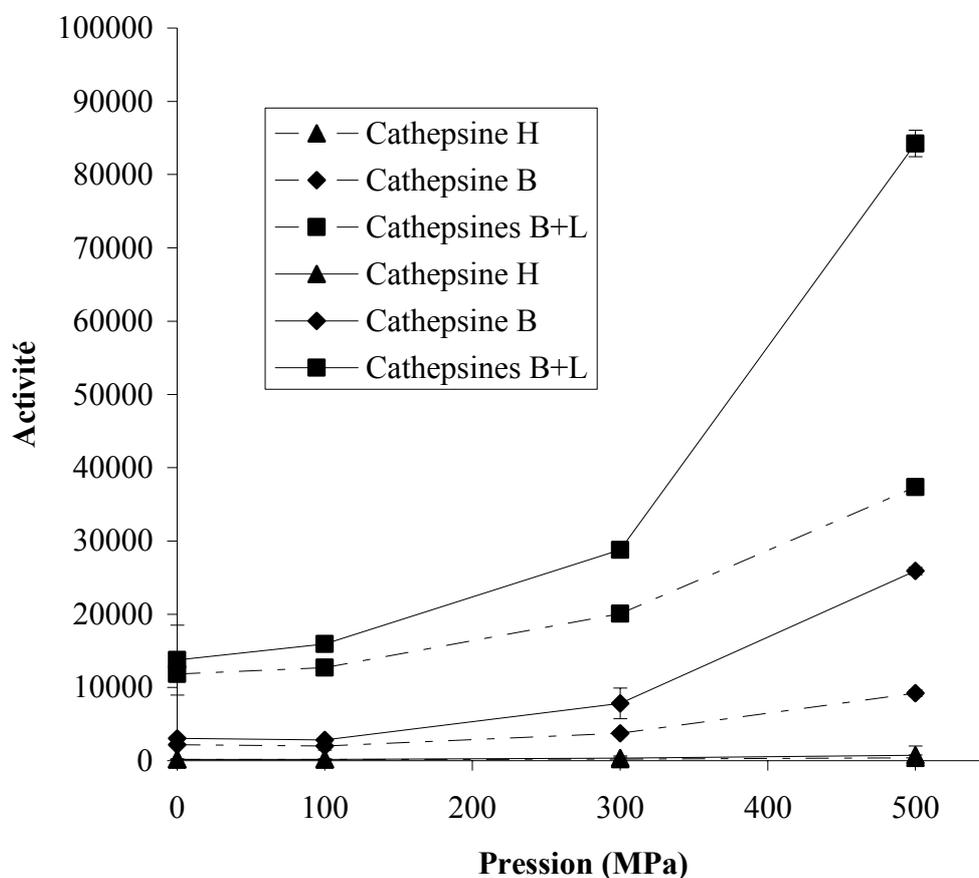


Figure 51 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité des cathepsines B, H et B+L de muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) issues de muscle pressurisé (—) ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé (.....). L'activité est exprimée en absorbance à 295 nm.min⁻¹.g⁻¹ de muscle. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

Dans l'étude des cathepsines à cystéine chez le bar, les résultats obtenus indiquent que l'augmentation des niveaux de pressurisation permet une évolution croissante des activités enzymatiques, que le muscle ou l'extrait soit pressurisé. Pour les échantillons de muscles pressurisés, les activités sont plus importantes par comparaison aux activités des extraits sarcoplasmiques pressurisés. Ces données soulignent à nouveau que les hautes pressions permettent d'activer cette classe d'enzymes ainsi qu'une libération des protéases des lysosomes. Par contre, cette classe de protéases lysosomales, par comparaison à la cathepsine D ou à la phosphatase acide, semble avoir une réaction différente face au traitement par hautes pressions ; leur activité à 500 MPa est plus importante que celle à 300 MPa. Des traitements de forte intensité n'inhibent pas leurs activités.

Dans la viande, les résultats montrent, tout d'abord, que la cathepsine L est fortement représentée par rapport aux autres que sont les cathepsines B et H. Les activités issues de muscle pressurisé sont plus importantes que celle d'extraits pressurisés. Ces remarques sont valables pour les trois enzymes étudiées. Ces résultats s'expliquent une nouvelle fois par une libération des protéases de leurs vésicules lors du traitement de pressurisation. Mais contrairement au muscle de poisson, la pressurisation de l'extrait sarcoplasmique n'entraîne pas de modification de l'activité. Quels que soient les cathepsines et le niveau de pressurisation, leurs activités restent relativement stables.

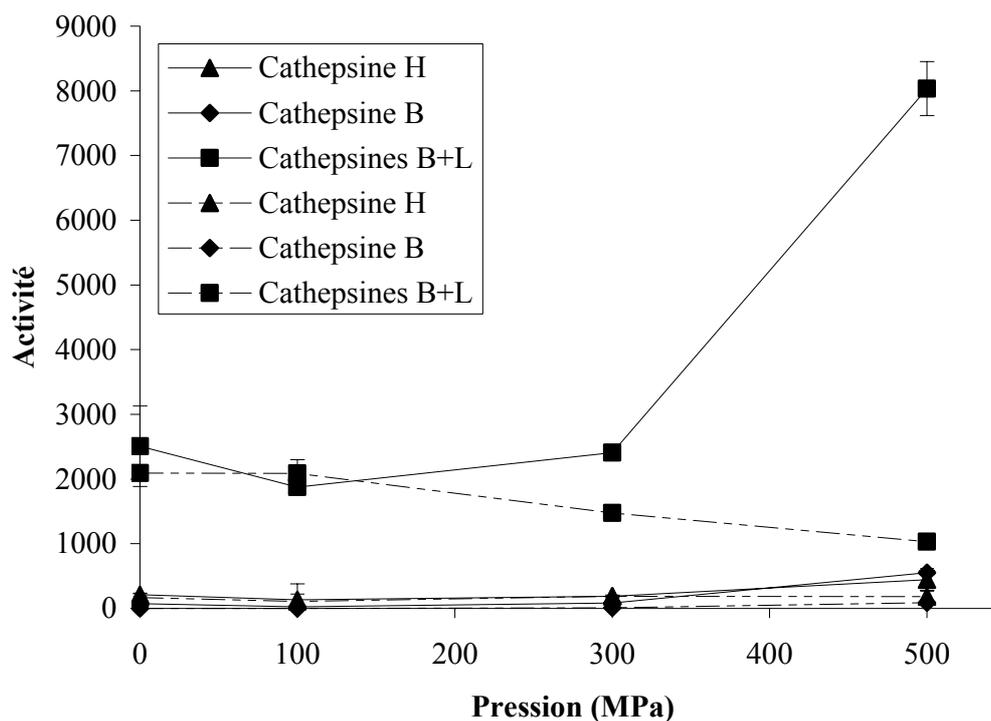


Figure 52 : Effet du traitement hautes pressions sur l'activité des cathepsines B, H et L de muscle de bovin (*Biceps femoris*) issue de muscle pressurisé (—) ou d'extrait sarcoplasmique pressurisé (.....). L'activité est exprimée en absorbance à 295 nm.min⁻¹.g⁻¹ de muscle. Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type.

En conclusion, les effets des hautes pressions sont fortement liés à la pression atteinte ainsi qu'à la localisation (*in vivo* ou *in vitro*) et la nature de l'enzyme.

Au cours de ces études, il est possible de constater que selon les familles d'enzymes et/ou son poids moléculaire, les conséquences sont différentes. La structure de la protéase joue un rôle majeur. Une structure de haut poids moléculaire ou complexe sera sûrement plus affectée par le traitement. Car les hautes pressions occasionnent des réarrangements structuraux comme des modifications des structures tertiaires et quaternaires, principalement. Ces modifications seront aussi à même de perturber le site actif et donc d'empêcher la protéolyse. Dans la bibliographie, il a été montré que de fortes pressions conduisaient à une inactivation des enzymes

(Gomes & Ledward, 1996 ; Goodner *et al.*, 1998). Par contre, de faibles pressions comprises entre 100 et 400 MPa, permettaient d'activer la catalyse enzymatique (Anese *et al.*, 1995 ; Cano *et al.*, 1998).

Les calpaïnes perdent leur activité lors de l'augmentation du niveau de pressurisation. La pression entraîne une dissociation des deux sous-unités, qui semble faire défaut pour une bonne activité protéolytique. Certains de nos résultats (électrophorèse en condition native) montrent une forte dissociation dès 100 MPa. Suite à la dissociation, la sous-unité reste encore active mais avec une activité peut-être moins importante. Après cette modification de la structure quaternaire, l'élévation de la pression conduit à une modification de la structure tertiaire entraînant une perte totale de l'activité. De plus, il semble que les niveaux de sensibilités sont différents selon l'origine des calpaïnes, à savoir de muscle de bovin ou de poisson.

Dans le cas des enzymes lysosomales, selon les groupes considérés, les perturbations des activités enzymatiques sont différentes.

La phosphatase acide, dans les deux types de muscle, adopte le même type de comportement face aux traitements par hautes pressions. L'activité augmente, quand le muscle est pressurisé en réponse à une libération massive d'enzymes et diminue, quand l'extrait est pressurisé, montrant la sensibilité de cette enzyme à un tel traitement. Cette enzyme est présente sous forme d'un monomère avec un poids moléculaire compris entre 100 et 15 kDa. Plus précisément, elle est sensible dès 100 MPa et au dessus, elle perd son activité. Ces résultats suggèrent une fragilité de sa structure.

La cathepsine D est, elle aussi, sensible aux hautes pressions. Comme pour la phosphatase acide, la cathepsine D voit son activité s'accroître après un traitement du muscle, car la rupture des membranes lysosomales permet une libération des protéases. Lorsque l'extrait est pressurisé, la cathepsine D de poisson est activée jusqu'à 300 MPa puis est inhibée totalement après une pression de 500 MPa. Pour la viande, la sensibilité est moindre ; l'activité est stable jusqu'à 100 MPa puis diminue à partir de 300 MPa. La cathepsine D est répertoriée comme étant une enzyme active sous formes monomérique et multimérique chez le poisson comme le tilapia, le hareng et chez les bovins. Les monomères ont des poids moléculaires compris entre 35 et 55 kDa selon les espèces. On peut supposer, d'après ces données, que la dissociation n'est pas forcément un facteur entraînant une perte d'activité totale ; de plus, de par son faible poids moléculaire, la dénaturation de la structure tertiaire n'est pas rencontrée pour des traitements à des faibles pressions et au contraire, elle peut être activée.

Concernant la famille des cathepsines à cystéine, l'activité évolue positivement lors du traitement du muscle comme pour les autres protéases lysosomales. Par contre, lorsque l'extrait est sollicité, les effets sont divergents. Pour le poisson, leurs activités sont favorisées et pour la viande, on observe une légère diminution. Ces protéases ont un poids moléculaire compris entre 23 et 40 kDa et sont présentes sous forme de monomère ou de dimère. Leur faible poids moléculaire peut supposer une possible activation pour le poisson.

Partie 4.

Effet de la pression et du
temps sur l'activité
enzymatique des protéases et
sur les protéines du muscle de
poisson

4. Effet de la pression et du temps sur l'activité enzymatique des protéases et sur les protéines du muscle de poisson

Le muscle de poisson est un produit fragile : au cours de sa conservation *post-mortem*, il subit une dégradation microbiologique associée à une dégradation protéolytique du muscle, qui conduisent à une perte significative de sa fermeté. Contrairement à la viande de bœuf ou de porc, il est important de conserver sa texture ferme. Il faut prendre aussi en compte que selon l'espèce de poisson considérée, la texture est différente.

Au cours de la conservation, à une température réfrigérée, les protéines myofibrillaires sont modifiées principalement à cause d'une dégradation liée à l'action de différentes protéases. Nous avons étudié l'évolution de l'activité de ces différentes protéases lors du stockage, et comparé un muscle soumis à un traitement par hautes pressions à un muscle non traité.

Le but de cette étude était d'étudier l'évolution de l'activité de certaines protéases ciblées ainsi que les modifications des protéines myofibrillaires au cours du temps (0, 2, 4 et 7 jours *post-mortem*) et pour différentes applications hautes pressions (0, 100 et 300 MPa).

4.1. Déroulement de l'expérimentation

Afin d'obtenir des échantillons homogènes, douze poissons sont utilisés. Les deux filets de chaque poisson sont partagés en douze portions. Les différents morceaux obtenus de muscle sont répartis en douze lots (environ 100 g au total) afin d'avoir des échantillons les plus homogènes possibles (cf. figure 53).

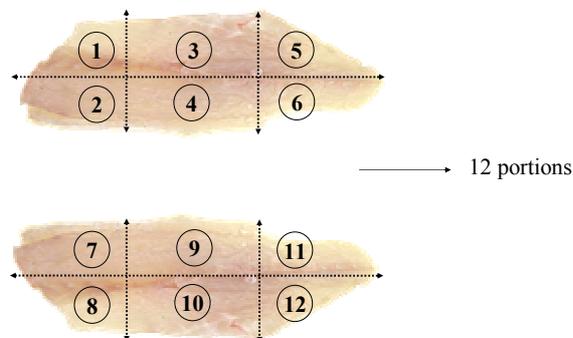


Figure 53 : Constitution des différents lots.

Ces douze lots sont soumis à des traitements par hautes pressions, puis stockés sur glace comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Lots	Pression	Temps de stockage (Jours)	Lots	Pression	Temps de stockage (Jours)
1	0 MPa	0	7	0 MPa	4
2	100 MPa	0	8	100 MPa	4
3	300 MPa	0	9	300 MPa	4
4	0 MPa	2	10	0 MPa	7
5	100 MPa	2	11	100 MPa	7
6	300 MPa	2	12	300 MPa	7

Tableau 15 : Répartition des traitements et des temps de stockage pour les différents lots.

Selon les temps de conservation *post-mortem*, les morceaux de muscle des différents lots sont broyés, partagés à nouveau dans des sacs sous vide (en portion de 30 g) et congelés à -80°C jusqu'à l'analyse (cf. figure 54).

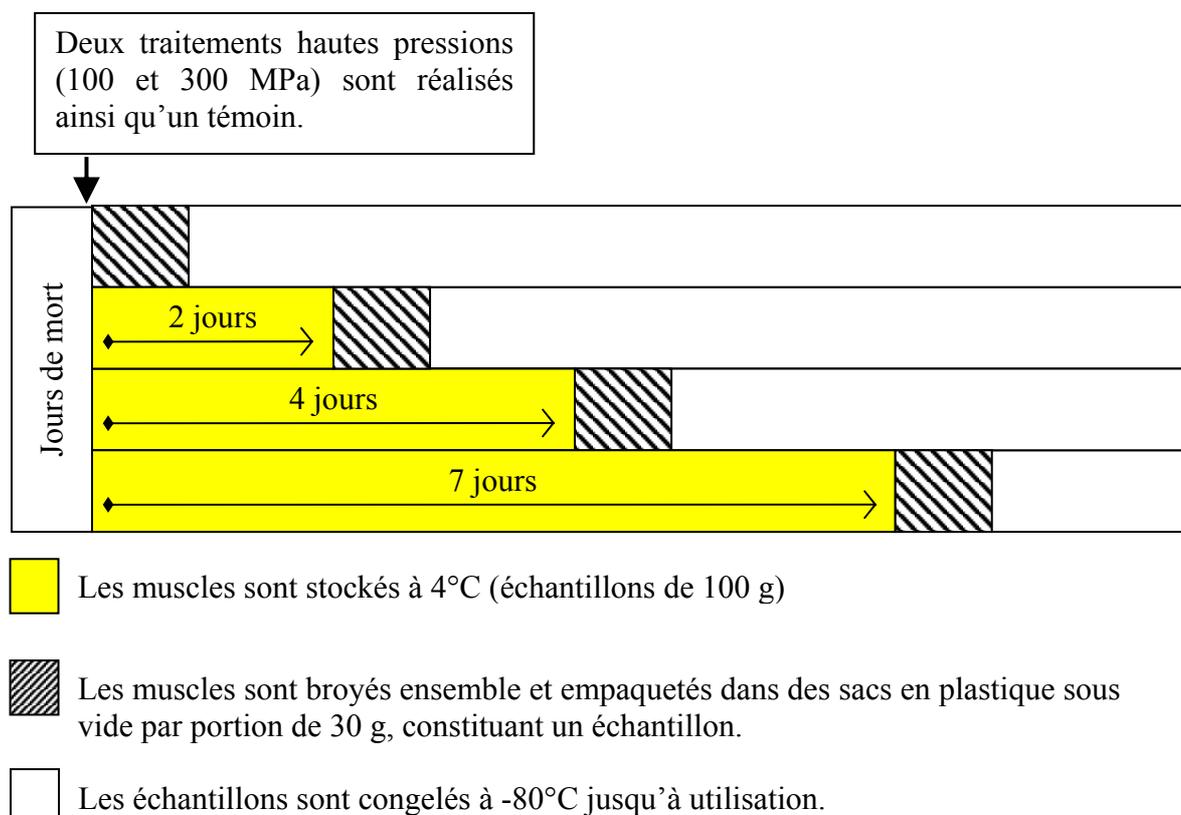


Figure 54 : Représentation schématique du déroulement de l'expérimentation.

4.2. Évolution de l'activité des calpaïnes et de la calpastatine au cours du temps de stockage et en fonction du traitement hautes pressions

4.2.1. Les calpaïnes

Chaque portion de 30 g est décongelée, puis les calpaïnes sont extraites et purifiées et leur activité mesurée (cf. figure 55).

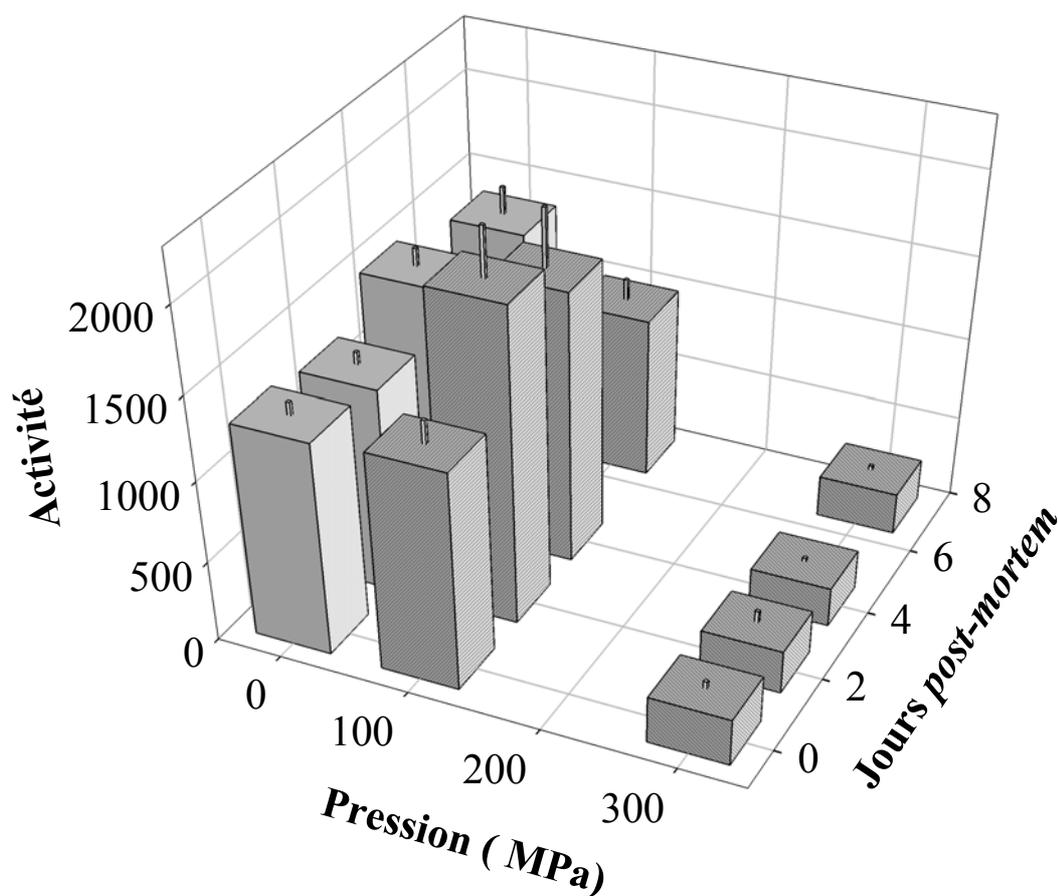


Figure 55 : Évolution de l'activité des calpaïnes après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage *post-mortem* à 4°C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa (□), 100 MPa (▨) et 300 MPa (▩). Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type. Les activités sont exprimées en $\text{FU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

A J0, l'activité totale des calpaïnes diminue avec la pression. Pour le traitement à 100 MPa, on constate une activité équivalente au témoin. Par contre, l'activité est très faible pour les calpaïnes extraites des muscles pressurisés à 300 MPa. Ce résultat est en accord avec ce qui a été montré auparavant.

Au cours du temps de stockage, des variations sont à noter, suite aux résultats de l'analyse de la variance. L'activité augmente légèrement au 4^{ème} jour *post-mortem* pour les échantillons non pressurisés et redescend ensuite à une valeur proche de sa valeur initiale. Pour les échantillons pressurisés à 100 MPa, l'activité des calpaïnes augmente plus précocement (au 2nd jour) puis diminue. Au 7^{ème} jour, pour ce même traitement, l'activité est plus faible que celle mesurée juste après la mort de l'animal et de plus, est plus faible que les échantillons non pressurisés après une même période de stockage. Ces résultats montrent que le traitement hautes pressions permet de rendre les calpaïnes plus actives dans un laps de temps écourté mais, en contrepartie, elle perdent leur activité de façon beaucoup plus importante. Ce qui pourrait être lié à une activation rapide et élevée et ensuite une autolyse beaucoup plus importante puisque l'on sait qu'une calpaïne autolysée est instable (Elce *et al*, 1997).

4.2.2. La calpastatine

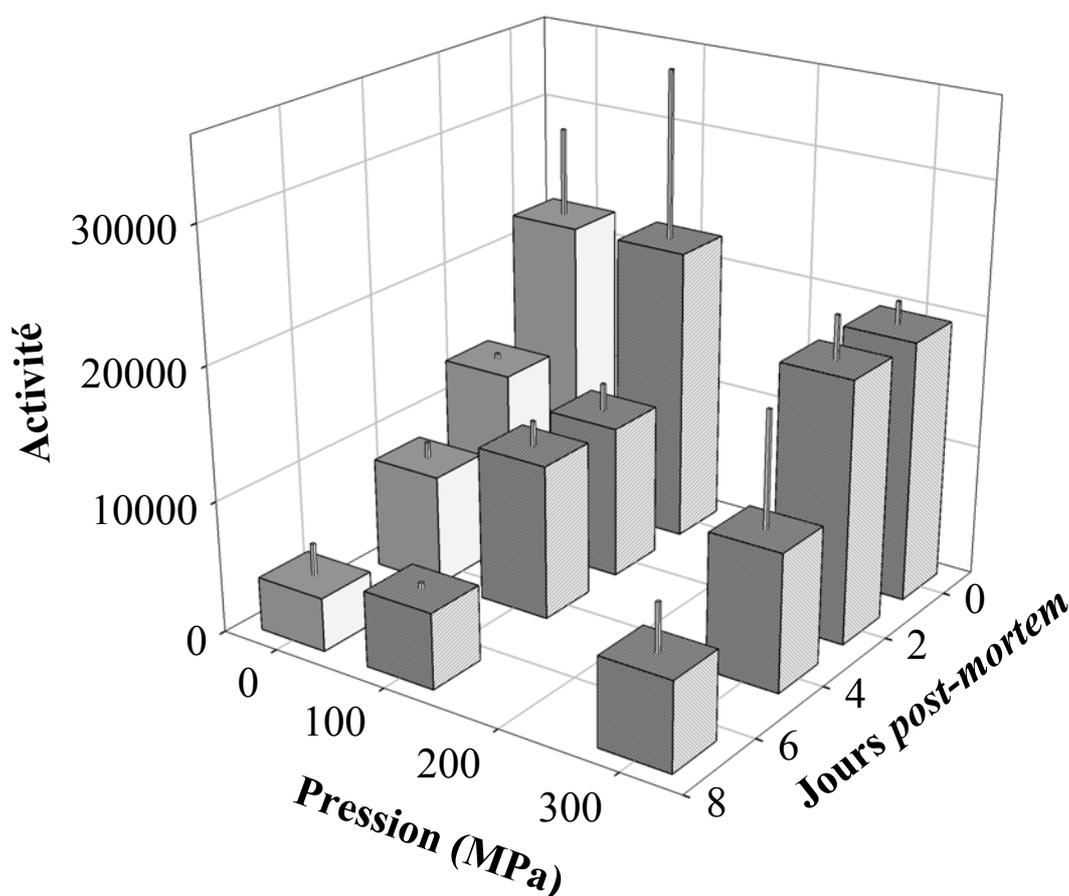


Figure 56 : Évolution de l'activité des calpastatines après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage *post-mortem* à 4°C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa (□), 100 MPa (▨) et 300 MPa (▩). Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale

correspond à l'écart-type. Les activités sont exprimées en $\text{FU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. L'axe des jours *post-mortem* est inversé par rapport à la figure précédente pour une meilleure lisibilité.

La figure 56 présente l'évolution de l'effet inhibiteur de la calpastatine sur des calpaïnes de bar (provenant de muscle à J0 et n'ayant subi aucun traitement hautes pressions) purifiées par chromatographie d'interactions hydrophobes et cela, au cours du temps et selon les différents traitements hautes pressions. Pour un temps donné, l'activité n'est pas perturbée par le traitement hautes pressions, par contre au cours du temps, elle perd significativement son activité inhibitrice.

La calpastatine est une protéine, qui prise indépendamment, est souvent caractérisée par une structure stable. Par exemple, des traitements drastiques comme un chauffage à 90-100°C, la présence d'urée, de SDS, d'acide trichloracétique ne modifient ni sa structure ni son activité (Goll & Thompson, 2003). Nos résultats montrent également sa stabilité à la pression. Par contre, sa baisse d'activité au cours du temps de stockage peut s'expliquer par une dégradation protéolytique. En effet, Mellgren *et al.* (1986) ont observé que les calpaïnes étaient capables d'hydrolyser leur propre inhibiteur spécifique. On remarque que pour les échantillons pressurisés à 300 MPa, l'activité de la calpastatine reste au cours du temps plus importante que celle de échantillons non pressurisés et pressurisés. Ce résultat est en accord avec les observations de Mellgren *et al.* (1996), car sachant que les calpaïnes sont moins actives après un traitement à 300 MPa, elles ont donc moins la capacité de dégrader les calpastatines expliquant une activité légèrement plus importante de cet inhibiteur à ce niveau de pression.

4.3. Évolution de l'activité des cathepsines après stockage et en fonction du traitement hautes pressions

4.3.1. La cathepsine D

Comme pour les calpaïnes, des variations significatives de l'activité de la cathepsine D selon les traitements par hautes pressions et selon leur période de stockage à 4°C sont observées (cf. figure 57). La pressurisation entraîne une augmentation de l'activité mesurée immédiatement. Cette élévation de l'activité peut s'expliquer par une altération de la membrane lysosomale due aux contraintes physiques engendrées par le traitement ; et cela résulte alors en une forte libération de cette famille d'enzymes comme précédemment montré dans les travaux de Ohmori *et al.* (1992) et Jung *et al.* (2000a).

Durant l'entreposage au froid, l'activité des cathepsines D augmente pour les échantillons non pressurisés : les cathepsines sont libérées au cours du temps, suite à une altération naturelle de la membrane lysosomale. La libération de protéase est souvent attribuée à une chute du pH (Duston, 1983). Cependant, le pH n'évolue pas de façon significative au sein du muscle du poisson pour les divers temps de stockage étudiés (données non montrées). Des travaux de Hopkins (2001) cités par Sentandreu *et al.* (2002), ont montré que les membranes pouvaient être altérées par un dysfonctionnement du système des pompes ioniques insérées dans les membranes

des lysosomes durant le développement du *rigor*, et ceci consécutivement à la privation d'ATP. Ce mécanisme pourrait expliquer l'augmentation de l'activité protéolytique lysosomale au cours du temps de stockage et sans traitement par hautes pressions.

Pour les échantillons pressurisés, l'activité augmente significativement au 2nd jour de stockage, puis diminue au dernier jour. Plus la pression appliquée est élevée, plus l'activité résiduelle relevée au 7^{ème} jour est faible, suite à l'analyse de la variance. Un fort traitement affecte la libération des protéases, ainsi l'activité est plus importante pour une pressurisation élevée. Mais en contrepartie, ce traitement a un effet néfaste : il entraînerait la dénaturation partielle de ces cathepsines libérées des lysosomes et donc plus sensibles (car moins protégées), rendant leur durée de vie plus courte.

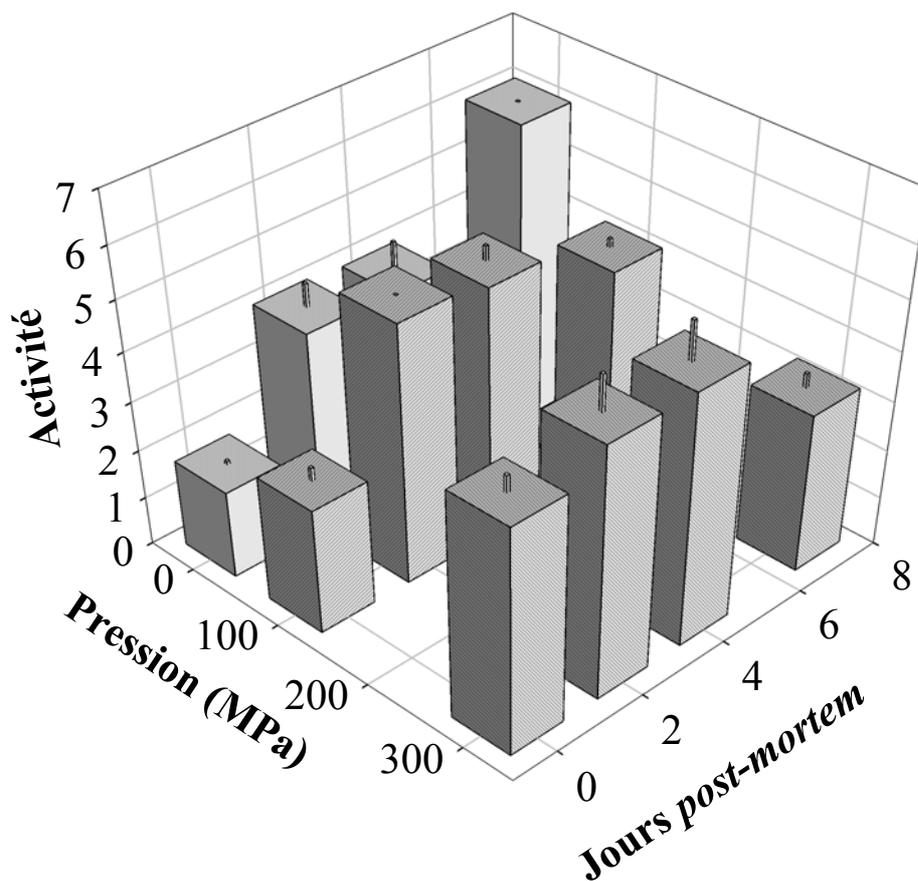


Figure 57 : Évolution de l'activité de la cathepsine D après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage *post-mortem* à 4 °C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa (□), 100 MPa (▨) et 300 MPa (■). Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type. Les activités sont exprimées en µg.ml⁻¹ de peptides libérés.min⁻¹.g⁻¹.

4.3.2. Les cathepsines B, H et L

Les autres protéases, appartenant à la famille des cathepsines à cystéine, sont aussi contenues dans ces mêmes vésicules lysosomales. Les variations d'activités constatées sont néanmoins différentes.

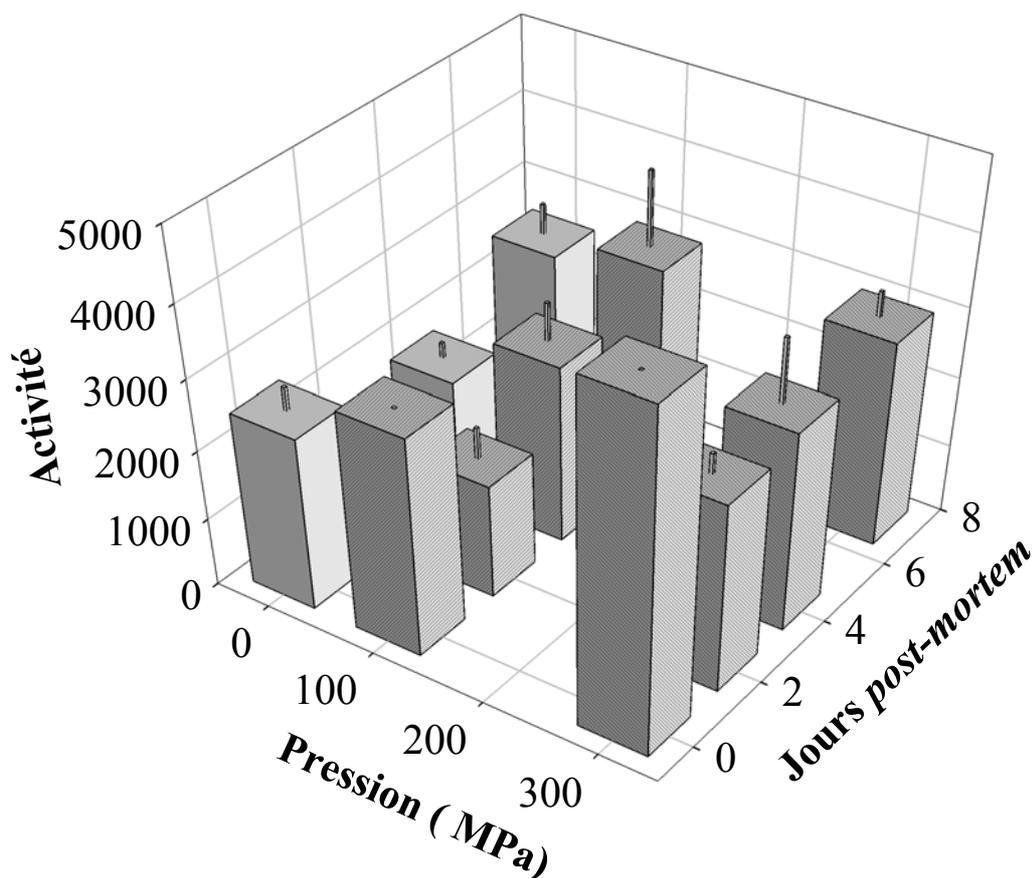


Figure 58 : Évolution de l'activité de la cathepsine B après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage *post-mortem* à 4 °C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa (□), 100 MPa (▨) et 300 MPa (■). Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type. Les activités sont exprimées en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de peptides libérés. $\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$.

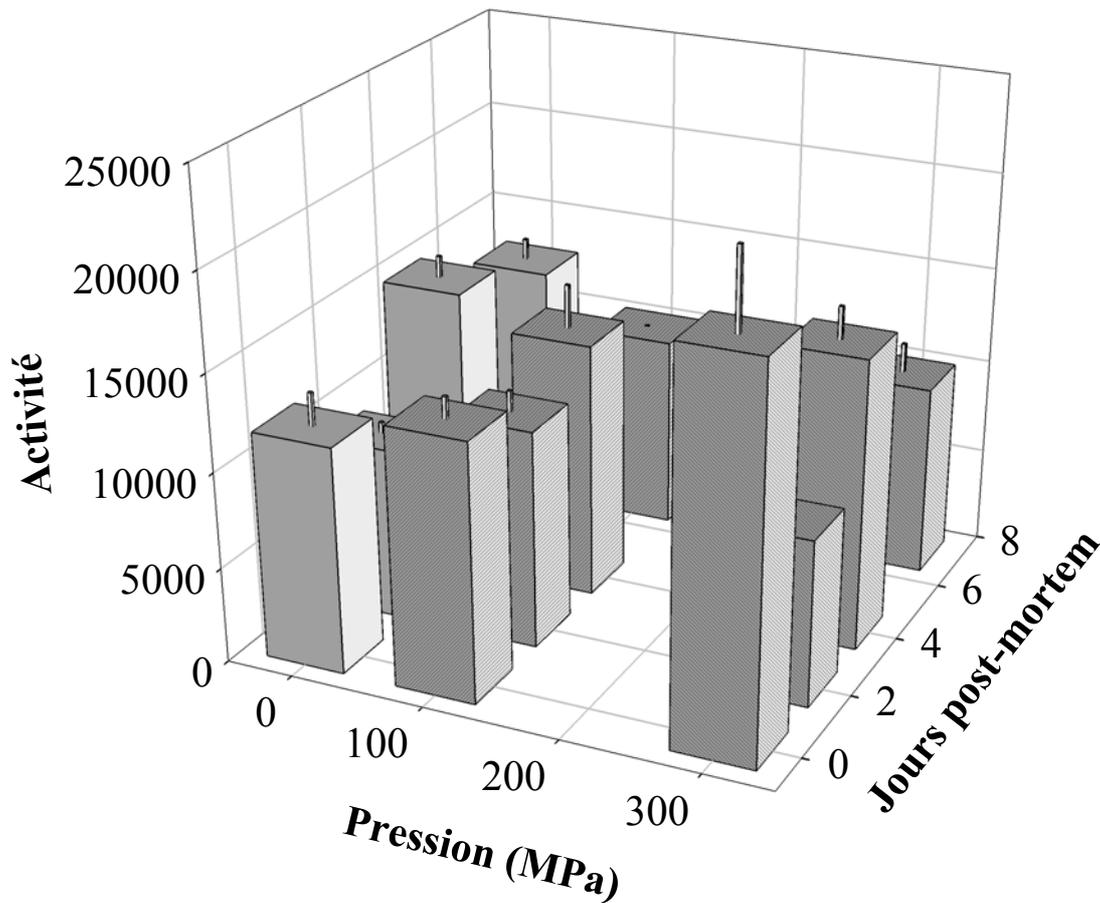


Figure 59 : Évolution de l'activité des cathepsines (B+L) après 0, 2, 4 et 7 jours de stockage *post-mortem* à 4 °C pour les différents échantillons pressurisés : 0 MPa (□), 100 MPa (▨) et 300 MPa (▩). Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons ; la ligne verticale correspond à l'écart-type. Les activités sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de peptides libérés. $\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Pour la cathepsine H, suite à l'analyse de la variance, les variations sont très faibles et peu significatives (résultats non présentés). Cette protéase, du fait de sa présence en faible quantité, n'est souvent pas considérée comme participant activement aux dégradations *post-mortem* des myofibrilles.

Pour les cathepsines (B+L), nous pouvons constater qu'une tendance à l'augmentation de l'activité se dessine avec l'élévation des niveaux de pression (cf. figure 59). Pour la cathepsine B seule (cf. figure 58), l'activité augmente aussi avec le degré de pression mais au cours du stockage, il n'y a pas de tendance significative sauf pour le traitement à 300 MPa, où l'activité diminue après 2 jours de stockage. Les hautes pressions ont pour effet de libérer mais aussi de dégrader de ces enzymes.

4.4. Analyse des dégradations des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires au cours du stockage à 4°C selon les différents traitements par hautes pressions

Les résultats précédents ont montré l'effet du traitement hautes pressions et du stockage *post-mortem* sur les protéases. Dans cette expérimentation, on s'intéresse à l'ensemble des protéines du muscle, qui peuvent constituer un substrat de ces protéases. L'effet du traitement par hautes pressions ainsi que le stockage *post-mortem* à température réfrigérée sur les protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires de muscle blanc de poisson (*Dicentrarchus labrax* L.) par électrophorèse dénaturante est présenté.

4.4.1. Les protéines sarcoplasmiques

Les protéines sarcoplasmiques sont principalement composées d'enzymes qui jouent un rôle dans le métabolisme de la cellule (Nakagawa *et al.*, 1988a). Dans l'extrait sarcoplasmique, 13 protéines ont été identifiées (Nakagawa *et al.*, 1988b). Les bandes en SDS-PAGE les plus abondantes sont les suivantes : 97 kDa, un doublet à 60 kDa, 51 kDa, une grosse bande à 39-41 kDa (qui est probablement un doublet correspondant à une créatine kinase et une aldolase), une bande à 36 kDa correspondant à une glyceraldéhyde-3-phosphatase déshydrogénase. De plus il y a des bandes à 34, 27, 25, 21,5 et 17 kDa. En fin, deux bandes sont identifiées à 13 et 12 kDa, pouvant être des parvalbumines (Focant *et al.*, 1999 ; Giriya & Rehbein, 1988).

Les protéines sarcoplasmiques ont été étudiées dans le but de voir l'évolution de leurs profils électrophorétiques au cours du temps de stockage et selon l'amplitude du traitement. Sur les deux profils électrophorétiques des figures 60 et 61, quel que soit le traitement par hautes pressions appliqué, aucune différence n'est remarquée. Par contre, au cours du temps, à partir de deux jours de conservation, des bandes apparaissent pour les échantillons non pressurisés : un doublet vers 20 kDa et une bande à 30 kDa environ. Ces protéines peuvent être considérées comme des potentiels marqueurs d'altération. Pour les échantillons pressurisés, ces bandes sont absentes. On peut supposer que la pressurisation va permettre de conserver les protéines sarcoplasmiques et aussi le muscle de poisson.

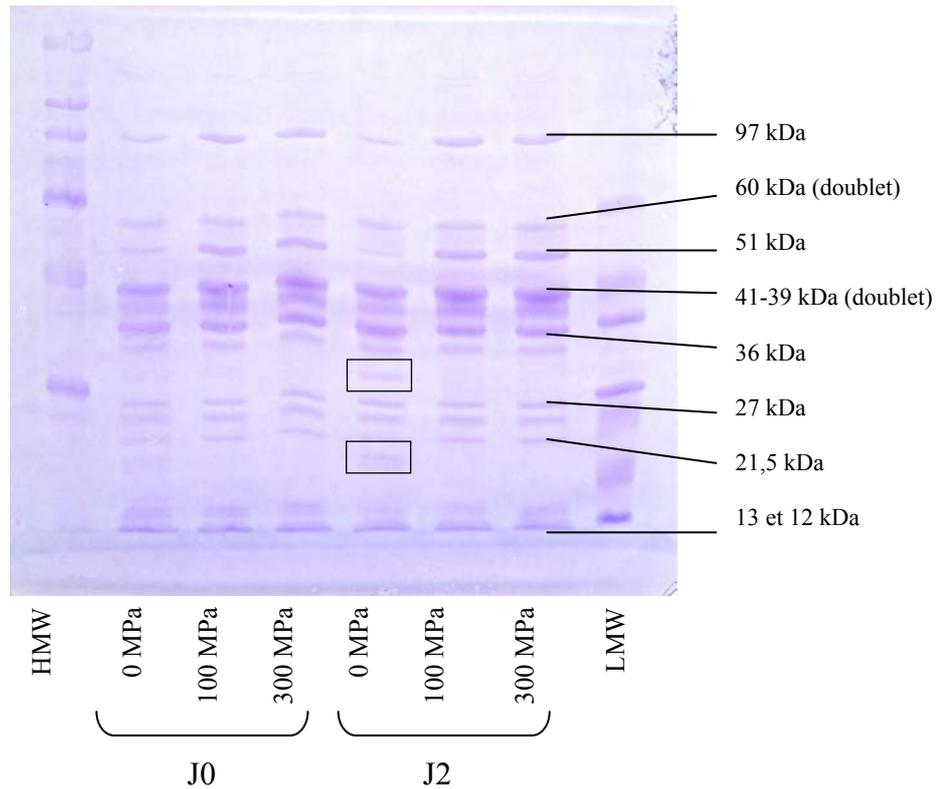


Figure 60 : Analyse électrophorétique des protéines sarcoplasmiques : 0 et 2 jours *post-mortem* (marqueur de hauts poids moléculaires : HMW ; marqueur de bas poids moléculaires : LMW).

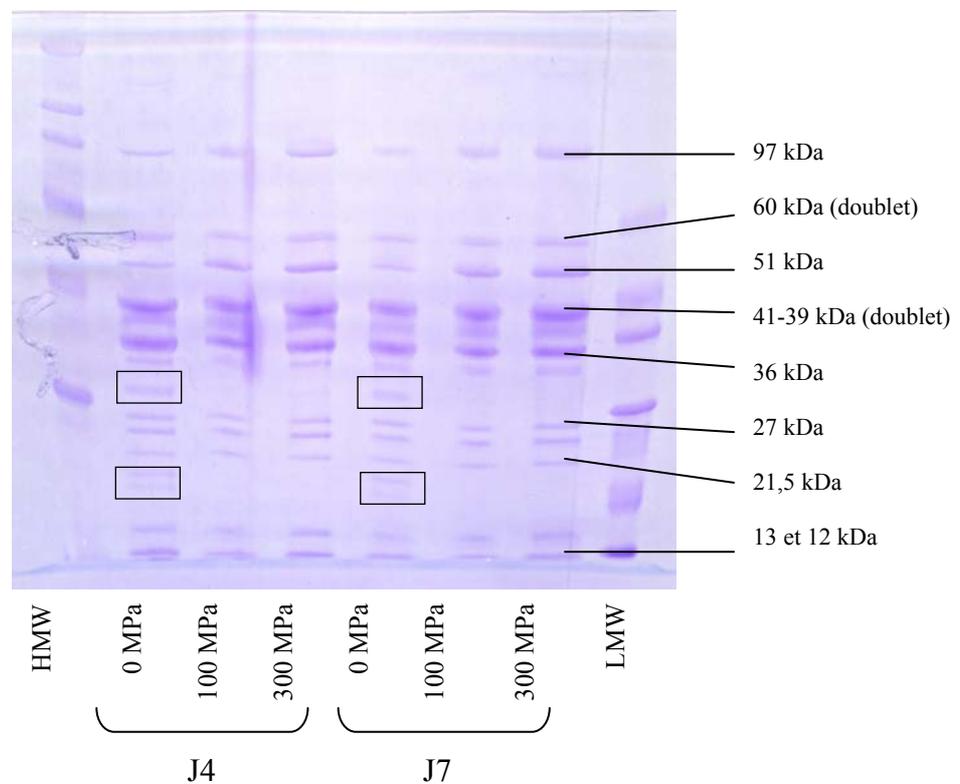


Figure 61 : Analyse électrophorétique des protéines sarcoplasmiques : 4 et 7 jours *post-mortem* (marqueur de hauts poids moléculaires : HMW ; marqueur de bas poids moléculaires : LMW).

4.4.2. Les protéines myofibrillaires

Pour les protéines myofibrillaires, 14 bandes ont été identifiées. Parmi ces protéines, on recense la chaîne lourde de la myosine, l' α -actinine, la desmine, la tropomyosine, l'actine, la troponine-T.

Les protéines myofibrillaires après un traitement par hautes pressions et au cours du temps de conservation ont été extraites et étudiées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Sur les profils électrophorétiques des figures 62 et 63, on constate des différences visibles en fonction du traitement hautes pressions. En fonction du temps de conservation, il n'y a pas de différences significatives. Verrez-Bagnis *et al.* (2001) ont également montré que la majorité des protéines myofibrillaires ne sont pas modifiées lors du stockage à 4°C. Seules pourraient être modifiées les protéines de haute masse comme la titine (600-900 kDa), la nébuline (2800 kDa) ou la dystrophine (400 kDa) non visibles sur nos gels. Pour les échantillons témoins et 100 MPa, les deux profils sont similaires. Par contre, suite au traitement à 300 MPa, on remarque des différences dès J0 : la chaîne lourde de la myosine, la troponine-T (37 kDa) et une bande voisine de 30 kDa sont moins intenses. Par ailleurs, on constate l'apparition de deux bandes : à 53 kDa et 40 kDa et la disparition d'une bande à 20 kDa environ. L'extractibilité des protéines myofibrillaires est modifiée par le traitement hautes pressions. Ces changements peuvent expliquer les différences observées sur les différents profils.

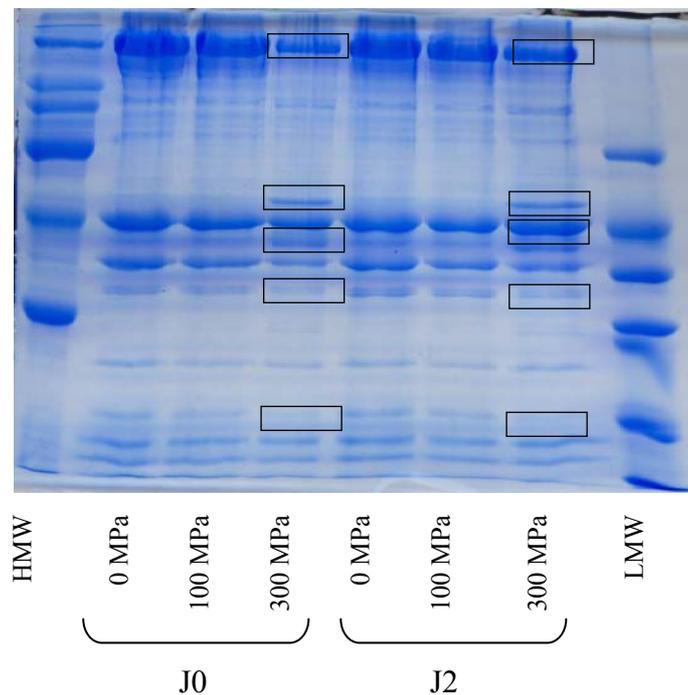


Figure 62 : Analyse électrophorétique des protéines myofibrillaires : 0 et 2 jours *post-mortem* (marqueur de hauts poids moléculaires : HMW ; marqueur de bas poids moléculaires : LMW).

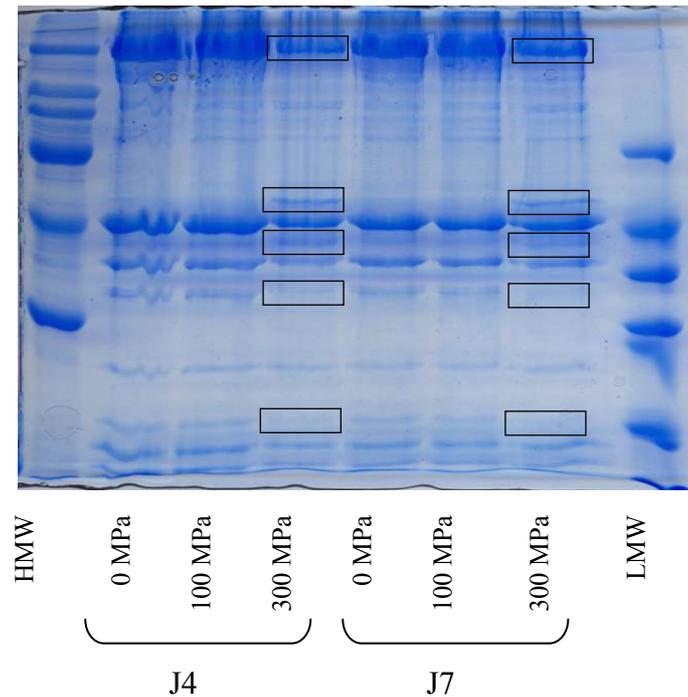


Figure 63 : Analyse électrophorétique des protéines myofibrillaires : 4 et 7 jours *post-mortem* (marqueurs de haut poids moléculaires : HMW ; marqueurs de bas poids moléculaires : LMW).

En conclusion, nos résultats montrent une augmentation des activités initiales des cathepsines suite à la pressurisation des échantillons ainsi qu'une inhibition des activités initiales des calpaïnes, tandis que la calpastatine initiale reste stable. Ceci pourrait suggérer que la pressurisation augmente la dégradation du muscle de poisson (par les cathepsines comme vu dans la partie 3). Les analyses électrophorétiques des protéines myofibrillaires montrent qu'aucun changement n'est visible au cours du temps de stockage pour les échantillons témoins ainsi que ceux pressurisés. Les conditions d'études ne permettent pas de visualiser les modifications. En conditions natives d'électrophorèses des différences seraient peut être visibles. De plus, l'étude de plus grosses protéines comme la titine, nébuline ou des protéines extracellulaires comme le collagène ou l'élastine serait à envisager.

Partie 5.

Effet de la pression et du temps sur la texture, la couleur et la micro-structure du muscle de poisson

5. Effet de la pression et du temps sur la texture, la couleur et la micro-structure du muscle de poisson

Le muscle de poisson est sensible à une dégradation *post-mortem*. La texture et l'apparence sont des paramètres qui sont amenés à changer rapidement.

Au cours de cette présente étude, ces changements ont été caractérisés et suivis en fonction du temps de conservation (0, 7 et 14 jours) et des niveaux de pressions du traitement (0, 100 et 300 MPa).

5.1. Effet de la pression et du stockage sur l'exsudation

L'exsudation se mesure par la présence de liquide à la surface du muscle. Les résultats présentés sur la figure 64 ci-dessous, montrent que le jour de la mort du poisson, quel que soit le traitement par hautes pressions appliqué, l'exsudation reste inchangée. Ensuite, au cours du stockage, deux groupes se dessinent : un premier incluant les échantillons témoins et ceux traités à 100 et 200 MPa et un deuxième incluant les échantillons traités à 300, 400 et 500 MPa.

Pour le premier groupe, une progression de l'exsudation peut être notée ; elle est multipliée par deux au 7^{ème} jour et par quatre au 14^{ème} jour.

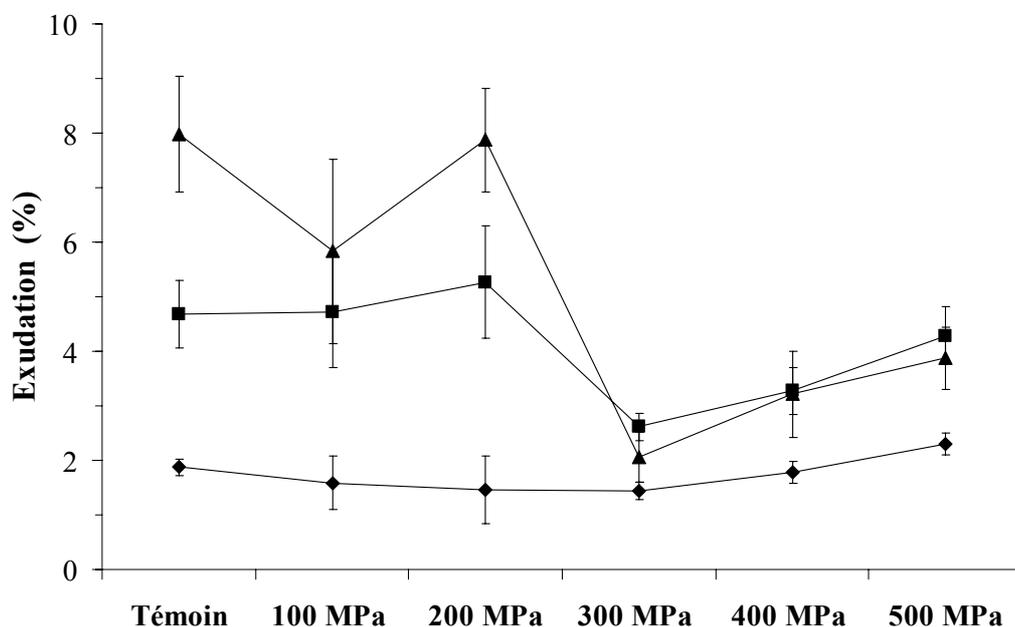


Figure 64 : Effet du stockage à 4°C pendant 0 (◆), 7 (■) et 14 (▲) jours *post-mortem* et du traitement hautes pressions sur l'exsudation de filets de bar.

Dans le second groupe, il y a une quasi absence de variation de l'exsudation durant l'évolution du stockage. Les changements d'exsudation, pour les échantillons témoin et traités à

100 et 200 MPa, peuvent s'interpréter par une dégradation microbiologique et enzymatique. L'action de ces mécanismes biochimiques affecte la structure des tissus de muscle conduisant à une perte considérable de liquide.

Les hautes pressions affectent la structure des protéines entraînant une dénaturation irréversible. En particulier, les protéines sarcoplasmiques et l'actine sont dénaturées à 300 MPa et la myosine est dénaturée aux alentours de 100-200 MPa dans le muscle de cabillaud (Anguspanish & Ledward, 1998). Ces modifications structurales conduisent à la formation de gel (Macfarlane & McKenzie, 1976). Cette matrice, ainsi formée, sera capable de favoriser la rétention de liquide et peut alors expliquer la faible exsudation. Pour les traitements supérieurs à 300 MPa, l'exsudation n'évolue pas au cours du stockage ; ceci montre que la structure gélifiée formée est stable au cours du temps.

5.2. Effet de la pression et du stockage sur la capacité de rétention en eau (Water Holding Capacity)

L'exsudation est la quantité de liquide qui est libérée de façon spontanée par le produit. Alors que, la capacité de rétention est déterminée en mesurant la quantité d'eau libérée sous contrainte, c'est-à-dire après un broyage du produit suivi d'une centrifugation.

Le but de ce travail est d'étudier l'effet des hautes pressions sur la capacité des protéines à retenir l'eau. Les résultats sont exposés dans la figure 65. Pour obtenir ces informations, les muscles sont préalablement broyés avant d'être centrifugés pour pouvoir déterminer le liquide libéré.

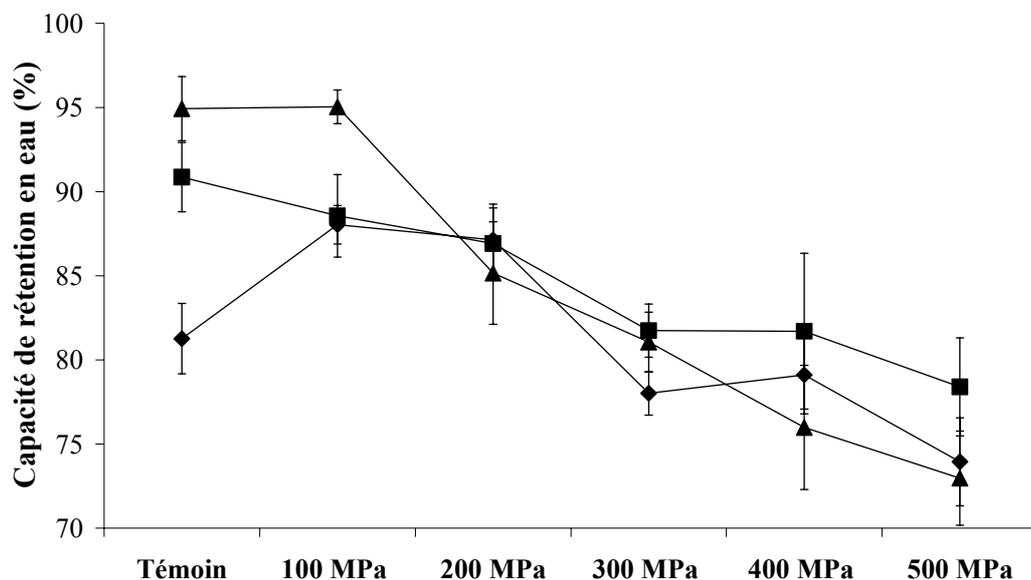


Figure 65 : Effet du stockage à 4°C pendant 0 (◆), 7 (■) et 14 (▲) jours *post-mortem* et du traitement hautes pressions sur la capacité de rétention en eau des filets de bar.

Tout d'abord, une augmentation significative au cours du stockage de la capacité de rétention d'eau pour l'échantillon témoin est visualisée sur la figure. Ce résultat est en opposition avec les résultats d'exsudation. Les résultats précédents ont montré que plus le temps de conservation est long pour les échantillons témoin et traités à 100 et 200 MPa, plus la quantité de liquide libérée par exsudation est importante. Il y a donc moins de liquide présent dans le produit au cours du temps.

La capacité de rétention en eau est liée à la capacité des protéines à conserver leurs liaisons avec l'eau, et donc leurs propriétés hydrophiles. Cette capacité de rétention en eau diminue lorsque la pression augmente. Pour les différents échantillons pressurisés, la durée du stockage n'a plus d'effet significatif à partir de 200 MPa.

Des travaux précédents réalisés par Bremner (2002) ont mis en évidence une diminution de la capacité de rétention en eau liée à une application croissante des hautes pressions pour la sole et le merlan. Le bar peut être classé dans la catégorie des poissons semi gras au même titre que les deux poissons précédents. Les protéines myofibrillaires sont les principales responsables de la capacité de rétention en eau. Le traitement par hautes pressions affecte les diverses structures de ces protéines ; de plus, cette dénaturation augmente avec la pression. Les modifications apportées par ce traitement font perdre aux protéines leur capacité à lier l'eau. Plus précisément, différents travaux réalisés sur l'effet des hautes pressions sur des protéines myofibrillaires ont montré que leur hydrophobie de surface était augmentée avec l'amplitude de la pression. Ikeuchi *et al.* (1992) ont montré que l'hydrophobie de surface de l'actine augmentait avec la pression et Chapleau et de Lamballerie-Anton (2003) ont montré ce même phénomène sur l'ensemble de protéines myofibrillaires du muscle bovin.

En conclusion, si les protéines myofibrillaires perdent leur pouvoir hydrophile avec le traitement par hautes pressions, après le broyage, le liquide conservé dans la matrice du muscle n'est plus retenu, et la capacité de rétention est moins élevée.

5.3. Effet des hautes pressions sur la texture

La texture est l'une des qualités organoleptiques les plus importantes pour définir la fraîcheur du poisson. Il nous a paru donc important d'apprécier l'évolution de ce critère de qualité au cours de la dégradation *post-mortem* avec ou sans traitement hautes pressions. Cette analyse par TPA (ou Texture Profiles Analysis) permet d'appréhender un grand nombre de paramètres texturaux en corrélation avec ce qui peut être suggéré par une analyse sensorielle faite par des consommateurs avertis.

L'analyse par la méthode de TPA permet de déterminer les effets de la pression et du stockage durant 0, 7 et 14 jours sur la texture du muscle de bar (*Dicentrarchus labrax* L.). Le tableau 16 présente six paramètres : la dureté, la cohésion, l'élasticité, la gommosité, la résilience et la masticabilité.

Pour les échantillons non pressurisés, les six critères diminuent de façon significative entre le premier et le septième jour de stockage *post-mortem*. Cela montre que le muscle se

ramollit. Ce ramollissement du muscle fait suite à la mise en place de différents mécanismes physiques et biochimiques qui dégradent la structure du muscle.

L'application des hautes pressions, sur les muscles de poisson, induit des modifications des critères de TPA. La dureté est plus faible pour les échantillons traités entre 100 et 300 MPa et elle est équivalente au témoin pour les traitements à 400 et 500 MPa. Les valeurs de cohésion, d'élasticité ainsi que de résilience restent presque constantes. La gommosité et la masticabilité ont des valeurs plus faibles que celle du témoin pour les traitements entre 100 et 300 MPa et elles sont supérieures pour les traitements à 400 et 500 MPa. Il est remarquable de constater que les changements des critères de TPA sont observés pour des pressions de 300 MPa. Les résultats de capacité de rétention en eau et d'exsudation ont déjà souligné que cette pression pouvait être définie comme un seuil à d'importantes modifications structurales.

Une diminution de la dureté pour les pressions à 100, 200 et 300 MPa par rapport à l'échantillon témoin à J0 est présentée; ce même résultat a été rapporté par Ashie et Simpson (1996) sur leurs études sur le tassergeral (*Pomatomus saltatrix* L.). Mais ils diffèrent des résultats de Angsupanish et Ledward (1998), qui remarquent une augmentation de la dureté des filets de cabillaud pour des traitements de 400 MPa pendant 20 minutes. La dureté n'évolue pas au cours du temps de stockage pour les traitements 100 et 200 MPa. Par contre, elle diminue à 14 jours pour les échantillons pressurisés à 300 MPa, et de petits changements au cours du stockage peuvent être relevés pour les échantillons traités à 400 et 500 MPa.

Les changements *post-mortem* de la texture sont souvent attribués à des modifications des protéines myofibrillaires dues à l'action de protéases, de micro-organismes et aussi à des variations des conditions physico-chimiques.

Les hautes pressions induisent une chute de pH réversible et des modifications des liaisons hydrogènes et hydrophobes susceptible de changer les structures des protéines.

En conclusion, les hautes pressions modifient la texture du poisson, par une suite de modifications comme l'affinité avec les molécules d'eau, l'activité protéasique, l'agrégation ou la gélification de protéines myofibrillaires sarcoplasmiques (Angsupanish & Ledward, 1998; Heremans, 1982).

Il est donc nécessaire de traiter les échantillons à des pressions supérieures à 300 MPa pour obtenir des valeurs de dureté après 7 et 14 jours de conservation équivalentes à celles des échantillons non traités à J0. En outre, les échantillons pressurisés à 100 et 200 MPa n'évoluent pas dans le temps.

Paramètres de TPA	Temps de stockage (jours)	Traitement hautes pressions					
		Témoin	100 MPa	200 MPa	300 MPa	400 MPa	500 MPa
Dureté	0	29,82 ± 2,13 ^{aα}	24,17 ± 3,99 ^{bca}	22,78 ± 2,86 ^{bα}	26,04 ± 3,89 ^{cα}	31,24 ± 2,24 ^{aα}	32,70 ± 4,70 ^{aαβ}
	7	25,53 ± 4,32 ^{aβ}	27,50 ± 3,49 ^{aα}	20,44 ± 2,72 ^{bα}	26,39 ± 2,22 ^{aα}	38,04 ± 2,76 ^{cβ}	33,14 ± 4,00 ^{dβ}
	14	25,25 ± 3,50 ^{aβ}	24,55 ± 4,49 ^{aα}	23,26 ± 3,85 ^{abα}	21,09 ± 1,51 ^{bβ}	35,01 ± 2,94 ^{cγ}	28,93 ± 3,38 ^{cα}
Cohésion	0	0,52 ± 0,04 ^{aα}	0,53 ± 0,06 ^{aα}	0,55 ± 0,03 ^{abα}	0,56 ± 0,03 ^{abα}	0,55 ± 0,08 ^{abα}	0,58 ± 0,04 ^{bα}
	7	0,25 ± 0,04 ^{aβ}	0,42 ± 0,05 ^{bcdβ}	0,41 ± 0,04 ^{bcβ}	0,40 ± 0,05 ^{bβ}	0,45 ± 0,07 ^{cdβ}	0,46 ± 0,05 ^{dβ}
	14	0,30 ± 0,04 ^{aγ}	0,36 ± 0,04 ^{bγ}	0,40 ± 0,04 ^{bcβ}	0,43 ± 0,06 ^{cβ}	0,50 ± 0,06 ^{dαβ}	0,56 ± 0,03 ^{eα}
Élasticité	0	0,69 ± 0,04 ^{aα}	0,63 ± 0,05 ^{bca}	0,61 ± 0,04 ^{bα}	0,65 ± 0,04 ^{cdα}	0,69 ± 0,04 ^{adα}	0,74 ± 0,06 ^{eα}
	7	0,51 ± 0,03 ^{aβ}	0,55 ± 0,06 ^{abβ}	0,59 ± 0,05 ^{bca}	0,54 ± 0,05 ^{abβ}	0,57 ± 0,06 ^{bβ}	0,62 ± 0,03 ^{cβ}
	14	0,47 ± 0,04 ^{aγ}	0,51 ± 0,05 ^{bβ}	0,57 ± 0,05 ^{cdα}	0,54 ± 0,05 ^{bcβ}	0,60 ± 0,03 ^{dβ}	0,66 ± 0,04 ^{eβ}
Gommosité	0	15,32 ± 1,22 ^{abα}	12,67 ± 1,99 ^{cdα}	12,60 ± 1,52 ^{cα}	14,49 ± 1,92 ^{adα}	17,19 ± 3,05 ^{bca}	18,97 ± 2,33 ^{eα}
	7	6,35 ± 1,47 ^{aβ}	11,39 ± 1,23 ^{bα}	8,40 ± 1,25 ^{cβ}	10,46 ± 1,34 ^{bβ}	17,07 ± 2,31 ^{dα}	15,21 ± 2,35 ^{eβ}
	14	7,51 ± 1,53 ^{aβ}	8,91 ± 2,10 ^{abβ}	9,36 ± 2,00 ^{bβ}	9,13 ± 1,42 ^{abβ}	17,44 ± 2,06 ^{cα}	16,24 ± 1,16 ^{cβ}
Résilience	0	0,34 ± 0,04 ^{abα}	0,35 ± 0,04 ^{bα}	0,32 ± 0,04 ^{abca}	0,31 ± 0,02 ^{bca}	0,30 ± 0,06 ^{cα}	0,32 ± 0,03 ^{abca}
	7	0,13 ± 0,02 ^{aβ}	0,23 ± 0,04 ^{bβ}	0,18 ± 0,02 ^{cβ}	0,18 ± 0,03 ^{cβ}	0,22 ± 0,04 ^{bdβ}	0,20 ± 0,03 ^{cdβ}
	14	0,14 ± 0,02 ^{aβ}	0,19 ± 0,03 ^{bγ}	0,17 ± 0,03 ^{bβ}	0,18 ± 0,03 ^{bβ}	0,23 ± 0,03 ^{cβ}	0,25 ± 0,02 ^{cγ}
Masticabilité	0	10,62 ± 1,12 ^{abα}	8,04 ± 1,58 ^{cdα}	7,68 ± 1,15 ^{cα}	9,45 ± 1,31 ^{bdα}	11,92 ± 2,46 ^{bα}	14,11 ± 2,12 ^{eα}
	7	3,27 ± 0,92 ^{aβ}	6,24 ± 1,06 ^{bβ}	4,97 ± 1,00 ^{bβ}	5,70 ± 0,91 ^{bβ}	9,84 ± 1,93 ^{cβ}	9,50 ± 1,53 ^{eβ}
	14	3,49 ± 0,69 ^{aβ}	4,57 ± 1,24 ^{bγ}	5,23 ± 0,94 ^{bβ}	4,92 ± 1,02 ^{bβ}	10,52 ± 1,50 ^{cαβ}	10,63 ± 0,31 ^{cβ}

Pour chaque critère, toutes les valeurs sont les moyennes de 10 expérimentations avec ± l'écart-type.

La même lettre (a, b, c, d, e) dans la même rangée indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs ($p \leq 0,05$).

La même lettre grecque (α , β , γ) dans la même colonne indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs ($p \leq 0,05$).

Tableau 16 : Paramètres de l'analyse de texture TPA de filets de bar traités par hautes pressions après 0, 7 et 14 jours de stockage à 4°C.

5.4. Effet des hautes pressions sur la couleur

La couleur du muscle du poisson dépend de l'origine, de la composition et de l'évolution *post-mortem* du muscle au cours du stockage. Ce paramètre influence fortement l'acceptabilité du produit par le consommateur. Car très souvent, l'une des premières impressions que tout consommateur a sur la qualité d'un produit est visuelle.

La coloration du muscle est associée aux pigments biologiques qui sont synthétisés et qui s'accumulent dans le muscle de poisson vivant, comme les caroténoïdes et les protéines avec une molécule d'hème. Mais elle est due aussi aux composés qui se forment après la mort dans le tissu à cause des manipulations des conditions de stockage et des réactions de brunissement.

Au cours du stockage, la chair devient opaque semblable à celle d'une chair cuite, suite à l'augmentation progressive des diffusions de la lumière dans toutes les directions de l'espace. Cette apparence est beaucoup moins attractive pour le consommateur qui associe la fraîcheur du poisson à un aspect bleuté translucide. Ces changements d'aspects sont dus à des modifications de la structure du muscle ou de l'arrangement spatial des cellules et des fibres musculaires ainsi qu'à des déplétions en protéines selon la saison. Ceci rend l'incidence de la lumière beaucoup plus aléatoire et contribue à augmenter l'aspect opaque. Le traitement par hautes pressions a tendance à modifier l'aspect du muscle, lui donnant l'apparence d'un poisson cuit (Angsupanich *et al.*, 1999). Ce phénomène, caractérisé par une perte de translucidité et l'apparition de plus en plus marquée d'un aspect opaque, est dû à des dénaturations des protéines induites par le traitement par hautes pressions (Cheah & Ledward, 1996). Cette caractéristique a aussi été montré pour le muscle bovin (Cheftel & Culioli, 1997).

Grâce au système CIE $L^*a^*b^*$, trois valeurs d'indices sont évaluées : la valeur de L^* (correspondant à la clarté), et les valeurs des indices a^* (selon l'axe rouge-vert) et b^* (selon l'axe jaune-bleu) indiquant à la fois la teinte et la saturation. Toutes ces données sont rassemblées dans le tableau 17, en fonction des variations de pressions appliquées et de durée de stockage. La chair du poisson se caractérise, juste après la mort, avant tout traitement, par une apparence translucide, lisse, brillante et bleuâtre définie par une valeur de L^* moyenne ($34,19 \pm 1,51$) et des valeurs faibles de a^* et b^* (respectivement $-2,48 \pm 0,46$ et $0,39 \pm 0,92$). La pigmentation du muscle blanc de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) est liée à la présence de protéines renfermant des molécules d'hèmes, de mélanines et de caroténoïdes. Au cours du stockage, le L^* augmente au 7ème jour ($47,71 \pm 0,60$) et ensuite diminue légèrement au 14ème jour ($42,56 \pm 1,90$). Les indices a^* et b^* restent presque constant durant le stockage réfrigéré. Au cours de la conservation, l'apparence des filets devient légèrement plus opaque et plus claire.

L'augmentation du niveau de pression modifie la clarté (L^*) du muscle. Cette clarté (L^*), pour les échantillons pressurisés à des valeurs égales et supérieures à 300 MPa, est presque deux fois supérieure à celles des échantillons non traités.

Pour les échantillons non pressurisés et pressurisés à 100 et 200 MPa, l'indice de clarté varie au cours du stockage. Il est plus fort au 7ème jour et ensuite diminue tout en restant

toujours supérieur à celui du témoin. On note que pour les échantillons pressurisés au dessus de 300 MPa, L^* évolue très peu au cours du stockage.

En conclusion, l'indice de clarté du muscle de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) s'accroît avec l'élévation de l'intensité du traitement. Cette progression est particulièrement importante entre 200 et 300 MPa. Par ailleurs, on ne voit pas d'évolution marquée pour la pression à 300 MPa durant la conservation à 4°C.

Le tableau montre également que l'indice de rouge-vert change avec le niveau de pressurisation passant de -2,48 pour les échantillons non traités à -4,79 pour 500 MPa. Concernant l'indice de jaune, deux groupes peuvent se définir par rapport à la valeur du témoin. L'indice b^* des traitements à 100 et 200 MPa a une valeur négative et l'indice b^* pour les traitements à 400 et 500 MPa a une valeur supérieure à celle du témoin.

Les changements de teinte, dans le système CIE Yxy (résultats non présentés), sont mieux décrits avec la valeur de λ . Il est remarqué que les longueurs d'onde augmentent de façon significative allant du vert jusqu'à des valeurs voisines du jaune. L'apparence du muscle de poisson n'est bien entendu ni bleue ni verte. Mais ces termes se traduisent par une couleur avec des tendances blanches translucides.

La couleur des filets de poisson est étroitement liée à sa composition ainsi qu'à sa structure. Les protéines associées à un groupement prosthétique, l'hème, les arrangements spatiaux des protéines et la quantité d'eau non liée influencent la dispersion de la lumière. Le bar (*Dicentrarchus labrax* L.), est considéré comme un poisson blanc. Ce qui explique que les modifications pigmentaires, engendrées par la pressurisation, sont mineures. Ces variations de teinte seraient plutôt attribuées à des bouleversements dans la matrice protéique. Des modifications similaires ont été relevées au cours du stockage du poisson. Un ensemble de réactions enzymatiques et non enzymatiques peut en être responsable, donnant lieu à une dégradation des protéines myofibrillaires ainsi qu'à une désorganisation des myofibrilles (Haard, 1992; Jiang, 2000).

		Traitement hautes pressions					
Paramètres de couleur	Temps de stockage (jours)	Témoin	100 MPa	200 MPa	300 MPa	400 MPa	500 MPa
L*	0	34,19±1,51 ^{aα}	37,45±1,52 ^{bα}	46,42±3,32 ^{cα}	61,54±1,61 ^{dα}	66,39±1,20 ^{eα}	71,30±1,49 ^{fα}
	7	47,71±0,60 ^{aβ}	48,94±1,70 ^{aβ}	54,32±1,94 ^{bβ}	63,51±1,26 ^{cβ}	72,04±1,50 ^{dβ}	70,24±1,59 ^{eα}
	14	42,56 ± 1,90 ^{aγ}	45,12±1,31 ^{bγ}	51,63±3,35 ^{cγ}	60,83±1,65 ^{dα}	65,55±1,95 ^{eα}	70,25±2,10 ^{fα}
a*	0	-2,48 ± 0,46 ^{aα}	-3,75±0,38 ^{bα}	-5,23±0,60 ^{cα}	-5,88±0,57 ^{dα}	-5,41±0,36 ^{cα}	-4,79±0,38 ^{eα}
	7	-2,23 ± 0,21 ^{aα}	-2,89±0,15 ^{bβ}	-4,05±0,28 ^{cβ}	-5,04±0,40 ^{dβ}	-4,85±0,40 ^{dβ}	-4,17±0,41 ^{cβ}
	14	-3,33±0,28 ^{aβ}	-3,48±0,21 ^{aγ}	-4,56±0,21 ^{bγ}	-5,76±0,43 ^{cα}	-5,07±0,31 ^{dβ}	-4,41±0,44 ^{bβ}
b*	0	0,39±0,92 ^{aα}	-0,67±1,03 ^{aα}	-2,25±1,00 ^{bα}	0,16±1,64 ^{aα}	2,58±1,51 ^{cα}	4,74±1,66 ^{dα}
	7	-0,93±0,57 ^{aβ}	-1,67±0,52 ^{abβ}	-2,65±1,01 ^{bccα}	-2,92±1,25 ^{cβ}	0,58±1,48 ^{dβ}	2,99±1,37 ^{eβ}
	14	0,78±1,14 ^{abα}	-0,43±0,79 ^{acα}	-0,71±1,06 ^{cβ}	-1,33±1,37 ^{cγ}	1,51±2,01 ^{bαβ}	4,75±1,81 ^{dα}
h	0	171,45±21,50 ^{aα}	190,65±15,85 ^{bca}	203,19±10,65 ^{cα}	177,98±15,53 ^{abα}	155,62±12,88 ^{dα}	136,60±9,30 ^{eα}
	7	201,66±12,96 ^{aβ}	209,63±8,18 ^{aβ}	212,47±11,83 ^{aα}	209,71±10,85 ^{aβ}	175,85±18,32 ^{bβ}	145,93±12,82 ^{cα}
	14	168,25±16,14 ^{aα}	187,08±12,51 ^{bα}	188,63±12,85 ^{bβ}	192,07±12,35 ^{bα}	164,96±18,61 ^{aaβ}	134,58±12,30 ^{cβ}
C*	0	2,68±0,47 ^{aα}	3,94±0,21 ^{ba}	5,78±0,51 ^{ca}	6,08±0,57 ^{ca}	6,13±0,72 ^{ca}	6,82±1,25 ^{daβ}
	7	2,48±0,13 ^{aα}	3,37±0,23 ^{bβ}	4,93±0,36 ^{cβ}	5,90±0,76 ^{dα}	5,08±0,37 ^{cβ}	5,24±0,84 ^{cβ}
	14	3,55±0,47 ^{aβ}	3,58±2,11 ^{aγ}	4,72±0,22 ^{bβ}	6,03±0,61 ^{cdα}	5,58±0,75 ^{caβ}	6,61±0,84 ^{dα}

Toutes les valeurs sont les moyennes de 10 expérimentations avec ± l'écart-type.

La même lettre (a, b, c, d, e) dans la même rangée indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs ($p \leq 0.05$).

La même lettre grecque (α , β , γ) dans la même colonne indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs ($p \leq 0.05$).

Tableau 17 : Résultats des différents paramètres de couleur du système L*a*b* de filets de bar traités par hautes pressions après 0, 7 et 14 jours de stockage à 4°C.

5.5. Effet de la pression sur l'évolution de la flore au cours du stockage

La chair du poisson fraîchement pêché est stérile car la peau et le système immunitaire empêchent les bactéries de proliférer dans la chair. Mais dès la mort de l'animal, les bactéries peuvent proliférer, du fait de l'arrêt de fonctionnement du système immunitaire. La flore bactérienne, présente dans le poisson vivant, est localisée principalement sur la peau et dans le système digestif. Les bactéries présentes sur la peau, envahissent la chair et ses fibres musculaires en traversant la barrière d'écaillés et en s'infiltrant entre les différentes fibres musculaires. La texture de la peau joue un rôle non négligeable lors de cette contamination.

Lors de cette expérimentation, l'effet du traitement par hautes pressions sur le développement bactérien est étudié (cf. figure 66).

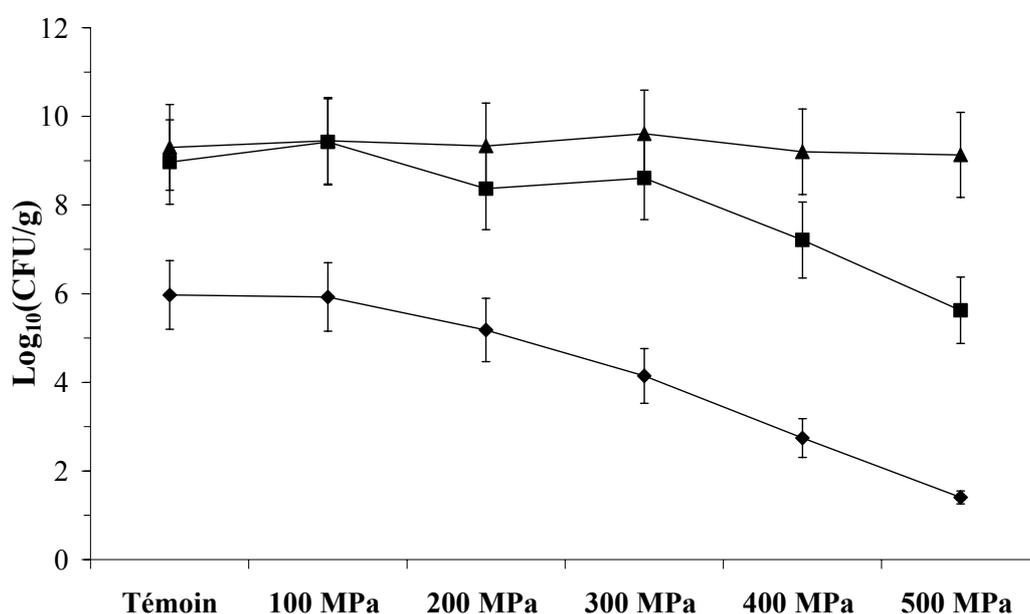


Figure 66 : Évolution de la flore totale au cours du stockage à 4°C pendant 0 (◆), 7 (■) et 14 (▲) jours, prélevée dans du muscle de bar après des traitements par hautes pressions.

Avec toutes les précautions d'hygiène requises, la flore totale relevée sur le témoin pour le jour 0, est de 10^6 CFU.g⁻¹ et elle évolue jusqu'à 10^9 CFU.g⁻¹ au 7^{ème} jour et 14^{ème} jour de stockage à 4°C. Les données fournies par la FAO (Food and Agricultural Organisation of the United Nation ; Huss, 1995) présentent également une contamination moyenne entre 10^8 et 10^9 CFU.g⁻¹ dans la chair de poisson.

La figure montre que la flore totale diminue pour des pressions appliquées supérieures à 200 MPa, avec seulement $10^{1.4}$ CFU.g⁻¹ pour les échantillons pressurisés à 500 MPa. Ces résultats confirment les données rapportées par Cheftel (1995) concernant l'impact des hautes pressions sur la réduction de la croissance microbienne : le procédé de pressurisation peut être défini comme un outil permettant d'améliorer les qualités microbiologiques des aliments frais.

La flore totale présente pour l'échantillon pressurisé à 500 MPa au 7^{ème} jour de stockage est équivalente à celle de l'échantillon témoin pour le premier jour. Cette observation montre

qu'un traitement avec cette intensité de pression permet d'augmenter la durée de conservation d'une semaine.

De plus, on constate qu'après 14 jours de conservation, les valeurs de comptage de la flore totale sont identiques pour tous les échantillons (10^9 CFU.g⁻¹). Ces valeurs représentent la contamination maximale que l'on peut obtenir par notre méthode d'expérimentation.

En conclusion, on retiendra que les hautes pressions, au dessus de 200 MPa, améliorent la qualité microbiologique des filets de poisson et cela pour les sept premiers jours de conservation.

5.6. Effet des hautes pressions sur la micro-structure

La figure 67 présente des coupes microscopiques permettant de visualiser l'effet du processus de dégradation *post-mortem* et du traitement hautes pressions dans le muscle de bar. Grâce à des colorations spécifiques, les protéines myofibrillaires sont visualisées en orange (coloration à l'orange G) et le collagène en bleu (coloration au bleu d'aniline).

Dans les coupes correspondantes au témoin, au cours du stockage, les fibres se déchirent et se séparent et ce processus évolue jusqu'à 14 jours de conservation. A cela, viennent s'ajouter des détériorations du tissu conjonctif péri-cellulaire visibles à 14 jours de stockage. Ces observations sont en accord avec les résultats de texture présentés précédemment : la détérioration de la structure du muscle durant la conservation explique la diminution de la dureté. Une dégradation des fibres et du tissu conjonctif par une action protéolytique affecte la structure des tissus, et entraîne un ramollissement du muscle.

Suite aux traitements par hautes pressions, l'apparence des fibres ne change que pour les traitements supérieurs à 100 MPa.

Les coupes correspondant aux échantillons pressurisés au dessus de 200 MPa montrent un resserrement des fibres musculaires; de plus, il est remarqué une diminution des espaces extracellulaires. Cette observation est de plus en plus marquée avec le niveau de pressurisation et indique que le muscle se compacte.

Cheftel et Culioli (1997) ont rapporté que les pressions au dessus de 200 MPa entraînaient une gélification des protéines. Ce processus est plus ou moins accentué selon le niveau de pression et la concentration en protéines. Toutes ces observations sont en accord avec l'augmentation de la fermeté du muscle avec la pression. Une structure plus dense du muscle se caractérise par des valeurs de dureté plus importantes. Au cours du stockage *post-mortem*, pour les échantillons pressurisés, on ne visualise aucune déstructuration des fibres musculaires même après 14 jours de stockage, par comparaison avec l'échantillon témoin. Les raisons probables sont attribuées à une inactivation des systèmes protéasiques et à une gélification de l'actomyosine au dessus de 200 MPa. Finalement, un fort traitement hautes pressions peut conduire à une bonne préservation des structures myofibrillaires du muscle de poisson.

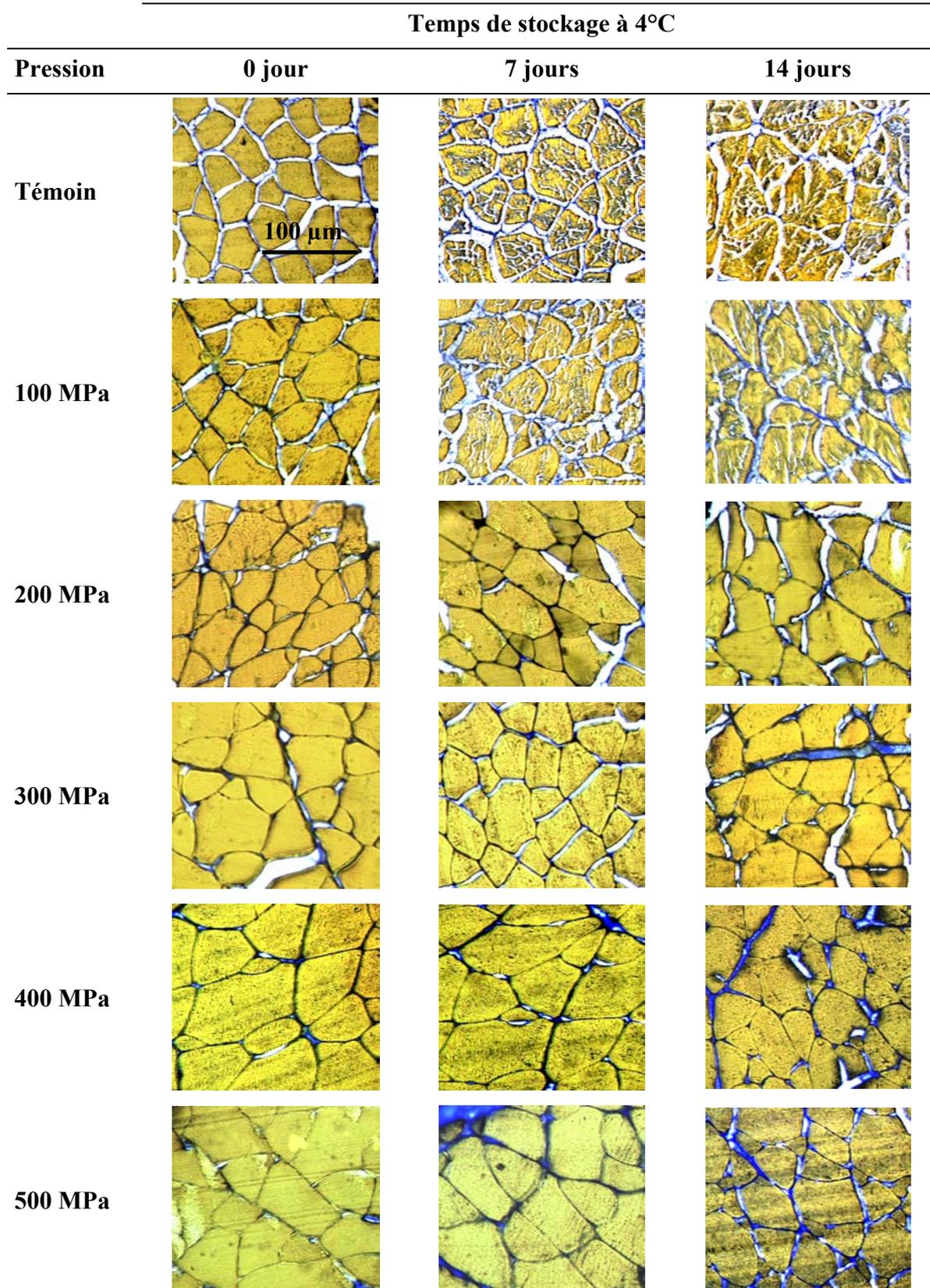


Figure 67 : Coupes transversales de muscle de bar traité par hautes pressions et stocké pendant 0, 7 et 14 jours à 4°C. Les protéines myofibrillaires sont colorées en orange et le collagène en bleu. L'échelle est indiquée par une barre représentant 100 μm dans la photographie du témoin à J0.

En conclusion, nos résultats montrent que la qualité des filets de poisson est améliorée par le traitement par hautes pressions et que la structure du muscle est remarquablement bien conservée. Du point de vue microbiologique, le traitement de pressurisation permet d'augmenter la durée de conservation. Au dessus de 300 MPa, le traitement hautes pressions permet de conserver la fermeté des filets. Malgré les changements de couleur suite aux différents traitements, ces différences sont gommées lors de la cuisson des produits : le poisson est consommé principalement cuit. En définitive, cet inconvénient est négligeable par rapport aux améliorations microbiologiques et texturales.

Partie 6.

Modifications *post-mortem*
des protéines de muscle de
viande

6. Modifications *post-mortem* des protéines de muscle de viande

La maturation est un moyen naturel qui permet l'attendrissement de la viande. Ce processus est indispensable pour augmenter la tendreté de la viande bovine. Au cours de cette période *post-mortem*, l'action de différentes protéases musculaires permet de dégrader les protéines myofibrillaires et d'assurer, ainsi, un relâchement de la structure des fibres musculaires. Il est donc intéressant de voir comment évoluent les protéines du muscle au cours de la maturation en condition réfrigérée.

Des résultats précédents ont montré que certaines protéases étaient activées ou inhibées selon les traitements par hautes pressions, auxquelles elles étaient soumises. Une activation de certaines voies protéasiques pourrait permettre d'accélérer ce processus de maturation.

Dans cette étude, les muscles de viande, récupérés 24 heures après la mort de l'animal, sont mis sous vide, pressurisés (à 100, 300 et 500 MPa) et conservés à 4°C pendant différentes périodes : 0, 7, 14 et 21 jours. Les différentes protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques sont extraites après les différents temps de maturation, et analysées.

6.1. Modifications *post-mortem* des protéines sarcoplasmiques selon différentes pressions

Les modifications des protéines sarcoplasmiques du muscle de bovin ont été suivies au cours de la maturation après que le muscle a été ou non pressurisé.

Les figures 68 et 69 montrent les profils électrophorétiques des protéines sarcoplasmiques du muscle de bovin selon les différents paramètres de temps *post-mortem* et de pression.

L'analyse des profils électrophorétiques montre que les protéines sarcoplasmiques ne sont pas modifiées de façon importante au cours du temps. La seule remarque qui peut être faite, est une diminution de l'intensité de certaines bandes. Mais, des différences significatives sont notées selon le traitement hautes pressions, auquel la viande a été soumise. Les profils des échantillons non pressurisés et pressurisés à 100 MPa ne sont pas différents. Les modifications sont visibles à partir des traitements à 300 MPa : elles sont repérables par des flèches sur la figure 68. Pour le traitement à 500 MPa, de nombreuses de bandes ont disparu. Angsupanish et Ledward (1998) ont rapporté de leurs travaux sur le cabillaud, qu'à partir de 300 MPa, les protéines sarcoplasmiques étaient dénaturées. Le traitement par hautes pressions modifie l'extractibilité des protéines. Des résultats similaires ont déjà été obtenus sur les protéines sarcoplasmiques de bovin par Jung (2000), et ils ont permis de conclure à une diminution de l'extractibilité des protéines sarcoplasmiques avec le traitement. Ces données permettent d'expliquer les différences observées pour les échantillons soumis à des traitements de 300 et 500 MPa.

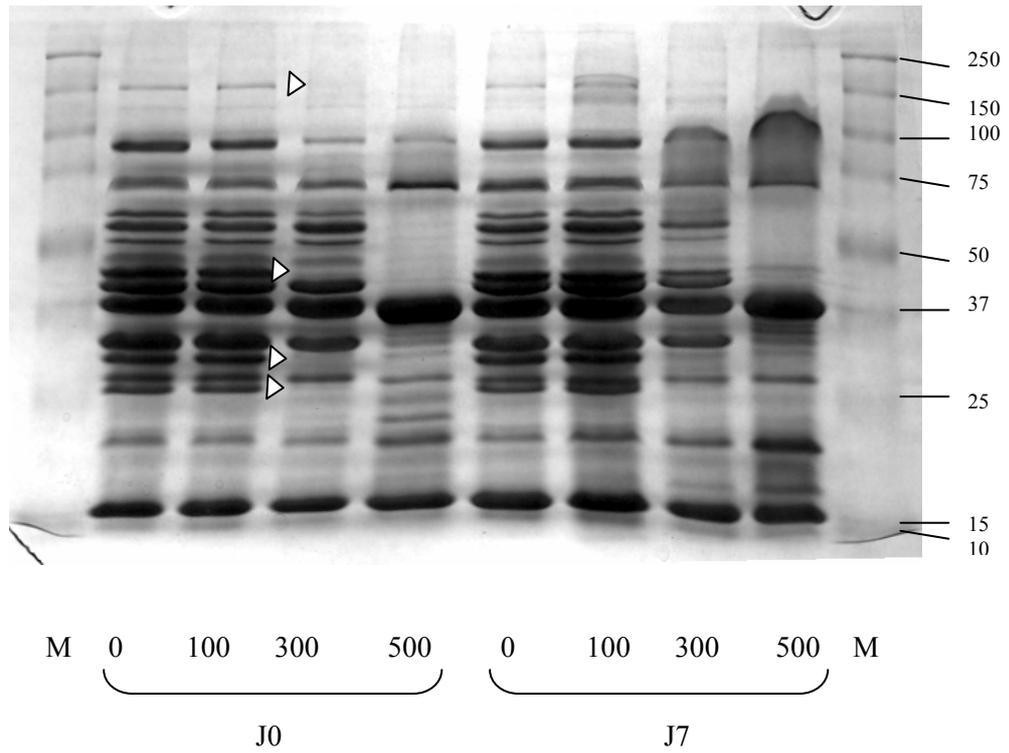


Figure 68 : Profil électrophorétique des protéines sarcoplasmiques pour les échantillons à J0 et J7 avec les différentes pressurisations (0, 100, 300 et 500 MPa).

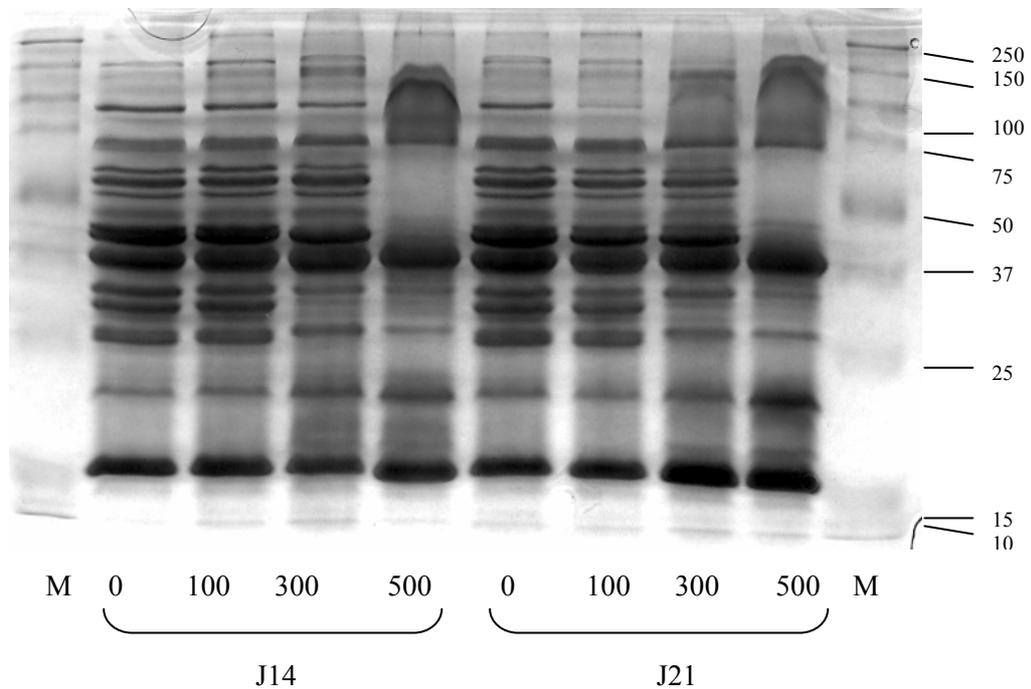


Figure 69 : Profil électrophorétique des protéines sarcoplasmiques pour les échantillons à J14 et J21 avec les différentes pressurisations (0, 100, 300 et 500 MPa).

6.2. Modifications *post-mortem* des protéines myofibrillaires selon différentes pressions

Tout comme les protéines sarcoplasmiques, les protéines myofibrillaires sont extraites et leurs modifications sont suivies au cours du temps et selon les différents niveaux de pressurisation. Ces modifications sont suivies par une analyse électrophorétique en conditions dénaturantes.

D'une façon globale, les profils électrophorétiques des protéines myofibrillaires sont modifiés par le temps de stockage et les hautes pressions (cf. figures 70 et 71).

Si l'on compare les différentes pressions à J0, les profils des protéines myofibrillaires extraites sont différents. Entre l'échantillon non traité et l'échantillon traité à 100 MPa, il n'y a pas de différence. Par contre, les échantillons pressurisés à 300 et 500 MPa sont très différents du témoin. Ces différences observées seraient principalement dues à des modifications de l'extractibilité des protéines avec les hautes pressions.

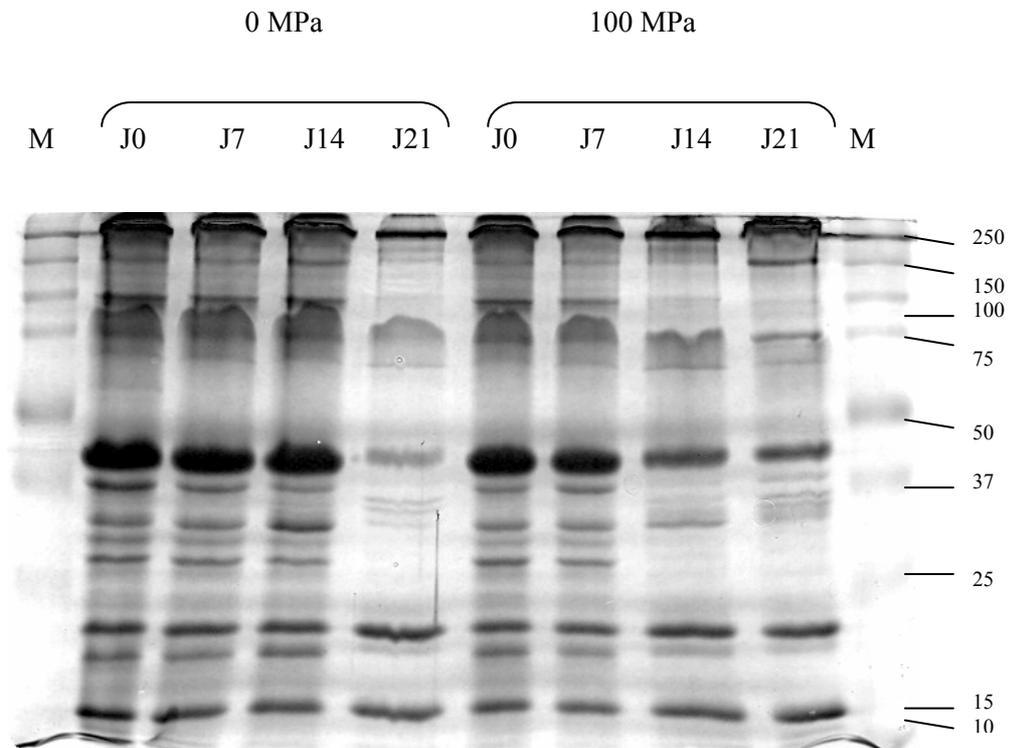


Figure 70 : Profil électrophorétique des protéines myofibrillaires pour les échantillons à 0 et 100 MPa au cours du temps (0, 7, 14 et 21 jours).

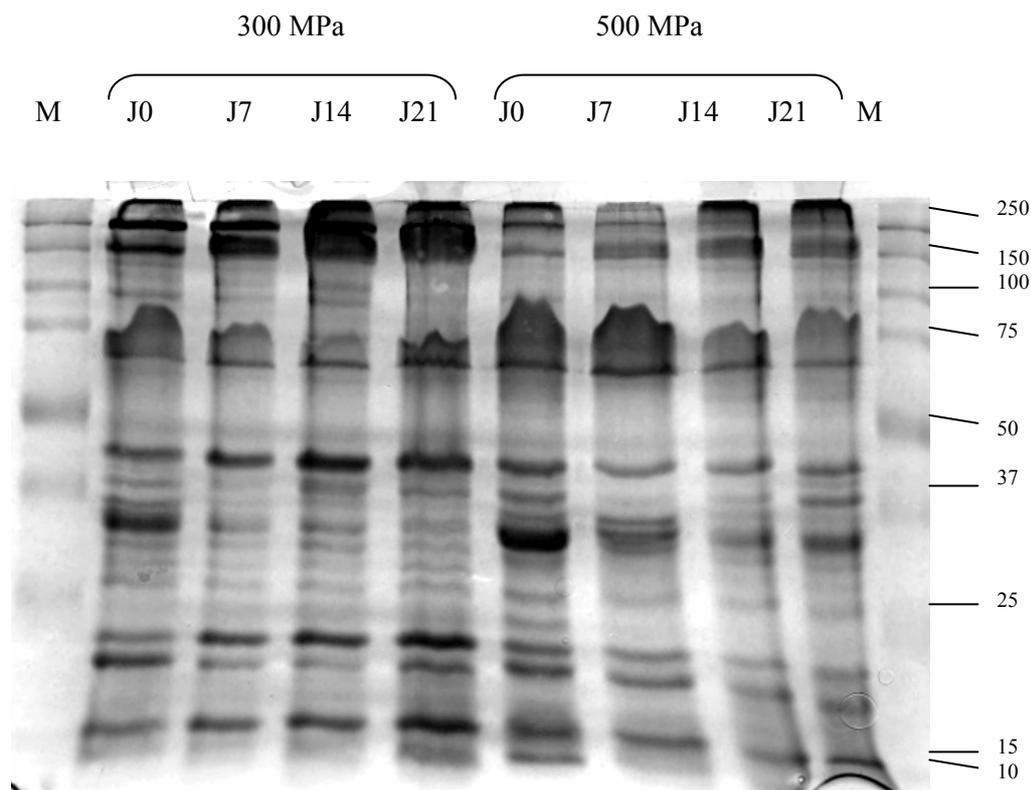


Figure 71 : Profil électrophorétique des protéines myofibrillaires pour les échantillons à 300 et 500 MPa au cours du temps (0, 7, 14 et 21 jours).

En fonction de la durée de stockage, des différences notables sont aussi visibles. Pour l'échantillon témoin, il n'y a pas de différence significative jusqu'à 14 jours. Mais l'échantillon à 21 jours de stockage réfrigéré est très différent. La myosine et l'actine sont moins intenses, l' α -actinine, une protéine de 100 kDa, la troponine -T et -C, la tropomyosine, une protéine de 20 kDa environ sont dégradées. Ces modifications sont dues à une dégradation par des protéases.

Enfin, en comparant l'évolution pendant le temps de stockage des échantillons ayant subi des traitements différents, on note que les profils en plus de ne pas être similaires à J0, évoluent aussi différemment au cours du stockage.

6.3. Activité des protéases du muscle de viande à 4°C

Aussitôt après la mort de l'animal, le muscle de bovin est placé dans des conditions réfrigérées, pour qu'il puisse accomplir son long processus de maturation. Cette période peut s'étendre sur une quinzaine de jours. Au cours de ce processus, le pH va évoluer et passer de 6,8 à une valeur proche de 5,8 à 24 heures *post-mortem* pour finir par se stabiliser à ce niveau.

Le but de cette étude est de suivre l'activité des principaux acteurs protéolytiques, les calpaïnes et la cathepsine D, au cours du temps et dans des conditions réfrigérées.

In vitro, des conditions similaires au muscle de viande en période de maturation, ont été mises en place afin de mimer l'action de ces deux protéases impliquées dans la protéolyse du muscle : la cathepsine D et les calpaïnes purifiées.

L'activité de ces protéases est suivie pendant quelques heures à température réfrigérée.

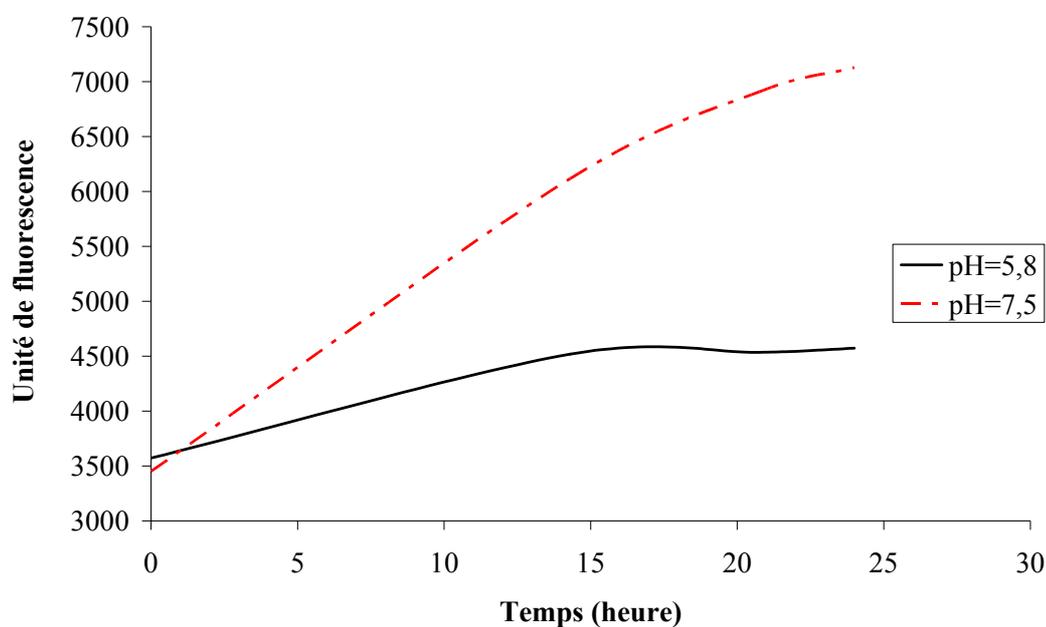


Figure 72 : Activité des calpaïnes purifiées de muscle de bovin à 4 °C à pH 5,8 et 7,5.

L'activité du système calpaïque, présentée sur la figure 72, montre une évolution au cours du temps pour les deux pH d'étude. Selon le pH, elle évolue différemment. Le pH égal à 7,5 est considéré comme le pH optimal du système calpaïque. Ce qui explique une plus forte activité par rapport à l'activité à pH 5,8, qui est plus proche des conditions *post-rigor*.

Cette observation montre, que le système calpaïque est actif dans les conditions *post-mortem*, bien qu'il se trouve dans des conditions de températures loin de celles optimales (la température optimale égale à 25 °C).

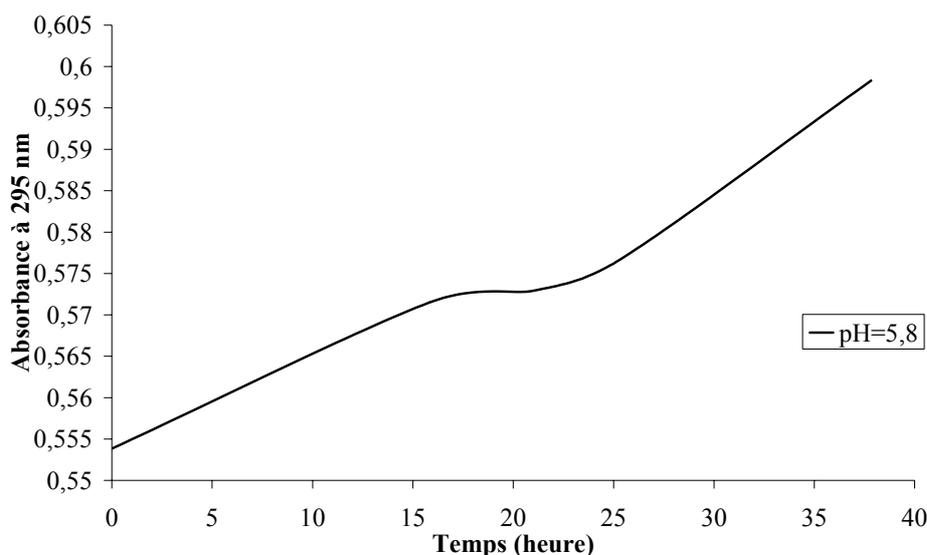


Figure 73 : Activité de la cathepsine D de muscle de bovin à 4 °C à pH 5,8.

De façon similaire, l'activité de la cathepsine D est suivie au cours du temps dans des conditions de température réfrigérée (cf. figure 73). Les observations montrent que cette protéase est active à pH 5,8 à une température de 4°C. Son pH optimal se trouvant dans la zone acide (entre 4 et 6). Cette protéase peut aussi jouer un rôle dans la dégradation *post-mortem*.

En définitive, cette étude qui visait à vérifier si ces protéases étaient actives dans des conditions que connaît le muscle au cours de la maturation, apporte des résultats positifs. Ces deux protéases, décrites comme impliquées dans la protéolyse du muscle de bovin, sont actives à température réfrigérée et dans des conditions de pH quasi *post-mortem*.

6.4. Effet des protéases calcium dépendantes sur les protéines myofibrillaires bovines

Le but de cette étude est d'évaluer les dégradations des protéines myofibrillaires par les calpaïnes. Cette expérimentation passe par une purification des calpaïnes du muscle de bovin, une incubation de ces protéases avec des protéines myofibrillaires et enfin, une étude de profils électrophorétiques en conditions dénaturantes. Le même type d'études a été réalisé précédemment sur les enzymes et le muscle de poisson : calpaïnes (Verrez-Bagnis *et al.*, 2002), cathepsines (Ladrat *et al.*, 2003).

6.4.1 Purification des calpaïnes et identification

Le système calpaïque est souvent cité dans la bibliographie comme impliqué dans la dégradation *post-mortem* des protéines myofibrillaires, et nos résultats montrent que ces protéases sont actives dans des conditions quasi *post-mortem*. Ce système enzymatique ne peut

fonctionner qu'en présence de calcium, et englobe différentes isoformes actives à des concentrations en calcium distinctes. La m-calpaïne nécessite une concentration en calcium de 0,2 à 1 mM, et la μ -calpaïne a besoin de 50 μ M de calcium. Dans le muscle, les concentrations en calcium ont été déterminées (Neyraud & Dransfield, 2002 ; Dransfield, 1999). Les résultats obtenus concluent sur une activité possible de la μ -calpaïne seulement, car les concentrations présentes ne peuvent en théorie et de façon *in vitro* activer seulement cette isoforme. Ces calculs de concentrations en calcium sont ramenés à l'ensemble du muscle, mais ils ne prennent pas en considération le cas de fortes concentrations ponctuelles et localisées dans le muscle. Il est possible d'imaginer des zones, où le calcium est en concentration plus élevée, permettant d'activer la m-calpaïne. De plus, il a été montré que des activateurs pouvaient favoriser l'activation des calpaïnes malgré de faibles concentrations en calcium par rapport à celles requises (Baki *et al.*, 1996; Johnson, 1990; Suzuki & Ohno, 1990).

Afin d'apporter quelques réponses, les calpaïnes de viande bovine ont été purifiées par chromatographie d'interactions hydrophobes et ensuite par chromatographie échangeuse d'anions. La chromatographie d'interactions hydrophobes permet de séparer les calpaïnes de leur inhibiteur, la calpastatine, et la chromatographie échangeuse d'anions permet dans un deuxième temps de séparer les différentes formes de calpaïnes. Le profil de la seconde chromatographie (échangeuse d'anions) est présenté sur la figure 74. Les fractions collectées ont été testées pour leur activité calpaïque.

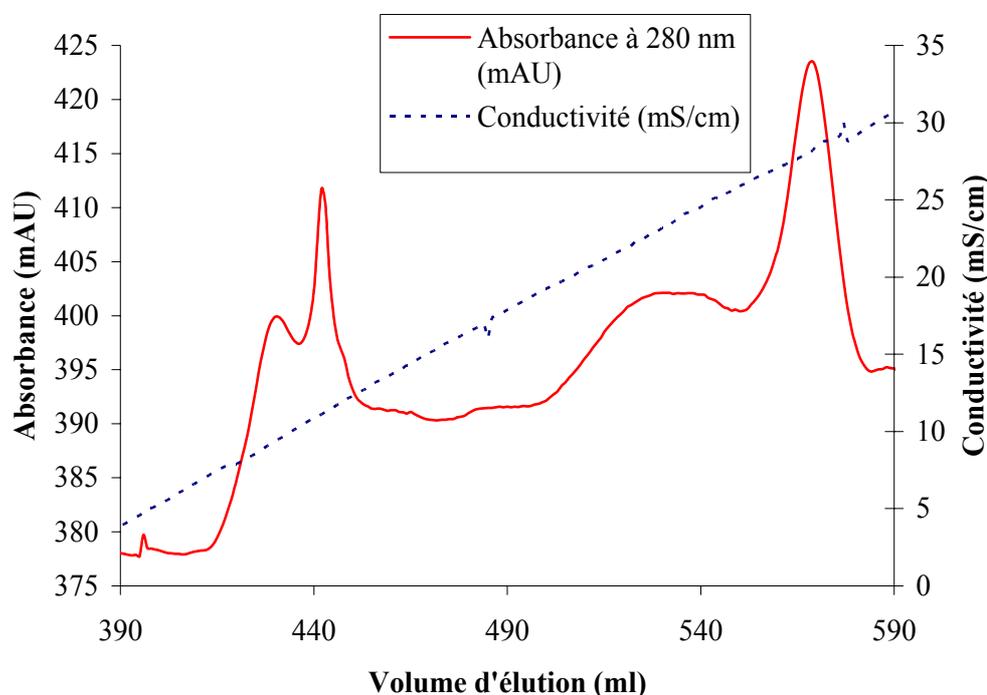


Figure 74 : Profil d'élution sur une colonne DEAE Sepharose Fast Flow d'un extrait de fractions des calpaïnes de muscle bovin (*Biceps Femoris*) obtenus sur une colonne Phenyl Sepharose CL-4B. La zone grisée (■) représente les fractions collectées, qui ont la plus forte activité calpaïque.

L'ensemble de ces fractions ayant une activité calpaïque sont caractérisées par des tests d'activité selon différentes concentrations en calcium montrant que c'est une m-calpaïne. De plus, une analyse électrophorétique en condition dénaturante de ces fractions, représentée sur la figure 75, montre la présence de la grosse sous-unité catalytique et de deux formes de petite sous-unités régulatrices. La petite sous-unité de la m-calpaïne est plus sensible à l'autolyse : elle donne une seconde forme de poids moléculaire inférieur (Goll *et al.*, 2003). Alors qu'au contraire, pour la μ -calpaïne, la sous-unité de 80 kDa est plus sensible à l'autolyse. Cette donnée peut permettre d'expliquer le résultat obtenu par électrophorèse et de confirmer que l'isoforme étudiée est la m-calpaïne.

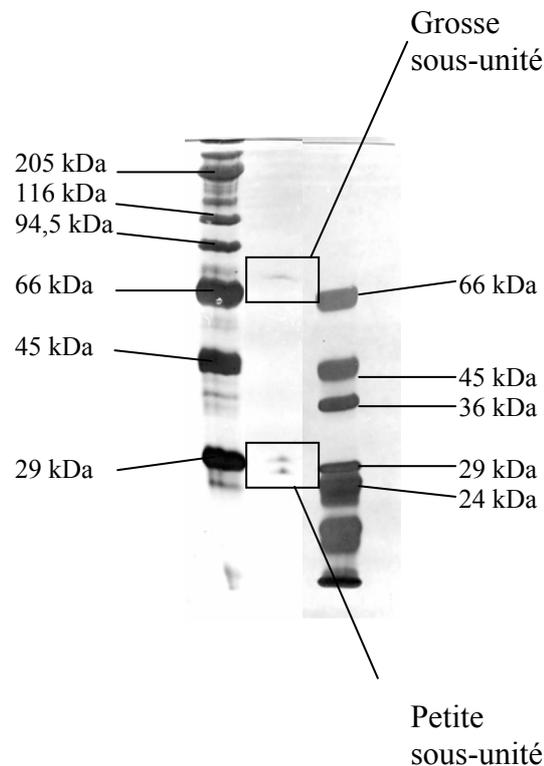


Figure 75 : Profil électrophorétique de la calpaïne de muscle de bovin dans les fractions.

6.4.2. Effet protéolytique de la m-calpaïne sur des protéines myofibrillaires

Les calpaïnes ont une activité protéolytique sur les protéines myofibrillaires. Dans la bibliographie, la titine, la nébuline, la desmine et la troponine-T sont souvent citées comme étant dégradées suite à une action protéolytique des calpaïnes (Koochmaraie, 1992b ; Goll *et al.*, 2003).

Les profils électrophorétiques des figures 76 et 77 montrent le résultat de l'action de la m-calpaïne extraite de viande bovine et d'une calpaïne commerciale de lapin (uniquement la grosse sous-unité catalytique) sur les protéines myofibrillaires de muscle bovin à 30 °C et à 4°C à un pH de 6 pour se mettre dans des conditions proches de celle de la maturation *post-mortem*

du muscle de bovin. Les proportions entre les enzymes protéolytiques et son substrat, les protéines myofibrillaires, sont totalement arbitraires.

La figure 76, profil électrophorétique des protéines myofibrillaires après une incubation avec de la calpaïne commerciale à différentes températures (30 et 4 °C), montre que les protéines sont dégradées par cette calpaïne commerciale. Mais selon la température d'incubation, la dégradation est plus ou moins rapide. On constate qu'à 30°C, la dégradation est presque totale au bout de 264 heures. Toutes les protéines myofibrillaires sont dégradées en peptides non visibles dans les conditions d'analyse.

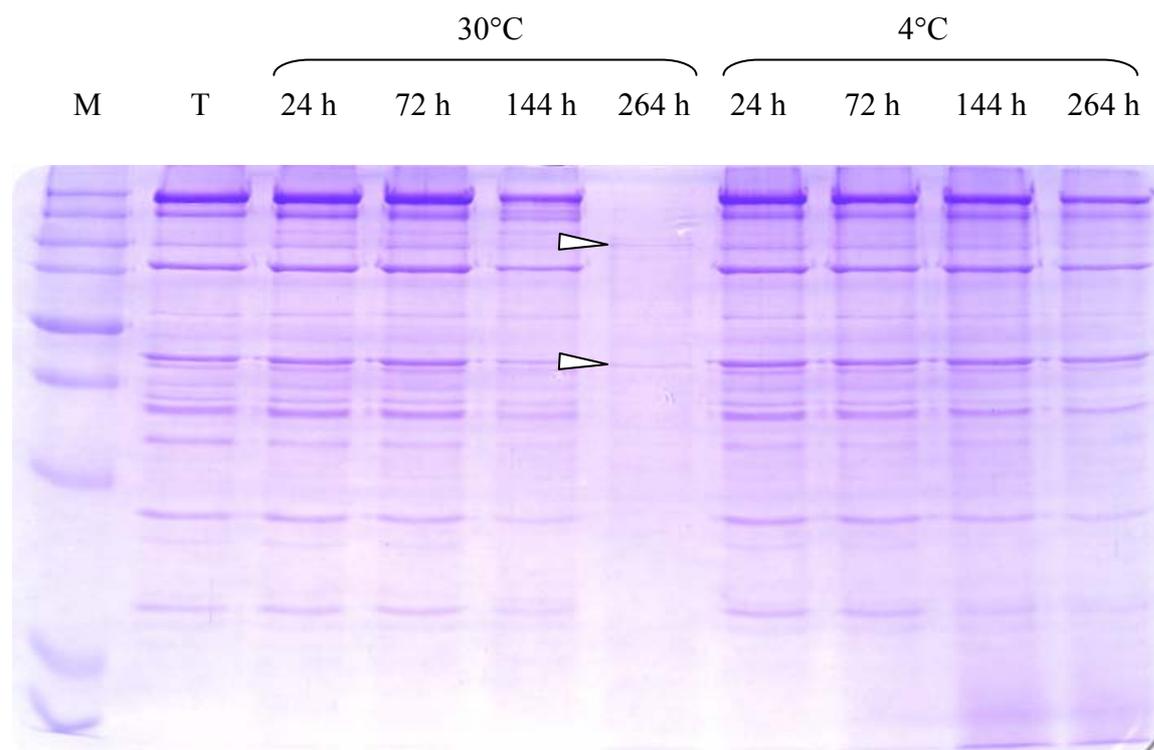


Figure 76 : Profils électrophorétiques de la dégradation des protéines myofibrillaires par la calpaïne commerciale. (M : Marqueur (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15, 10 kDa) ; T : Témoin calpaïne commerciale + protéines myofibrillaires sans incubation ; calpaïne commerciale + protéines myofibrillaires avec incubation à 30°C et 4°C pendant 24 h, 72 h, 120 h et 264 h).

Ensuite, la même expérience a été réalisée en utilisant de la calpaïne purifiée du même muscle, c'est-à-dire de la calpaïne de muscle de bovin. On s'est assuré néanmoins, que l'extrait de calpaïnes purifiées ne comportait pas d'activité de cathepsines. En s'appuyant sur le profil obtenu pour le témoin correspondant au mélange de protéines myofibrillaires avec les calpaïnes purifiées sans incubation, il est possible de constater des différences. Les calpaïnes purifiées de muscle de bovin à 30°C pendant 120 heures sont relativement actives, par contre, à 4°C, l'activité calpaïque est moindre. Ce résultat est normal, car on est loin de la température optimale (25°C) de cette protéase.

Lorsque la dégradation est presque totale comme c'est le cas à 30°C avec la calpaïne commerciale (après de 264 heures) ou la calpaïne purifiée (après 120 heures) (cf. figure 76 et 77), l'actine n'est pas totalement dégradée et une bande apparaît vers 100 kDa pouvant être des produits de dégradation de la myosine ; elle apparaît seulement lorsque la myosine est totalement dégradée. Ces résultats sont contraires à ceux mentionnés dans la bibliographie, où la myosine et l'actine sont rarement citées (Goll *et al.*, 2003) comme étant dégradées par la calpaïne sauf récemment dans le muscle de porc (Lametsch *et al.*, 2004).

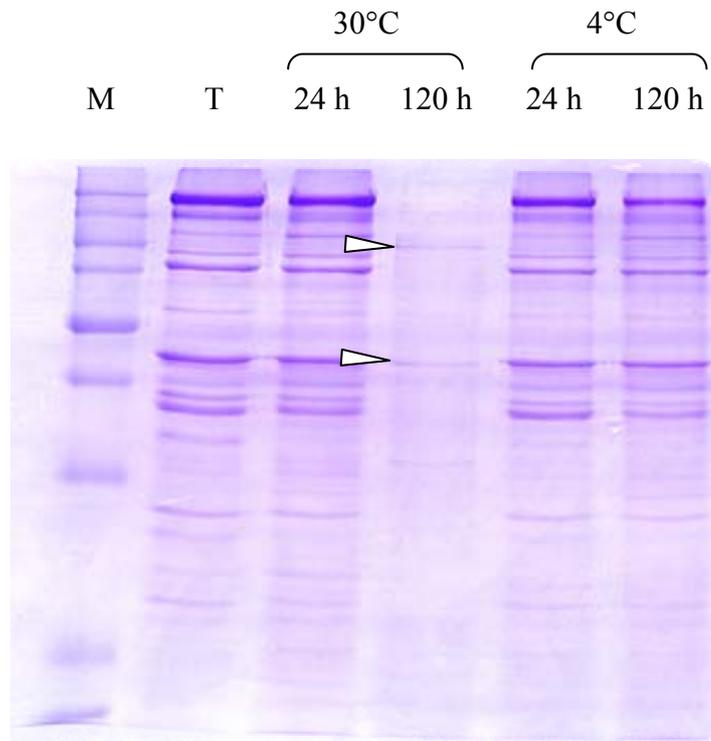


Figure 77 : Profils électrophorétiques de la dégradation des protéines myofibrillaires par les calpaïnes purifiées. (M : Marqueurs (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15, 10 kDa) ; T : Témoin : calpaïnes purifiées + protéines myofibrillaires sans incubation ; calpaïnes purifiées + protéines myofibrillaires avec incubation à 30°C et 4°C pendant 24 h et 120 h).

En conclusion, nous avons montré que dans le muscle de bovin, (i) les protéines sarcoplasmiques ne sont pas modifiées au cours du stockage à 4°C après une pressurisation, (ii) au dessus de 300 MPa, le profil de ces protéines change à cause de leur extractibilité mais elles restent stables au cours du temps, (iii) les protéines myofibrillaires sont affectées par la pressurisation mais également pas le temps de stockage et enfin (iv) la calpaïne bovine est capable de dégrader les protéines myofibrillaires.

Conclusion & Perspectives

Conclusion

Les travaux, que présente la bibliographie, dans le domaine de l'effet des hautes pressions sur les enzymes de la maturation, n'envisagent souvent que l'étude d'une seule famille de protéases présentes dans un muscle bien défini. Notre travail avait pour but de réaliser une synthèse sur les différentes familles de protéases susceptibles de participer à la dégradation du muscle, de comparer l'activité de ces systèmes protéolytiques sur deux muscles différents par leur composition et leur structure, et de quantifier l'effet des hautes pressions.

L'objectif premier de cette étude était de comprendre la dégradation dans deux muscles d'origine différente, le muscle de bar (*Dicentrarchus labrax* L.) et celui de bovin (*Biceps femoris*), en déterminant les différents acteurs potentiels intervenant dans la dégradation protéolytique. L'analyse des protéases désignées dans la bibliographie comme responsables de l'altération de la chair de poisson et de la maturation de la viande, a montré que certaines d'entre elles avaient un rôle plus prépondérant que d'autres. De plus, les différents systèmes impliqués peuvent avoir aussi une action complémentaire et/ou une action synergique. Des quantités de protéases différentes ont été mesurées dans les deux types de muscle utilisés pour cette étude. Ainsi, dans le poisson, les cathepsines B et L ainsi que les calpaïnes sont impliquées, alors que dans le muscle bovin, la cathepsine D et les calpaïnes seraient responsables de la protéolyse. Cependant, l'activité des protéases n'est pas le seul paramètre permettant d'estimer l'implication d'une protéase plutôt qu'une autre. Les conditions environnementales sont également à prendre en compte, car elles interviennent dans la régulation des activités protéolytiques. En tenant compte des conditions environnementales, des données bibliographiques ainsi que de nos différents résultats quantitatifs sur les protéases, il est possible de suggérer que l'altération *post-mortem* du muscle de bar est due en partie à l'activité des cathepsines B et L. Dans le muscle bovin, le ratio peu élevé entre la calpastatine et les calpaïnes montre que les calpaïnes sont impliquées dans la maturation ; de plus, la cathepsine D, de par son activité et des conditions physiologiques *post-mortem* de la viande, a sûrement aussi un rôle à jouer.

Après avoir caractérisé les protéases potentiellement responsables de la dégradation des protéines du muscle, l'effet des hautes pressions sur ces enzymes protéolytiques a été étudié de deux façons différentes selon que le muscle ou l'extrait enzymatique ont été pressurisés. Les données bibliographies rapportent que l'effet des hautes pressions sur une protéine est étroitement lié à son poids moléculaire, l'étendue de sa structure et la présence de sous-unités. Les systèmes impliqués dans la dégradation du muscle présentent des protéases différentes par leur structure, leur forme, leur localisation et leur régulation. Nos résultats montrent que les

hautes pressions favorisent la dissociation des structures dimériques des calpaïnes. Après une certaine limite de pression la structure tertiaire, après la structure quaternaire, est dégradée à son tour, induisant la perte totale d'activité de ces enzymes. Le comportement de ces protéases vis-à-vis des hautes pressions est similaire dans les deux modèles animaux étudiés. En ce qui concerne les enzymes lysosomales, nos travaux confirment que les hautes pressions entraînent une fragilisation des membranes lysosomales conduisant à la libération du contenu de ces vésicules ; ainsi le traitement hautes pressions conduit à une augmentation significative de l'activité des enzymes lysosomales. Ces protéases connaissent aussi une augmentation de leur activité, lorsque l'extrait seul est pressurisé, ce qui suggère que des modifications de la structure de la molécule ou seulement du site actif favorisent le contact avec le substrat.

Notre étude a également abordé l'évolution des systèmes protéolytiques au cours du temps de conservation après que le muscle a été soumis à un traitement par hautes pressions. Cette étude a été focalisée principalement sur le muscle de poisson, car peu de travaux avaient été effectués sur ce modèle. Ce travail a aussi permis d'approfondir le mécanisme d'activation des calpaïnes. Les calpaïnes perdent leur structure hétérodimérique sous l'action des hautes pressions. Pour des traitements à partir de 200-300 MPa, la structure tertiaire est à son tour altérée et la protéase n'est plus active. Une pression de 100 MPa provoque une dissociation, dont le résultat est identique à celui entraîné par l'effet du calcium. Dans les premiers jours de stockage du muscle, pour les échantillons pressurisés à 100 MPa, on remarque que l'activité des calpaïnes est plus importante que celle du témoin. Ainsi, l'application d'une pression de 100 MPa induit une dissociation instantanée d'un grand nombre de molécules de calpaïnes. Ces molécules dissociées deviennent susceptibles d'être autolysées, et à partir d'un certain degré d'autolyse, elles perdent leur activité protéolytique. Ceci explique que pour les échantillons pressurisés à 100 MPa, l'activité diminue au 4^{ème} jour de conservation. La maturation naturelle entraîne une dissociation plus lente, qui dépend de la disponibilité des ions calcium dans la matrice du muscle. La libération progressive des ions calcium permet un turn over de calpaïnes actives, qui explique que l'activité est constante sur les 7 jours de conservation. Concernant la calpastatine, nos résultats montrent que les hautes pressions n'altèrent pas son activité inhibitrice et que sa structure ne semble pas sensible à de possibles modifications conformationnelles mais par contre, pendant la conservation du muscle, la diminution de son activité peut s'expliquer par une action dégénérative des calpaïnes sur leur propre inhibiteur. Cette dernière donnée confirme de précédentes explications déjà évoquées. Quant aux protéases lysosomales, on note que les hautes pressions ont un effet limité dans le temps sur l'activité des cathepsines à cystéine : leur activité revient à un niveau initial deux jours après le traitement. De précédents résultats montraient que pour ceratines pressions, l'activité des protéases était amplifiée, lors du traitement de l'extrait enzymatique. Il avait été suggéré un réarrangement de la structure favorisant l'hydrolyse du substrat. Il est possible de suggérer, maintenant, que ce réarrangement structural est réversible. Cette donnée peut aussi s'expliquer par une autodigestion de cette famille de protéases. Pour la cathepsine à acide aspartique étudiée, ici la cathepsine D, on

constate aussi qu'une libération importante suite aux traitements favorisant la rupture des membranes lysosomales réduit leur durée de vie : une explication similaire à celles des cathepsines à cystéine pourrait être envisagée. D'autre part, les études de l'ensemble des protéines en fonction du temps et de la pression révèlent que les protéines sarcoplasmiques ne sont modifiées lors de la conservation que si aucune pression n'est appliquée, tandis que des modifications dans les protéines myofibrillaires ne sont observées que s'il y a un traitement par les hautes pressions.

Pour faire le parallèle avec les travaux déjà réalisés sur l'effet des hautes pressions sur le muscle de bovin, l'étude de la capacité de rétention en eau, de l'exsudation, de la couleur, de la texture, de la microstructure ainsi que de la microbiologie a été effectuée sur le muscle de bar soumis à un traitement par hautes pressions et un stockage en condition réfrigérée. Ces travaux apportent des résultats encourageants vis-à-vis des attentes organoleptiques. Après le traitement et au cours de la conservation, la texture conserve sa fermeté et la microstructure n'évolue pas. Les données de rétention d'eau et d'exsudation, en plus des résultats de texture et de microstructure, confirment que les hautes pressions provoquent des réarrangements structuraux des protéines du muscle, favorisant une gélification et garantissant un maintien de la matrice protéique au cours de la conservation. Ces résultats sont similaires aux résultats sur le muscle bovin, sur les premiers jours de maturation.

Nos conclusions sont donc les suivantes :

- les hautes pressions ont un effet sur les enzymes responsables de l'évolution *post-mortem* de la chair de poisson et du muscle de viande, qui dépend principalement de la famille de protéases considérée (désactivation de la calpaïne, libération des cathepsines des lysosomes),
- il a été trouvé des différences dans l'évolution des protéines musculaires selon le muscle considéré,
- les hautes pressions favorisent la conservation de la texture et de la qualité du muscle de poisson frais. Cependant, la gélification des protéines par une pression élevée modifie leur extractibilité et certaines d'entre elles ne sont plus analysables par nos méthodes.

Nous avons montré lors de ce travail que les calpaïnes et/ ou les cathepsines sont capables de dégrader certaines protéines myofibrillaires ou sarcoplasmiques du muscle de poisson ou de bovin.

Il serait intéressant, afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes, d'étudier la modification des affinités enzymes/substrats en fonction de la pressurisation. Cela consisterait à faire agir les enzymes pressurisées sur les protéines musculaires, les enzymes sur les protéines musculaires pressurisées ainsi que les enzymes pressurisées sur les protéines musculaires pressurisées.

De plus, il faudrait envisager d'étudier d'autres protéines : les protéines de masse moléculaire élevée et les protéines de la matrice extracellulaire, en liaison avec les calpaïnes, les

cathepsines ou d'autres protéases de la matrice extracellulaire comme les métallo-protéases et la collagénase. Pour cette étude, une approche protéomique pourrait être envisagée. Cet outil puissant permet de cribler un grand nombre de protéines et de peptides par une méthode électrophorétique bi-dimensionnelle suivie d'une analyse par spectrométrie de masse de spots déterminés.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Ando S., Hatano M. et Zama K. (1985). Deterioration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) muscle during spawning migration-I: changes in proximate composition of chum salmon muscle during spawning migration. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 80B, 303-307.

Ando M., Yoshimoto Y., Inabu K., Nakagawa T. et Makinodan Y. (1995). Post-mortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissues corresponding to post-mortem tenderization. *Fisheries Science*. 61 (2), 327-330.

Anese M., Nicoli M.C., Dall'aglio G. and Lerici C.R. (1995). Effect of high-pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities. *Journal of Food Biochemistry*. 18, 285-293.

Angsupanich K., Edde M. et Ledward A. (1999). Effects of high pressure on the myofibrillar proteins of cod and turkey muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(1), 92-99.

Angsupanish K. et Ledward A. (1998). High pressure treatments effects on cod (*Gadus morhus*) muscle. *Food Chemistry*. 63, 39-50.

Anson M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *Journal of General Physiology*. 22, 79-89.

Aoki T. et Ueno R. (1997). Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Research International*. 30, 585-591.

Ashie I.N.A., Sorensen T.L. et Nielsen P.M. (2002). Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness. *Food Chemistry and Technology*. 67 (6), 2138-2142.

B

Baki A., Tompa P., Alexa A., Molnar O. et Friedrich P. (1996). Autolysis parallels activation of μ -calpain. *Biochemical Journal*. 318, 897-901.

Balny C. et Masson P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*. 9 (4), 611-628.

- Barbosa-Canovas G.V. et Rodriguez J.J.** (2002). Update on nonthermal food processing technologies: pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. *Food Australia*. 54 (11), 513-520.
- Bendall J. R.** (1973). Post mortem changes in muscles. Dans: *G.H. Bourne (Ed), The Structure and Function of Muscle, 2nd Ed. Academic Press, New York*. 243-309.
- Berge P., Ertbjerg P., Melchior Larsen L., Astruc T., Vignon X. et Moller A.J.** (2001). Tenderization of beef by lactic acid injected at different times post mortem. *Meat Science*. 57, 347-357.
- Bessièrè P., Bancel F., Saldana J.L., Cottin P. et Ducastaing A.** (1999b). Pressure effects on proteolysis catalysed by calpain. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 47 (1), 25-36.
- Bessièrè P., Cottin P., Balny C., Ducastaing A. et Bancel F.** (1999a). Hydrostatic pressure and calcium-induced dissociation of calpains. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1430, 254-261.
- Boehm M.L., Kendall T.L., Thompson V.F. et Goll D.E.** (1998). Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *Journal of Animal Science*. 76, 2415-2434.
- Bonnet M., Ouali A. et Kopp J.** (1992). Muscle osmotic pressure as assessed by differential scanning calorimetry (DSC). *International Food Science and Technology*. 27, 399-405.
- Bourne M.C.** (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*. 32, 62-72.
- Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-54.
- Brauch G., Haensler U. et Ludwig H.** (1990). The effect of pressure on bacteriophages. *High Pressure Research*. 5, 767-769.
- Bremner H.A.** (1992). Fish flesh structure and the role of collagen - its post-mortem aspects and implications for fish processing. Dans: *Quality Assurance in the Fish Industry. Huss H.H., Jakobsen M. and Liston J. Elsevier Sci. Pub.* 39-62.
- Bremner H.A.** (2002). Safety and quality issues in fish processing. *Cambridge Woodhead Publishing Limited*. 507 p.
- Bremner A.H. et Hallet C.I.** (1985). Muscle fibre connective tissue junctions in the fish blue grenadier (*Macruronus novaezelandae*): a scanning electron microscope study. *Journal of Food Science*. 50, 975-980.
- Bridgman P.W.** (1912). Water, in the liquid and five solid forms, under pressure. Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences. 47, 439-559.
- Bush W.A., Stromer M.H., Goll D.E. et Suzuki A.** (1972). Ca²⁺-specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*. 52, 367-381.

C

- Cannon J.E., McKeith F.K., Martin S.E., Novakofski J. et Carr T.R.** (1993). Acceptability and shelf-life of marinated fresh and precooked pork. *Journal of Food Science*. 58, 1249-1253.
- Cano M.P., Hernandez A. and Ancos B.D.** (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*. 62, 85-88.
- Cavaille D., Combes D. et Zwick A.** (1996). Effect of high pressure and additives on the dynamics of water: Raman spectroscopy study. *Journal of Raman Spectroscopy*. 27, 853-857.
- Chapleau N.J. et de Lamballerie-Anton, M.** (2003). Changes in myofibrillar proteins interactions and rheological properties induced by high pressure processing. *European Food Research and Technology*. 216, 470-476.
- Cheah P.B. et Ledward D.A.** (1995). High-pressure effects on lipid oxidation. *Journal of the American Oils Chemists' Society*. 72 (9), 1059-1063.
- Cheah P.B. et Ledward D.A.** (1996). High Pressure Effects on Lipid Oxidation in Minced Pork. *Meat Science*. 43 (2), 123-134.
- Cheftel J.C.** (1991). Application des hautes pressions en technologie alimentaire. *Industries Alimentaires et Agro-Alimentaire*. 141-153.
- Cheftel J.C.** (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. Dans: C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson (Eds.), *High Pressure and Biotechnology, Actes de colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd*. 224, 195-209.
- Cheftel J.C.** (1995). Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*. 1, 75-90.
- Cheftel J.C. et Culioli J.** (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*. 46(3), 211-236.
- Cheftel J.C. et Dumay E.** (1997). " Les hautes pressions : principes et potentialités." *La Conservation Des Aliments*; 195-216.
- Chen G.H. Tang S.J., Chen C.S. et Jiang S.T.** (2001). High-level production of recombinant chicken cystatin by *Pichia pastoris* and its application in mackerel surimi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 641-646.
- Christensen M.L., Larsen L.M., Ertbjerg P. et Purslow P.P.** (2003). Effect of proteolytic enzyme activity and heating on mechanical properties of bovine single muscle fibres. *Meat Science*. 66 (2), 361-369.
- Coolican S.A. et Hathaway D. R.** (1984). Effect of L-alpha-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca^{2+} -dependent protease. *Journal of Biological Chemistry*. 259, 11627-11630.
- Cottin P., Vidalenc P. L. et Ducastaing A.** (1981). Ca^{2+} -dependent association between a Ca^{2+} -activated neutral proteinase (CANP) and its specific inhibitor. *FEBS Letters*. 136 (2), 221-224.

D

- Davis K.A., Huffman D.L. et Cordray J.A.** (1975). Effect of mechanical tenderization, aging and pressing on beef quality . *Journal of Food Science*. 40, 1222-1224.
- Davis G.W., Smith G.C. et Carpenter Z.L.** (1977). Effect of blade tenderization on storage life, retail case-life and palatability of beef . *Journal of Food Science*. 42, 330-337.
- Delbarre-Ladrat C., Verrez-Bagnis V., Noël J. et Fleurence J.** (2004). Proteolytic potential in white muscle sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post mortem storage on ice: time-dependent changes in the activity of components of the calpain system. *Food Chemistry*. 84, 441-446.
- Deschamps O., Cottin P., Largeteau A., Demazeau G. et Ducastaing A.** (1992). Incidence of high pressure on the kinetics parameters of Ca^{2+} dependent thiol proteases (calpains) from rabbit skeletal muscle. *Dans: High Pressure an Biotechnology. Balny, C, Hayashi, R., Heremans, K. et Masson P., eds. Actes de colloques INSERM/ John Libbey Eurotext, Montrouge*, p. 175.
- Doumit M.E. et Koochmaraie M.** (1999). Immunoblot analysis of calpastatin degradation. *Journal of Animal Science*. 77, 1467-1474.
- Dransfield E.** (1999). Meat tenderness - the μ -calpain hypothesis. *Proceedings of 45th ICoMST, Yokama, Japan*. p.220-228.
- Dransfield E.** (1993). Modelling post-mortem tenderisation—IV: Role of calpains and calpastatin in conditioning. *Meat Science*. 34 (2), 217-237.
- Dunajsky E.** (1979). Texture of fish. *Journal of Texture Studies*. 10, 301-318.
- Dutaud D., Taylor R., Picard B., Ouali A., Robert N., Briand M. et Briand Y.** (1996). Le protéasome: une nouvelle protéase impliquée dans la maturation de la viande? *Viandes et Produits Carnés*. 17, 33-335.
- Duston T.R. et Lawrie R.A.** (1974). Release lysosomal enzymes during post-mortem conditioning and their relationship to tenderness. *Journal of Food Technology*. 9: 43-50.
- Duston T.R.** (1983). Relationship of pH and temperature to disruption of specific muscles proteins and activity lysosomal proteases. *Journal of Food Biochemistry*. 7, 223-245.

E

- Earnshaw R.** (1996). High pressure food processing. *Nutrition and Food Science*. 2, 8-11.
- Edmunds T., Nagainis P.A., Sathe S.K., Thompson V.F. et Goll D.E.** (1991). Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 107, (2), 197-208.

- Elgasim E.A. et Kennick W.H.** (1982). Effect of high pressure on meat microstructure. *Food Microstructure*. 1, 75-82.
- Elce J.S., Davies P.L., Hegadorn C., Maurice D.H. et Arthur J.S.C.** (1997). The effects of truncation of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation. *Biochemical Journal*. 326, 31-38.
- Elce J.S., Hegadorn C. et Arthur J.S.C.** (1997) Autolysis, Ca²⁺ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 11268-11275.
- Ertbjerg P., Larsen L.M. et Muller A.J.** (1995). Lactic acid treatment for upgrading low quality beef. *Dans : Proceedings of the 41st International Congress of Meat Science and Technology, San Antonio, USA*. 670-671.
- Ertbjerg P., Mielche M.M., Larsen L.M. et Muller A.J.** (1999). Relationship between proteolytic changes and tenderness in prerigor lactic acid marinated beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 970-978.
- Etherington D.J.** (1991). Enzymes in the meat industry. *Dans: Enzymes in food processing, Tucker G.A.I. & Woode L.F.S (eds)*. 128-160.

F

- Fernández J.A.P.Á. et Fernández-López J.A.** (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*. 59 (3), 345-353.
- Focant B., Melot F., Collin S., Chikou A., Vandewalle P. et Huriaux F.** (1999). Muscle parvalbumin isoforms of *Clarias gariepinus*, *Heterobranchus longifilis* and an evaluation of their role in post-mortem proteolysis. *Journal of Food Science*. 65 (8), 832-851.
- Fürst D.O., Osborn M., Nave R. et Weber K.** (1988). The organization of titin filaments in the half sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy : a map of ten non repetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *Journal of Cell Biology*. 106, 1563-1572.

G

- Geesink G.H. and Koohmaraie M.** (1999). Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *Journal of Animal Science*. 77, 2685-2692.
- Geesink G., Morton J., Kent M. et Bickerstaffe R.** (2000). Partial purification and characterization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis. *Journal of Food Science*. 65 (8), 1318-1324.

- Girija N. et Rehbein H.** (1988). Comparison of parvalbumins patterns from different fish species by isoelectric focusing of muscle extracts. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 91 (4), 723-728.
- Goldberg A.L.** (1992). The mechanisms and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animals cells. *European Journal of Biochemistry*. 204, 9-23.
- Goll D.E., Otsuka Y., Nagainis P.A., Shannon J.D., Sathe S.K. et Murguma M.** (1983). Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. *Journal of Food Biochemistry*. 7, 137-177.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W. et Cong J.** (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*. 83, 731-801.
- Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G. et Ouali A.** (1998). The calpain system and skeletal muscle growth. *Canadian Journal of Animal Science*. 78 (4), 503-512.
- Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G. et Zalewska T.** (1992). Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays*. 14 (8), 549-556.
- Gomes M.R.A. and Ledward D.A.** (1996). Effect of high-pressure treatments on the activity of some polyphenoloxidases. *Food Chemistry*. 56, 1-5.
- Goodner J.K., Braddock R.J. and Parish M.** (1998). Inactivation of pectinesterase in orange and grapefruit juices by high pressure. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46, 1997-2000.
- Gornall A.G., Bardawill C.J. et David M.M.** (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 177, 751-766.
- Gould G.W.** (1995). The microbe as a high pressure target. *Dans: High Pressure Processing and Food* (D.A. Ledward, D. Johnston, R.G. Earnshaw and A.P.M. Hasting, Eds.) p. 27-36 Nottingham Press, Loughborough.
- Guroff G.** (1964). A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *Journal of Biological Chemistry*. 239, 149-155.

H

- Haard N.F.** (1992). Biochemistry and chemistry color changes in seafoods. *Dans: Advances in Seafood Biochemistry* (eds, Flick, G.J. and Martin, R.E.) Technomic Publishing Co. Lancaster. 305-360.
- Hallett I.C. et Bremner H.A.** (1988). Fine structure of the myocommata-muscle fibre junction in hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 44, 245-261.
- Han G. D., Matsuno M., Ikeuchi Y. et Suzuki A.** (2002). Effects of heat and high-pressure treatments on antigenicity of beef extract. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 66 (1), 202-205.

- Hayashi R.** (1991). High pressure in food processing and preservation: principle, application and development. *High Pressure Research*. 7, 15-21.
- Hayert M., Perrier-Cornet J. M. et Gervais P.** (1999). A simple method for measuring the pH of acid solution under high pressure. *The Journal of Physical Chemistry*. 103A, 1785-1789.
- Heremans K.** (1982). High pressure effects on protein and other biomolecules. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 11, 1-21.
- Hite B.H.** (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. *West Virginia Agricultural Experiment Station Bulletins*. 58, 15– 35.
- Ho M-L., Chen G.H. et Jiang S.T.** (2000). Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation of mackerel surimi. *Fisheries Science*. 66, 558-568.
- Ho C.Y., Stromer M.H. et Robson R.M.** (1996). Effect of electrical stimulation on postmortem titin, nebulin, desmin, and troponin T degradation and ultrastructural changes in bovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*. 74, 1563-1575.
- Ho C.Y., Stromer M.H., Rouse G. et Robson R.M.** (1997). Effects of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, desmin, troponin-T, and muscle ultrastructure in *Bos indicus* crossbred cattle. *Journal of Animal Science*. 75, 366-376.
- Holtzman E.** (1989). Lysosomes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 5, 483-525.
- Homma N., Ikeuchi Y. et Suzuki Y.** (1994). Effects of high pressure treatment on the proteolytic enzymes in meat. *Meat Science*. 38, 219-228.
- Homma N., Ikeuchi Y. et Suzuki Y.** (1995). Levels of calpain and calpastatin in meat subjected to high pressure. *Meat Science*. 41, 251-260.
- Hopkins D.L. et Thompson J.M.** (2001a). The relationship between tenderness, proteolysis, muscle contraction and dissociation of actomyosine. *Meat Science*. 57, 1-12.
- Hopkins D.L. et Thompson J.M.** (2001b). Inhibition of protease activity. Part 1. The effect on tenderness and indicators of proteolysis in ovine muscle. *Meat Science*. 59, 175-185.
- Hoover D.G., Metrick C., Papineau A.M., Farkas D.F. et Knorr D.** (1989). Biological effects of high pressure on food microorganisms. *Food Technology*. 99-107.
- Horowitz R., Kempner E.S. et Podolwsky R.J.** (1986). A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*. 323, 160-162.
- Huss H.H.** (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper 348*. Rome, FAO. 195 p.
- Hwang I.H., Devine C.E. et Hopkins D.L.** (2003). The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness. *Meat Science*. 65 (2), 677-69.

I

Ikeuchi Y., Tanji H., Kim K., and Suzuki A. (1992). Mechanism of heat-induced gelation of pressurized actomyosin: pressure-induced changes in actin and myosin in actomyosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.40, 1756-1761.

J

Jiang S.-T., Wang Y.-T. et Chen C.S. (1992). Lysosomal enzyme effect of post-mortem changes in tilapia (*Tilapia nilotica* * *T. aurea*) muscle myofibrils. *Journal of Food Science*. 57 (2), 277-279.

Jiang S.-T., Lee J.-J. et Chen, H.-C. (1996). Proteolysis of actomyosin by cathepsins B, L, L-like, and X from mackerel (*Scomber australasicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 769-773.

Jiang S.T. (1998). Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. *Proceeding of the National Science Council, ROC Part B: Life Science*. 22, 97-107.

Jiang S.T. (2000). Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. *Food Science and Agricultural Chemistry*. 2 (2), 55-74.

Johnson G.V.W. et Guttman R.P. (1997). Calpains : intact and active? *Bioessays*. 19, 1011-1018

Johnson P. (1990). Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism. *International Journal of Biochemistry*. 22(8), 811-822.

Jung S. (2000). Étude de l'effet des hautes pressions sur la texture, l'ultrastructure et un système enzymatique de viande. Thèse de l'Université de Nantes, 171 p.

Jung S., Ghoul M. et de Lamballerie-Anton M. (2000a). High-pressure effects on lysosomal integrity and lysosomal enzyme activity in bovine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(6), 2467-2471.

Jung S., Ghoul M. and de Lamballerie-Anton M. (2000b). Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing. *Meat Science*. 56 (3), 239-246.

K

- Kalichevsky M.T., Knorr D. et Lillford P.J.** (1995). Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science and Technology*. 6 (8), 253-259.
- Krebbers B., Matser A.M., Hoogerwerf S.W., Moezelaar R., Tomassen M.M.M. et van den Berg R.W.** (2003). Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 4 (4) , 377-385.
- Kristensen L., Christensen M. et Ertbjerg P.** (2006). Activities of calpastatin, μ -calpain and m-calpain are stable during frozen storage of meat. *Meat Scienc.* 72,116–120.
- Koide Y. et Noso T.** (1994). The complete amino acid sequence of pituitary cystatin from chum salmon. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 58 (1), 164-169.
- Koohmaraie M.** (1990). Inhibition of postmortem tenderization in ovine carcasses through infusion of zinc. *Journal of Animal Science*. 68, 1476-1483.
- Koohmaraie M.** (1992a). Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): Purification, characterization and comparison of its effects on myofibrils with μ -calpains. *Journal of Animal Science*. 70, 3697-3708.
- Koohmaraie M.** (1992b). The role of Ca^{2+} -dependent proteases (calpains) in post-mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*. 74, 239-245.
- Koohmaraie M.** (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Science*. 43, 193-201.
- Koomaraie M., Kennick W.H., Elgasim E.A., Dickson R.L. et Sandine W.E.** (1984). Effect of prerigor pressurization on the activity of calcium-activated factors. *Journal of Food Science*. 49, 680-684.
- Koohmaraie M., Schollmeyer J.E. et Duston T.R.** (1986). Effect of low-calcium-requiring calcium activated factor on myofibrils under varying pH and temperature conditions. *Journal of Food Science*. 51 (1), 28-32.
- Koohmaraie M., Whippe G., Kretchmar D.H., Crouse J.D. et Mersmann H.J.** (1991). Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science*. 69, 617-624.
- Kubota M., Kinoshita M.L., Kubota S., Yamashita M. Toyohara H. et Sakaguchi M.** (2001). Possible implication of metalloproteinases in post-mortem tenderization of fish muscle. *Fisheries Science*. 67 (5), 680-685.
- Kumamoto T., Kleese W.C., Cong J.Y., Goll D.E., Pierce P.R. et Allen R.E.** (1992). Localization of the Ca^{2+} -dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anatomical Record*. 232 (1), 60-77.

L

- Lamestsch R., Roepstorff P., Moller H.S. et Bendixen E.** (2004). Identification of myofibrillar substrates for μ -calpain. *Meat Science*. 68, 515-521.
- Ladrat C., Chaplet M., Verrez-Bagnis V., Noel J. et Fleurence J.** (2000). Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle: polymorphism and biochemical studies. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 125: 83-95.
- Ladrat C., Verrez-Bagnis V., Noel J. et Fleurence J.** (2002). Milli-calpain from Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle: purification, characterization of its activity and activation in vitro. *Marine Biotechnology*. 4, 51-62.
- Ladrat C., Verrez-Bagnis V., Noel J. et Fleurence J.** (2003). In vitro proteolysis myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry*. 81, 517-525.
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamare M., Taylor R.G., Farout L., Briand Y. et Briand M.** (2002). Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle. *Meat Science*. 61, 199-204.
- Lavety J., Afolabi O.A. et Love R.M.** (1988). The connective tissues of fish. IX. Gaping in farmed species. *International Journal of Food and Technology*. 23, 23-30.
- Lawrie R.A.** (1985). *Lawrie's meat science. 4th Ed. Pergamon Press, Oxford, UK.* 401-459.
- Lawrence T.E., Dikeman M.E., Stephen J.W., Obuz E. et Davis J.R.** (2004). In situ investigation of the calcium-induced proteolytic and salting-in mechanisms causing tenderization in calcium-enhanced muscle. *Meat Science*. 66 (1), 69-75.
- LeBail A., Chevalier D., Mussa D.M. et Ghouil M.** (2002). High pressure freezing and thawing of foods: a review. *International Journal of Refrigeration*. 25 (5), 504-513.
- Lewis G.J. et Purslow P.P.** (1991). The effect of marination and cooking on the mechanical properties of intramuscular connective tissue. *Journal of Muscle Foods*. 2, 177-195.
- López-Caballero M.E., Pérez-Mateos M., Montero P. et Borderias A.J.** (2000). Oyster preservation by high pressure treatment. *Journal of Food Protection*. 63 (2), 196-201.
- Love R.M.** (1970). *The Chemical Biology of Fishes. Academic Press, London.* 547p.
- Ludwig H.** (2002). Cell biology and high pressure: applications and risks. *Dans: Frontiers in High Pressure Biochemistry and Biophysics. Ed. by Cl. Balny, P. Masson and K. Heremans. BBA Special Issue.* 390-391.
- Lullien-Pellerin V. et Balny C.** (2002). High-pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 3, 209-221.

M

- Macfalane J.J. et McKenzie I.J.** (1976). Pressure-induced solubilization of myofibrillar proteins. *Journal of Food Science*. 41, 1442-1446.
- Makinodan Y., Akasaka T., Toyohara H. et Ikeda S.** (1982). Purification and properties of carp muscle cathepsin D. *Journal of Food Science*. 47, 647-652.
- Mallya S.K., Meyer S., Bozyczko-Coyne D., Siman R. et Ator M.A.** (1998). A sensitive, continuously recording fluorogenic assay for calpain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 248, 293-296.
- Masson P.** (1992). Pressure denaturation of proteins. *Dans: High Pressure and Biotechnology Eds C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson Colloque INSERM / John Libbey Eurotext Ltd*. 224, 89-99.
- Matsumoto T., Okitani A., Nishimuro T. et Kato H.** (1983). Mode of degradation of myofibrillar proteins by rabbit muscle cathepsin D. *Biochimica et Biophysica Acta*. 755, 76-80.
- Matsukura U., Okitani A. et Kato H.** (1981). Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)*. 662 (4), 76-80.
- Mellgren, R.L., Mericle, M.T. et Lane, R.D.** (1986). Proteolysis of the calcium-dependent protease inhibitor by myocardial calcium-dependent protease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 246(1), 233-9.
- Mellgren R.L.** (1991). Proteolysis of nuclear by μ -calpain and m-calpain. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 13920-13924.
- Melloni E., Michetti M., Salamino F., Sparatore B. et Pontremoli S.** (1998). Mechanism of Action of a New Component of the Ca^{2+} -Dependent Proteolytic System in Rat Brain: The Calpain Activator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 249 (3), 583-588.
- Messens W., van Camp L. et Huyghebaert A.** (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends on Food Science and Technology*. 8, 107-112.
- Mestre Prates J.A., Garcia e Costa F.J.S., Ribeiro A.M.R. et Dias Correia A.A.** (2002). Contribution of major structural changes in myofibrils to rabbit meat tenderization during ageing. *Meat Science*. 61, 103-113.
- Michetti M., Salamino F., Minafra R., Melloni E., et Pontremoli S.** (1997). Calcium-binding properties of human erythrocyte calpain. *Biochemical Journal*. 325 (3), 721-726.
- Mikami M., Whiting A.H., Taylor A.J., Maciewicz R.A. et Carpenter Z.L.** (1987). Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates. *Meat Science*. 21, 81-97.
- Mozhaev V.V., Heremans, K., Frank L., Masson P. et Balny C.** (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Tibtech*. 12, 493-501.
- Mozhaev V.V., Lange R., Kudryashova E.V. et Balny C.** (1996). Application of high pressure for increasing activity and stability of enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*. 52, 320-331.

Murachi T., Tanaka K., Hatanaka M. et Murakami T. (1981). Intracellular Ca²⁺-dependant protease (CALPAIN) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (CALPASTATIN). *Advances in Enzymes Regulation*. 19, 407-424.

Muramoto M. et Seki N. (1988). Fragmentation of denatured carp myosin by calpain and some properties of fragments. *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 54 (6), 1055-1061.

Mykles D.L. (1989). High-molecular-weight serine proteinase from lobster muscle that degrades myofibrillar proteins. *Journal of Experimental Zoology*. 250, 244-252.

Mykles D.L. et Haire M.F. (1995). Branched-chain-amino-acid-preferring peptidase activity of the lobster multicatalytic proteinase (proteasome) and the degradation of myofibrillar proteins. *Biochemical Journal*. 306, 285-291.

N

Nagaraj N.S., Anilakumar K.R. et Tanthanam K. (2002). Changes in the calpain-calpastatin and cathepsin (B, B+L, H and D) during postmortem storage of goat muscle. *Journal of Food Biochemistry*. 26, 75-89.

Nakagawa T., Watabe S. et Hashimoto K. (1988a). Electrophoretic analysis of sarcoplasmic proteins from fish muscle on polyacrylamide gels. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 54 (6), 993-998.

Nakagawa T., Watabe S. et Hashimoto K. (1988b). Identification of three major components in fish sarcoplasmic proteins. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 54 (6), 999-1004.

Neyraud, E. et Dransfield, E. (2002). Free calcium ion concentration following calcium addition to meat. *Proceedings of the 48th ICoMST, Rome, Italy*.

Nielsen B.L. et Nielsen H.H. (2001). Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 128, 351-363.

O

Offer G., Moos C. et Starr R. (1973). A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. *Journal of Molecular Biology*. 74, 653-676.

Ogata H., Aranishi F., Hara K., Osattomi K. et Ishihara T. (1998). Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L. *Journal of Science and Food Agricultural*. 76, 499-504.

Ohmori T., Shigehisa T., Taji S. et Hayashi R. (1991). Effect of high pressure on the protease activities in meat. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55, 357-361.

- Ohmori T., Shigehisa T., Taji S. et Hayashi R.** (1992). Biochemical effects of high hydrostatic pressure on the lysosomes and proteases. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 56 (8), 1285-1288.
- Ohsumi Y., Ishikawa T. et Kato K.** (1983). A rapid and simplified method for the preparation of lysosomal membranes from rat livers. *Journal of Biochemistry*. 93, 547-556.
- Okitani A., Matsumoto T., Yohko Kitamura Y. et Kato H.** (1981). Purification of cathepsin D from rabbit skeletal muscle and its action towards myofibrils. *Biochimica et Biophysica Acta*. 662 (2), 202-209.
- Olsen K., Kristiansen K.R. et Skibbsted L.H.** (2003). Effect of high hydrostatic pressure on the steady-state kinetics of tryptic hydrolysis of β -lactoglobulin. *Food Chemistry*. 80 (25), 255-260.
- Olson S.** (1995). Production equipment for commerciale use. *Dans: Ledward, D.A. Johnson, D.E. Earnshaw, R.G. and Hasting, A.P.M. (Eds) High Pressure Processing of Food. Nottingham University Press, Nottingham.* 167-180.
- Orlien V., Hansen E. et Skibsted L.H.** (2000). Lipid oxidation in high pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research and Technology*. 211, 99-104.
- Orlowski M. et Wilk S.** (1981). A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalincontaining peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 101 (3), 814-822.
- Ono Y., Sorimachi H. et Suzuki K.** (1998). Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 245, 289-294.
- Otake T., Mori H., Izumoto Y., Nishimura H., Oishi I., Shigehisa T. et Ohno H.** (1997). Effects of high hydrostatic pressure treatment on HIV infectivity. *Dans: High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology (K. Heremans Ed.) Leuven University Press.* 233-236.
- Ouali A.** (1990). Meat tenderization: possible causes and mecanisms. A review. *Journal of Muscle Foods*. 129-165.
- Ouali A.** (1992). Proteolytic and physiological mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*. 74, 251-265.
- Ouali A., Garrel N., Obled A., Deval C. et Valin C.** (1987). Comparative action of cathepsins D, cathepsins B, cathepsins B, cathepsins I and of a new lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils. *Meat Science*. 19, 83-100.
- Ouali A., Obled A., Cottin P., Merdaci N., Ducastaing A. et Valin C.** (1983). Comparative effects of post-mortem storage and low-calcium-requiring neutral proteinase on bovine and rabbit myofibrillar proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 34 (5), 466-476.
- Ouali A. et Talmant A.** (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*. 28, 331-348.

P

- Pearson A.M. et Young R.B.** (1989). Muscle and meat biochemistry. *Food Science and Technology. A series of monographs. ACademic Press, San Diego.*
- Polydera A.C., Stoforos N.G. et Taoukis P.S.** (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering.* 60 (1), 21-29.

R

- Raser K.J., Posner A. et Wang K.K.W.** (1995). Casein zymography : a method to study μ -calpain, m-calpain and their inhibitory agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 319 (1), 211-216.
- Rechsteiner M.** (1992). The multicatalytic and 26S proteases. *Journal of Biological Chemistry.* 268, 6065-6068.
- Rivett A.J.** (1989). The multicatalytic proteinase complex. *Revisiões sobre biologia celular.* 20, 113-123.
- Rivett A.J.** (1993). Proteasomes. Multicatalytic complex. *Biochemical Journal.* 291, 1-10.
- Rizo J. et Sudhof T.C.** (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca^{2+} -binding domain. *Journal of Biological Chemistry.* 273, 15879-15882.
- Robert N., Briand M., Taylor R.G. et Briand Y.** (1999). The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Science.* 51, 149-153.
- Roncalés P., Geesink G.H., van Laack R.L.J.M., Jaime I., Barnier V.M.H. et Smulders F.J.M.** (1995). Meat tenderization: enzymatic mechanisms. *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality. Edited by Ouali A., Demeyer A.I. and Smulders F.J.M.* 331-331.
- Rowe R.W.D.** (1986). Elastin in bovine *Semitendinosus* and *Longissimus dorsi* muscles. *Meat Science.* 17 (4), 293-312.

S

- Saido T.C., Sorimachi H. et Suzuki K.** (1994). Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB Journal.* 8, 814-822.

- Sale A.J.H., Gould G.W. et Hamilton W.A.** (1970). Inactivation of bacteria spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology*. 60, 323-334.
- Sanchez C. et Frémont S.** (2003). Conséquences des traitements thermiques et de la formulation sur la structure et l'allergénicité des protéines alimentaires. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 43, 13-20.
- Sancho F., Lambert Y., Demazeau G., Largeteau A., Bouvier J.M. et Narbonne J.F.** (1999). Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. *Journal of Food Engineering*. 39 (3), 247-253.
- Scheibenzuber M., Grimm V., Blumelhuber G., Behrendt H., Ring J. et Meyer-Pittroff R.** (2002). Influence of high pressure treatment on the allergenicity of foods. *Influence of high pressure treatment on the allergenicity of foods. Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II R. Winter (Ed.)*. 363-366.
- Sentandreu M.A., Coulis G. et Ouali A.** (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*. 13 (12), 400-421.
- Shigehisa T., Ohmori T., Saito A., Taji S. et Hayashi R.** (1991). Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 12 (2-3), 207-215.
- Silva J.L., Foguel D., Da Poian A.T. et Prevelige P.E.** (1996). The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Current Opinion in Structural Biology*. 6 (2), 166-175.
- Simpson R.K. et Gilmour A.** (1997). The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffer saline and model food system. *Journal of Applied Microbiology*. 83, 181-188.
- Strobl S., Fernandez-Catalan C., Brau M., Huber R., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K. et Bode, W.** (2000). The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(2), 588-592.
- Suzuki A.** (2000). Effects of Heat and High-Pressure Treatments on Antigenicity of Beef T. *Trends in High Pressure Bioscience Biotechnology R. Hayashi (Ed.)*. 19, 365-374.
- Suzuki K. et Ohno S.** (1990). Calcium activated neutral protease - Structure-function relationship and functional implications. *Cell Structure and Function*. 15, 1-6.
- Suzuki K. et Sorimachi H.** (1998). A novel aspect of Calpain activation. *FEBS Letters*. 433, 1-4.

T

- Tanaka K., Yoshimura T., Ichihara A., Ikai A., Nishigai M., Morimoto M., Sato M., Tanaka N., Katsube Y., Kameyama K. et Takagi T.** (1988). Molecular organization of a high

molecular weight multi-protease complex from rat liver. *Journal of Molecular Biology*. 203, 985-996.

Tanaka K., Yoshimura T., Ichihara A., Kameyama K. et Takagi T. (1986). A high molecular weight protease in the cytosol in the rat liver. II. Properties of the purified enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 261, 15204-15207.

Taylor M.A. et Etherington D.J. (1991). The solubilization of myofibrillar proteins by calcium ions. *Meat Science*. 29, 211-219.

Taylor R.G., Geesink G.H., Thompson V.F., Koohmaraie M. et Goll D.E. (1995b). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science*. 73, 1351-1367.

Taylor R.G., Tassy C., Briand M., Robert N., Briand Y. et Ouali A. (1995a). Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Molecular Biology Report*. 21, 71-73.

Thompson V.F. et Goll D.E. (2000). Purification of μ -calpain, m-calpain and calpastatin from animal tissues. Dans: "Methods in Molecular Biology", *Calpain Methods and Protocols* (Elce, J.S., ed.), Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey. p 3-16.

Timson W.J. et Short A.J. (1965). Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure. *Biotechnology and Bioengineering*. 7, 139-159.

Tompa P., Baki, A., Schad E. et Friedrich P. (1996). The calpain cascade: μ -calpain activates m-calpain. *Journal of Biological Chemistry*. 271 (52), 33161-33164.

Tompa P., Emori Y., Sorimachi K., Suzuki Y. et Friedrich P. (2001). Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 280, 1333-1339.

Tonello C. (1998). Applications des hautes pressions en agroalimentaire. *Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés*. F 3 220, 14 p.

Totland G.K., Kryvi H. et Slinde E. (1988). Composition of muscle fibre types and connective tissue in bovine *M. semitendinosus* and its relation to tenderness. *Meat Science*. 23 (4), 303-315.

Tsuji S. et Imahori K. (1981). Studies on the Ca^{2+} -activated neutral proteinase of rabbit skeletal muscle. I. The characterization of the 80 K and the 30 K subunits. *Journal of Biochemistry*. 90 (1), 233-240.

U

Uytterhaegen L., Claeys E. et Demeyer D. (1994). Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *Journal of Animal Science*. 72, 1209-1223.

V

Van Leeuwen J.L. (1999). A mechanical analysis of myomeres shape in fish. *Journal of Experimental Biology*. 202, 3405-3414.

Veiseth S.D., Wheeler S.T.L. et Koochmaraie M. (2001). Effect of postmortem storage on μ -calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*. 79, 392-397.

Verrez-Bagnis V., Ladrat C., Noel J. et Fleurence J. (2002). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) by an endogenous m-calpains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82, 1256-1262.

Verrez-Bagnis V., Ladrat C., Morzel M., Noel J. et Fleurence J. (2001). Protein changes in post mortem sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle monitored by one- and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 22, 1539-1544.

W

Weingand-Ziadé A., Renault F. et Masson P. (1997). Combined pressure heat-induced inactivation of butyrylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1340 (2), 245-252.

Whipple G. et Koochmaraie M. (1991). Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. *Journal of Animal Science*. 69, 4449-4460.

Y

Yates L.D. et Greaser M.L. (1983). Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. *Journal of Molecular Biology*. 168 (1), 123-41.

Yoshizawa T., Sorimachi H., Tomioka S., Ishiura S. et Suzuki K. (1995). Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 208 (1), 376-383.

Yoshimura N., Kikuchi T., Sasaki T., Kitahara A., Hatanaka M. et Murachi T. (1983). Two distinct Ca^{2+} proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 258 (14), 8883-8889.

Yamashita M. et Konagaya S. (1992). Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57 (10), 1923-1926.

Z

Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E. et Ouali A. (1996). Predicting variability of ageing and toughness in beef M. *Longissimus lumborum* et *thorasis*. *Meat Science*. 43, 321-333.

Zhang W. et Mellgren R. L. (1996). Calpain Subunits Remain Associated during Catalysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 227(3), 890-896.

Articles & Communications

Articles & Communications

Articles acceptés

Chéret R., Chapleau N., Delbarre-Ladrat C., Verrez-Bagnis V. & de Lamballerie-Anton M. (2005). Effects of high-pressure on texture and microstructure of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) fillets. *Journal of Food Science*. 70 (8), 477-483.

Chéret R., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie-Anton M. & Verrez-Bagnis V. (2005). High-pressure effects on the proteolytic enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) fillets. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53 (10), 3969-3973.

Chéret R., Hernández-Andrés A., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie M. & Verrez-Bagnis V. Protein and proteolytic activity changes during refrigerated storage in sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) muscle after high-pressure treatment. Accepté dans *European Food Research and Technology*.

Delbarre-Ladrat C., Chéret R., Taylor R. & Verrez-Bagnis V. Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. Accepté dans *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Lamballerie-Anton (de) M., Perron J., Jung S. & Chéret R. (2003). High-pressure effect on the reaction between cathepsin D and bovin myofibrils. *An International Journal of Food Science and Technology*. 23 (1), 168-171.

Articles soumis

Chéret R., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie-Anton M. & Verrez-Bagnis V. Comparison of proteolytic enzyme activities in fish and meat muscle. Soumis dans *Food Chemistry*.

Communications par poster

Chéret R., Delbarre-Ladrat C., Verrez-Bagnis V. & de Lamballerie M. Influence of high pressure processing on the calcium-dependent proteolytic system calpain-calpastatin in FISH muscle. Trends in High Pressure Protein Sciences European COST D30 workshop, Montpellier, Septembre 2005.

Lamballerie-Anton (de) M., Chéret R. & Chapleau N. Effect of high-pressure on sea bass texture. IFT Annual Meeting, New Orleans, États-Unis, Juillet 2005.

Chéret R., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie-Anton M. & Verrez-Bagnis V. Caractérisation des mécanismes proteolytiques dans le muscle de Bar (*Dicentrarchus labrax L.*).

10^{èmes} Journées des « Sciences du Muscle et Technologies de la Viande », Rennes, Septembre 2004.

Chéret R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton M. & Verrez-Bagnis V. Effet des hautes pressions sur l'activité *post-mortem* des calpaïnes et des cathepsines de muscle de poisson. 3^{èmes} Colloque « Protéolyse cellulaire » Châtel-Guyon (Puy de Dôme), Avril 2004.

Chéret R., Delbarre-Ladrat C., Verrez-Bagnis V. & de Lamballerie-Anton M. Influence of high pressure processing on sea bass muscle enzymatic proteolysis. HPBB 2004, Rio de Janeiro, Brésil, Octobre 2004.

Lamballerie (de) M., Chéret R., Jung S. & Chapleau N. Effect of high pressure on colour of muscle food (fish and meat). EHPRG, Lausanne, 2004.

Lamballerie-Anton (de) M., Perron J., Jung S. & Chéret R. Effet des hautes pressions sur la réaction entre la cathepsine D et les myofibrilles bovines, 9^{èmes} Journées des « Sciences du Muscle et des Technologies de la Viande », Clermont-Ferrand, 2002.