



Impact des procédés de transformation sur le devenir digestif des protéines de la viande

Marie-Laure Bax

► **To cite this version:**

Marie-Laure Bax. Impact des procédés de transformation sur le devenir digestif des protéines de la viande. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. <NNT : 2012CLF1MM05>. <tel-01124040>

HAL Id: tel-01124040

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01124040>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Blaise Pascal

Année : 2012-2013



UdA | Université d'Auvergne

Université d'Auvergne

N° d'ordre :

**ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

N° d'ordre :

THÈSE

Pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialités : NUTRITION-BIOCHIMIE

Présentée et Soutenue le
13 Juin 2012

Marie-Laure BAX

**Impact des procédés de transformation sur le devenir digestif
des protéines de la viande**

Directeurs de thèse : Véronique SANTÉ-LHOUELIER & Didier RÉMOND

Président :	Yves BOIRIE	PU-PH, Université Clermont 1, UNH, Clermont-Fd
Rapporteurs :	Valérie MICARD Didier DUPONT	Professeur, IATE, SupAgro, Montpellier Directeur de Recherche, STLO, Rennes
Membres :	Agnès MARSSET-BAGLIERI Véronique SANTÉ-LHOUELIER Didier RÉMOND	Maître de Conférences, PNCA, AgroParistech, Paris Chargée de Recherches, QuaPA, Clermont-Fd Chargé de Recherches, UNH, Clermont-Fd

INRA Clermont-Ferrand/Theix

Unités Nutrition Humaine & Qualité des Produits Animaux
63122 SAINT GENÈS CHAMPANELLE



**ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

N° d'ordre :

THÈSE

Pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialités : NUTRITION-BIOCHIMIE

Présentée et Soutenue le
13 Juin 2012

Marie-Laure BAX

**Impact des procédés de transformation sur le devenir digestif
des protéines de la viande**

Directeurs de thèse : Véronique SANTÉ-LHOUELIER & Didier RÉMOND

Président :	Yves BOIRIE	PU-PH, Université Clermont 1, UNH, Clermont-Fd
Rapporteurs :	Valérie MICARD Didier DUPONT	Professeur, IATE, SupAgro, Montpellier Directeur de Recherche, STLO, Rennes
Membres :	Agnès MARSSET-BAGLIERI Véronique SANTÉ-LHOUELIER Didier RÉMOND	Maître de Conférences, PNCA, AgroParistech, Paris Chargée de Recherches, QuaPA, Clermont-Fd Chargé de Recherches, UNH, Clermont-Fd

INRA Clermont-Ferrand/Theix

Unités Nutrition Humaine & Qualité des Produits Animaux
63122 SAINT GENÈS CHAMPANELLE

Remerciements

Je remercie en premier lieu les membres de mon jury de thèse, *Monsieur Yves Boirie*, Professeur à l'Université d'Auvergne et responsable de l'équipe Nutrition, Métabolismes et Masse Musculaire, d'avoir accepté d'assurer la présidence de ce jury de thèse. *Madame Valérie Micard*, Professeur dans l'Unité Ingénierie des Agro-polymères et des Technologies Émergentes à SupAgro de Montpellier et *Monsieur Didier Dupont*, Directeur de recherche et responsable de l'équipe Bioactivité et Nutrition de l'Unité Science et Technologies du Lait et de l'Œuf de l'INRA de Rennes d'avoir acceptés d'évaluer mon travail, et également *Madame Agnès Marsset-Baglieri*, Maître de Conférences dans l'Unité Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire à AgroParistech, d'avoir acceptée de participer à cette soutenance et d'examiner ce travail.

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein de deux unités de recherche de l'INRA Clermont-Ferrand/Theix. Je tiens donc à remercier *Monsieur Jean-Pierre Renou*, Directeur de l'Unité Qualité des Produits Animaux jusqu'à la fin de l'année 2011 et *Monsieur Alain Kondjoyan* ayant assuré la relève depuis cette année et également *Monsieur Jean-Michel Chardigny*, Directeur de l'Unité Nutrition Humaine pour m'avoir accueillie dans leurs unités. Ainsi que la région Auvergne, les Fonds Européen de Développement Régional et l'INRA pour avoir assurés le financement de cette thèse.

Je désire exprimer mes plus sincères remerciements à *Madame Véronique Santé-Lhoutellier* et *Monsieur Didier Rémond*, mes directeurs de thèse, sans qui ce projet n'aurait pas pu être réalisé. Merci pour votre encadrement, votre patience (il en fallait...) et votre disponibilité à mon égard. Trois manière de penser et de travailler mais nous avons toujours réussi à nous entendre. Toujours à l'écoute, nos discussions m'ont été très enrichissantes. *Véronique*, tu m'as fait découvrir l'univers des protéines, leurs modifications et leurs digestions *in vitro* mais aussi voyager, Pornichet et la Corée du Sud il me reste de bons souvenirs. *Didier*, la nutrition, les contenus digestifs et les acides aminés m'ont dévoilé un peu de leur secret... Avec toi deux gros challenges, le premier a été la découverte et surtout l'apprivoisement des miniporcs, ce ne fut pas évident avec toutes mais tu as su me conseiller pour que je réussisse à effectuer mes prélèvements et le deuxième la communication en Italie, j'ai jamais autant stressée! Grâce à vous deux, j'ai pu avoir une vision globale allant presque du «producteur au consommateur»! J'espère avoir été digne de la confiance que vous m'avez accordée. Par ces quelques mots, je vous adresse un énorme MERCI!

J'ai eu la chance de travailler dans deux équipes de recherche qui m'ont extrêmement bien accueillies et dans lesquelles j'ai passé de très bons moments.

Je commencerai par remercier l'équipe **Biochimie et Protéines du Muscle** :

Philippe, pour avoir répondu à toutes mes questions, pour les discussions que l'on a pu avoir et pour avoir bien voulu partagé ton bureau avec moi.

Laurent, le roi de la digestion, merci pour ton aide, ta patience lors des mises au point, ta bonne humeur, les piques que l'on a pu s'envoyer vont me manquer, c'était de bonne guerre...

Claude, notre maman du labo, toujours présente et disponible pour nous aider, nous conseiller dans tous les domaines. Merci.

Thierry, merci de m'avoir guidé sur les chemins de la protéomique, malgré des échantillons un peu récalcitrants, tu m'as aidé à y venir à bout.

Sylvie, merci pour ta disponibilité, pour tes conseils et ton aide pour la réalisation des gels.

Merci aussi à *Yvette, Pierrot* pour la bonne humeur que vous apportez.

Au niveau de la plateforme protéomique, je voudrai remercier *Christophe* et *Didier* pour avoir pu traiter mes résultats malgré les délais courts que je vous ai imposé.

Jean-Dominique, merci pour votre aide et la mise au point des calculs des paramètres de digestion, et pour m'avoir fait connaître un peu mieux les astuces d'Excel.

Une pensée aussi à tous les autres membres de l'unité QuaPA, tous ceux et celles dont j'ai croisé la route, l'ex-équipe M2H, *Jean-Michel* pour les soucis informatiques, *Pascal, Nathalie, Frédéric* pour m'avoir fait découvrir le sniffing sans oublié *Jean-Louis* (Bort-les-Orgues reste un très bon souvenir) merci à tous.

Je voudrai aussi remercier tous les membres de l'équipe **Nutrition, Métabolismes et Masse Musculaire**, et plus particulièrement l'ancienne équipe Nutrition et Signaux Protéiques,

Dominique, pour l'accueil dans l'équipe et ta présence.

Caroline, merci pour ton aide, tes conseils et ta disponibilité pour les journées de prélèvements et toutes les analyses qui ont suivies.

Noureddine, merci pour les analyses d'acides aminés, pour ta bonne humeur, pour avoir partagé ton bureau et m'avoir supportée (et *vice versa*).

Isabelle A., merci pour ton aide, pour ta présence et pour nos discussions. Et au fait, il est trop beau mon schéma!!!

Marie-Agnès, merci pour ta présence et ta jovialité.

Je tiens aussi à remercier tous les autres membres de l'équipe pour leur soutien et tous les bons moments passés ensemble, *Claire, Fabienne, Michelle, Françoise, Laurent, Isabelle P., Carole,...*

Je voudrai aussi remercier ceux qui m'ont permis de réaliser l'expérimentation animale,

L'équipe de l'Intrabois : *Pascal, Joan,...* de vous être occupés de ma petite vèle Bichette.

L'équipe de l'Unité Expérimentale : *Christophe*, responsable de l'Installation Expérimentale de Nutrition.

Benoît, un grand merci pour t'être occupé si bien de mes 6 petites protégées (Mirabelle, Noisette, Olive, Prune, Quetsche et Rhubarbe), pour ta bonne humeur, je ne sais pas si je devrai te remercier pour en avoir énervé quelques unes avant que j'aie fait les prélèvements. Une ne m'aimait pas tu l'as bien vu! Merci pour tout!

Merci aussi à *Philippe* et *Denys* pour les opérations.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de mon comité de thèse *Monique Alric, Claire Gaudichon, Marie de Lamballerie, Jean-Paul Lallès* et *Saïd Bouhallab* pour avoir permis de faire évoluer ce travail.

Un merci particulier aussi à *Claire* pour avoir réalisée les mesures d'enrichissement.

Merci aussi à l'ensemble des *participants du projet ANR PRONUTRIAL*, qui m'ont permis de prendre plus de recul sur mon travail et d'avoir une vue plus globale.

Je souhaiterai remercier aussi *Anne* pour m'avoir permis de lyophiliser non sans mal mes échantillons et *Hélène* d'avoir partagé l'AAS pour doser le chrome.

Vue du « Sud », Clermont-Ferrand n'a pas forcément une très bonne image, avant d'arriver on m'avait dis « ah oui il fait froid là-haut », « il y a beaucoup de neige », « c'est noir la ville, il n'y a pas grand-chose à voir, à faire, sauf si tu aimes les randonnées », « c'est un coin perdu »... ça ne motive pas tout ça. Il y a aussi des couleurs fétiches "**JAUNE** et **BLEU**" (ça change du "**ROUGE** et **NOIR**").... Et puis il faut se faire au parler Auvergnat, Yaka'y mettre des y partout pour s'y faire comprendre....

Mais une fois arrivée, on se rend vite compte que cela n'est pas si terrible que ça et cela c'est grâce aux belles rencontres que j'ai pu faire, notamment un groupe d'amis formidables sans qui tout aurait été différent. Voilà ce que j'ai gagné et qui font que ces 3 années resteront gravées à jamais.

Aurélie, ma siamoisette comme disaient certains,... C'est vrai que l'on était souvent ensemble lorsque j'étais à BPM, mais même après. Tu es entière, tu as toujours été là pour moi, de nombreuses discussions, confessions, des moments d'évasion quand tu m'embarquais voir Pin-up. Ta présence quasi quotidienne m'a apporté beaucoup. Je ne te remercierai jamais assez.

Manu, tu m'as fait traverser la France pour aller dans le Nord! Grâce à toi, je connais quelques bonnes spécialités lorraines... Ta présence à mes côtés m'a permis de toujours aller de l'avant. Merci énormément.

Hugues, que dire sur toi, qu'est ce que tu m'en as fait baver! Toujours à vouloir m'enlever de mon pays des Bisounours... J'ai tenu bon et je ne le regrette pas merci pour toutes les discussions que l'on a eues. Tes coups de gueule m'ont bien fait rire. Je dois être maso mais ça va me manquer.

Je pense aussi à *Jérôme* (le pro des montages photo, de bons fous rires et des photos collectors!! Toujours présent et toujours disponible), *Laureen* (ma petite boxeuse, j'ai essayé de te suivre 2-3 fois à la course mais ma condition sportive ne me l'a pas trop permise ☺), merci pour les concerts de l'Harmonie de Cébazat), *Émilie* (ta jovialité fait du bien, merci pour les soirées déguisées...!), *Jeanne et Arnaud* (toujours fidèles au poste, merci pour votre présence et votre bonne humeur), *Sophie* (déjantée mais tellement adorable que de bons souvenirs), *Cyril et Magalie* (merci pour toutes ces soirées), *Souley* (la chaleur de la Côte d'Ivoire est en toi, tu es unique, ne changes pas, nos discussions vont me manquer), *Laure* (rando, jeux? présente!), *Jérémy* (le «chicoteur», qui reste désormais dans notre vocabulaire courant), *Renata* (avec toi, découverte du Brésil, merci pour ta présence), *Guilhem* (mon acolyte sudiste, je ne t'ai pas épargné mais merci de ta présence et ton soutien),... le groupe de folie!!! Merci pour votre amitié, pour toutes les soirées, les randonnées,... que l'on a pu faire, certaines ont laissé des souvenirs mémorables...

Je retiendrai aussi le match de rugby où vous avez réussi à me faire aller voir l'ASM mais bon sans rancune. "Stade Toulousain un jour, stade toulousain toujours"! (Et oui, jusqu'au bout!)

Vous êtes tous adorables, il est dur de trouver un petit mot pour chacun, mais sachez que j'espère de tout cœur que l'on ne se perdra pas de vue. Nous avons toujours su nous serrez les coudes, toujours s'entraider et surtout se défouler. De nombreux fous rires, et l'envie de dire oui finalement l'Auvergne c'est bien et je suis fière d'y être venue et de vous avoir rencontrés.

J'ai une pensée aussi pour ceux et celles qui m'ont aussi laissé de bons souvenirs au cours de ces années que ce soit au cours d'une thèse, d'un CDD, d'un stage ou autre, *Florian et Maxime* (nos consanguins, qu'est ce que l'on a bien rigolé avec vous deux!), *Benoist, Elena, Laure, Laurie, Solange, Justine, Elodie, Maud, Nathalie, Lamia, Émilie P.* (Merci pour la relecture et la correction), *Anne*,...

Je m'excuse par avance pour les personnes que j'aurai, par mégarde, oubliées de remercier.

Remerciements

Je vais m'éloigner de l'Auvergne, pour remercier mes 3 amis de longue date : *Alex, Jessie et Mickael*. Malgré ces 3 années où nous nous ne sommes pas beaucoup vus, nous avons toujours réussi malgré tout à ne pas se perdre et je vous dois beaucoup.

Alex, presque 20 ans que notre amitié dure, tu es comme une sœur pour moi et tu es toujours là. Merci pour cette présence, ce soutien, ainsi que pour *Charly*, mon neveu d'adoption et l'immense honneur que tu me fais pour 2013, à mon tour d'être à tes côtés!

Jessie après Toulouse, tu t'es attaquée à Paris, merci pour ta présence, pour m'avoir fait visiter la capitale et pour Yannick et Mickey!!

Mickael, mon autre attache toulousaine, merci pour m'avoir hébergé lors de mes descentes sur Toulouse et les soirées, tu es aussi venu me voir, j'ai toujours pu compter sur toi.

Et merci à vous deux d'être venus me soutenir jusqu'au bout de cette «aventure».

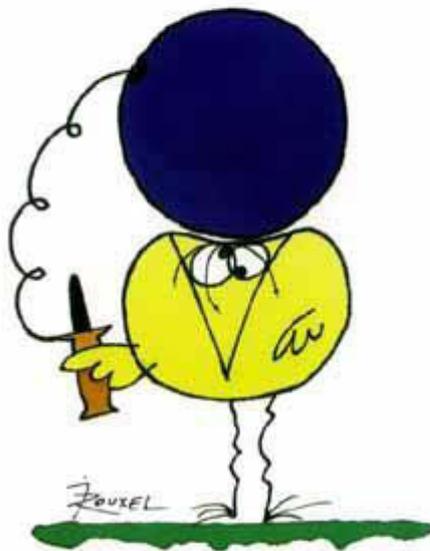
Pour finir, ces dernières lignes vont à ma famille, mes *parents, mes sœurs, mon beau frère* et surtout mon petit ange, *mon filleul* pour tout le soutien et les encouragements que vous m'avez apportés durant ces trois années, malgré la distance. Merci de m'avoir toujours suivi dans mes choix et d'avoir toujours été présents.

Je vous dédie ce manuscrit...

Certains mettent des phrases de grands philosophes
ou chercheurs...

Cette devise m'a suivie tout au long de la thèse...

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Impact des procédés de transformation sur le devenir digestif des protéines de la viande

En France, la consommation de viande représente 1/3 des apports protéiques totaux. Les protéines carnées apportent tous les acides aminés indispensables, en quantité équilibrée par rapport aux besoins de l'Homme. La viande étant également une bonne source de vitamine B12 et de fer, son potentiel nutritionnel est très élevé. Ce potentiel pourrait cependant être modulé 1) par une digestion des protéines plus ou moins complète dans l'intestin grêle (digestibilité), déterminant la quantité d'acides aminés absorbés, 2) par une vitesse de digestion plus ou moins élevée, influençant la capacité d'assimilation des acides aminés absorbés. Les procédés de transformation impliqués dans la préparation des viandes peuvent générer des modifications physicochimiques des protéines. Leurs conséquences sur la mise à disposition des acides aminés constitutifs (quantité, cinétique) ont été peu étudiées.

Après avoir déterminé l'impact des opérations unitaires de transformation de la viande (maturation, hachage, cuisson) sur les caractéristiques biochimiques et structurales des protéines, les conséquences sur les paramètres de digestion ont été étudiées, *in vitro*, sur des extraits myofibrillaires, et *in vivo* en utilisant le miniporc comme modèle animal.

L'approche protéomique est utilisée, en parallèle, pour comparer la composition de muscles de porcs issus de modes d'élevage différents et étudier les corrélations avec la digestion. Plusieurs marqueurs protéiques des paramètres de digestion *in vitro* sont trouvés sur la viande maturée et cuite, et sont liés au processus de détoxification et de contraction musculaire.

La cuisson est le procédé qui a le plus d'impact sur les caractéristiques du produit prêt à consommer, l'application de températures croissantes (70, 100 et 140°C) se traduisant par une combinaison progressive de dénaturation, d'oxydation puis d'agrégation des protéines. Le développement d'un modèle de digestion *in vitro* (pepsine seule ou couplée à la trypsine/ α -chymotrypsine), sur des protéines myofibrillaires, a permis d'étudier les différents paramètres de digestion (vitesse initiale, vitesse maximale, temps d'obtention de la vitesse maximale, temps de demi-vie et dégradation maximale) pour les différents procédés. Maturation et hachage ont eu peu d'effets sur ces paramètres. Par contre, par rapport à la viande crue, la vitesse de digestion est supérieure pour une température de cuisson de 70°C, ce qui n'est plus le cas à partir de 100°C. Inversement le potentiel de dégradation maximale est plus élevé pour des températures supérieures à 100°C. La mise en relation des caractéristiques de la viande, avec les paramètres de digestion, suggère que pour des températures de cuisson de l'ordre de 70°C, la dénaturation des protéines favorise une dégradation rapide des protéines en accroissant l'accessibilité des sites de coupure pour les enzymes digestives, mais que pour des températures supérieures, l'oxydation conduit à des agrégats qui limitent cette accessibilité. L'étude *in vivo*, sur le miniporc, a confirmé cette hypothèse, la vitesse d'apparition des acides aminés dans le sang, suite à l'ingestion des viandes étant supérieure pour une température de cuisson à cœur de 75°C, par rapport à des cuissons à 60 ou 95°C. Par contre contrairement à ce qui était observé *in vitro*, l'utilisation de viande marquée avec un isotope stable (^{15}N), nous a permis de montrer que la température de cuisson n'affecte pas la quantité totale de protéines digérées dans l'intestin grêle (environ 95% des protéines ingérées).

En conclusion, parmi les opérations unitaires impliquées dans la préparation des viandes, la cuisson semble être celle qui influence le plus la digestion des protéines. L'équilibre entre les processus de dénaturation et d'oxydation des protéines en fonction de la température de cuisson semble être un point clé dans la détermination de la vitesse de digestion des protéines. Ce paramètre est important notamment dans le cadre de la nutrition des personnes âgées. Par contre, les compensations au cours des étapes de la digestion font que ces différences de vitesses ne se traduisent pas par des différences de digestibilité dans l'intestin grêle.

Mots clés: vitesse de digestion, digestibilité, procédés de transformation, viande, oxydation, agrégation.

Impact of technological treatments on digestive future of meat proteins

In France, meat consumption represents one third of the total protein intake. Meat proteins have a high content of well-balanced essential amino acids near to Human needs. Meat is also a good source of vitamins B12 and iron. Its nutritional potential is thus very higher, but it could be modulated 1) by a protein digestion in the small intestine more or less complete (digestibility), determining the amount of absorbed amino acids, 2) by a speed of digestion higher or lower, affecting the postprandial utilization of absorbed amino acids in protein metabolism. Technological treatments involved in the meat preparation can generate physical-chemical changes of protein. Their impacts on the availability of constitutive amino acids (quantity, kinetics) have been little studied.

After determining the impact of unitary operations on meat processing (aging, mincing, cooking) on the biochemical and structural characteristics of proteins, the effect on digestion parameters were studied *in vitro* on myofibrillar extracts, and *in vivo* using the minipig as an animal model.

The proteomic approach is used in parallel to compare the composition of pig muscles from different rearing methods and study the correlations with digestion. Several protein markers of *in vitro* digestion are found for both aged and cooked meat, linked to detoxicant process and muscle contraction.

The cooking is the process that has the greatest impact on characteristics of “ready-to-eat” product, the application of increasing temperatures (70, 100 and 140°C) resulting in a progressive combination of denaturation, oxidation and then of protein aggregation. Development of an *in vitro* digestion model (pepsin alone or coupled with trypsin/ α -chymotrypsin), on myofibrillar proteins, was used to study the various parameters of digestion (initial slope, maximum rate, time to maximal rate, half-life time and maximal degradation) for the different processes. Aging and mincing have little impacts on these parameters. However, compared to raw meat, the rate of digestion is higher for a cooking temperature to 70°C, which is no longer the case for temperatures above 100°C. Conversely, the potential of maximal degradation is higher for temperatures above 100°C. Linking characteristics of meat with digestion parameters, suggests that for cooking temperatures of around 70°C, denaturation of proteins promotes rapid degradation of proteins by increasing the accessibility of digestive enzymes to their cutting sites, but for higher temperatures, oxidation leads to aggregates that limit accessibility.

In vivo study on the minipig, confirms this hypothesis, the rate of appearance of amino acids in the blood following meat ingestion is higher with a core cooking temperature to 75°C, compared to cooking with 60 or 95°C. Furthermore, contrary to what observes *in vitro*, the use of meat labeled with a stable isotope (^{15}N), we show that the cooking temperature are not affect the total amount of digested proteins in the small intestine (about 95% of ingested proteins).

In conclusion, among the unitary operations involved in the preparation of meat, the cooking seems to be the one that most influence the digestion of proteins. The balance between the denaturation processes and protein oxidation according to the cooking temperature appears to be a key point in determining the speed of proteins digestion. This parameter is particularly important in the context of elderly nutrition. As it does not impact on the protein digestibility in the small intestine, the cooking temperature appears as an interesting lever to modulate the speed of meat protein digestion, according to the targeted consumer.

Key words: rate of digestion, digestibility, technological treatments, meat, oxidation, aggregation.

Listes des valorisations

Articles

Bax M-L., Aubry L., Ferreira C., Daudin J-D., Gatellier P., Rémond D., Santé-Lhoutellier V., **Cooking temperature is a key determinant of *in vitro* meat protein digestion rate : Investigation of underlying mechanisms**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (10), **2012**, 2569-2576.

Bax M-L., Sayd T., Aubry L., Ferreira C., Viala D., Chambon C., Rémond D., Santé-Lhoutellier V. **Muscle composition slightly affects *in vitro* digestion of aged and cooked meat: Identification of associated proteomic markers**. Food Chemistry, 136, **2013**, 1249-1262.

Bax M-L., Buffière C., Hafnaoui N., Gaudichon C., Santé-Lhoutellier V., Rémond D., **The speed, but not the efficiency, of protein digestion in the small intestine is modulated by meat cooking temperature**. Journal of Nutrition, (en préparation).

Articles en association

Kajak-Siemaszko K., Aubry L., Peyrin F., Bax M-L., Gatellier P., Astruc T., Przybylski W., Jaworska D., Gaillard-Martinie B., Santé-Lhoutellier V., **Characterization of protein aggregates following a heating and freezing process**, Food Research International, 44 (10), **2011**, 3160-3166.

Promeyrat A., Bax M-L., Traoré S., Aubry L., Santé-Lhoutellier V., Gatellier P., **Changed dynamics in myofibrillar protein aggregation as a consequence of heating time and temperature**, Meat Science, 85 (4), **2010**, 625–631.

Communications orales

Bax M-L., Buffière C., Hafnaoui N., Gaudichon C., Aubry L., Santé-Lhoutellier V., Rémond D., **Effect of meat cooking temperature on the protein digestion rate and the small intestinal digestibility of proteins in minipigs**, *1st International Conference on Food Digestion*, 19-21 Mars **2012**, Cesena, Italy.

Bax M-L., Aubry L., Ferreira C., Daudin J-D., Gatellier P., Rémond D., Santé-Lhoutellier V., **Impact des procédés de transformation sur la qualité nutritionnelle des protéines carnées**. Journée Scientifique des doctorants de l'UNH, 24 Mai **2011**, Clermont-Ferrand.

Bax M-L., Aubry L., Ferreira C., Daudin J-D., Gatellier P., Rémond D., Santé-Lhoutellier V., **Impact des procédés de transformation sur la qualité nutritionnelle des protéines carnées**. Journées de l'école doctorale SVS EA, 21-22 Avril **2011**, Clermont-Ferrand.

Bax M-L., Aubry L., Gatellier P., Rémond D., Santé-Lhoutellier V., **Paramètres de digestion *in vitro* des protéines carnées**, 13^{èmes} Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, 19-20 Octobre **2010**, Clermont-Ferrand. Les textes sont publiés dans le numéro hors-série de la revue "VIANDES & PRODUITS CARNES" p33-34.

Chapitres de livre en association (en cours)

Dans : Fardet A., Souchon I., Dupont D. (Coords) **Impact/rôle de la structure physique des produits alimentaires sur leur devenir digestif et les effets métaboliques et nutritionnels associés** (sous presse). Éditions Quae.

Santé-Lhoutellier V., Bax M-L., Peyron M-A., Rémond D., **Le devenir digestif des matrices animales de type viande.**

Rémond D., Bax M-L., Buffière C., Savary-Auzeloux I., **Étude du devenir digestif des aliments : Utilisation des modèles animaux.**

Posters

Santé-Lhoutellier V., Bax M-L., Sayd T., Aubry L., Chambon C., Astruc T., Rémond D., **Protein biomarkers of *in vitro* digestion parameters of raw and cooked meat.** *Food Structure Digestion and Health*, 7-9 Mars **2012**, Palmerston North, New-Zealand.

Bax M-L., Aubry L., Ferreira C., Gatellier P., Sayd T., Rémond D., Santé-Lhoutellier V., ***In vitro* pepsin rate of digestion increased by heating : associated proteomic markers**, 56th *International Congress of Meat Science and Technology*, 15-20 Août **2010**, Jeju, Korea.

Sommaire

LISTES DES VALORISATIONS	I
SOMMAIRE	V
TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	XIII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	3
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. DU MUSCLE À LA VIANDE	9
I.A. LE MUSCLE : STRUCTURE, FONCTION ET COMPOSITION	9
I.A.1) Structure	11
I.A.2) Fonction	13
I.A.3) Composition	15
I.B. MODIFICATIONS MÉCANIQUES ET BIOCHIMIQUES DU MUSCLE <i>POST MORTEM</i>	23
I.B.1) Modifications mécaniques et réactions énergétiques <i>post mortem</i>	23
I.B.2) Défauts de qualité de viande liés au métabolisme musculaire <i>post mortem</i>	27
I.B.3) Modifications biochimiques au cours de la maturation	29
II. IMPACT DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES SUR LES STRUCTURES MACRO ET MICROSCOPIQUES	33
II.A. MODIFICATIONS DE STRUCTURE - DÉNATURATION	37
II.A.1) Au niveau intracellulaire	37
II.A.2) Au niveau de la matrice extracellulaire	39
II.B. MODIFICATIONS CHIMIQUES - OXYDATION	41
II.B.1) L'oxydation des lipides	41
II.B.2) L'oxydation des protéines	45
II.C. AGRÉGATION PROTÉIQUE.....	49
II.C.1) Les mécanismes.....	51
II.C.2) Les interactions mises en jeu	51
III. QUALITÉS NUTRITIONNELLES DE LA VIANDE	55
III.A. PLACE DE LA VIANDE DANS NOTRE ALIMENTATION	57
III.A.1) Les principales caractéristiques nutritionnelles.....	57

III.A.2) La place de la viande dans une alimentation équilibrée	61
III.B. CONSOMMATION DE VIANDE ET SANTÉ	63
III.B.1) Anémie et autres carences.....	63
III.B.2) Maladies cardiovasculaires	65
III.B.3) Composition corporelle - Contrôle du poids.....	67
III.B.4) Ostéoporose.....	67
III.B.5) Viande et cancers	69
III.C. QUALITÉS NUTRITIONNELLES DES PROTÉINES DE LA VIANDE.....	75
III.C.1) Composition en acides aminés indispensables.....	75
III.C.2) Devenir digestif des protéines de la viande	77
III.C.3) Impact de la cinétique d'absorption des acides aminés sur l'assimilation des protéines de la viande	85

INTRODUCTION DE LA PARTIE 1 : IN VITRO..... 95

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES	95
I.A. LE PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	95
I.B. LES MESURES RÉALISÉES.....	97
I.C. LES MODÈLES DE DIGESTION <i>IN VITRO</i>	101
I.C.1) Les modèles expérimentaux	101
I.C.2) Les mesures obtenues.....	103
I.D. CRÉATION D'UN MODÈLE BASIQUE DE DIGESTION <i>IN VITRO</i>	105
I.D.1) Mise au point du modèle.....	105
I.D.2) Détermination des paramètres de digestion.....	107

ARTICLE 1 : LA TEMPÉRATURE DE CUISSON EST UN ÉLÉMENT CLÉ POUR LA VITESSE DE DIGESTION *IN VITRO* DES PROTÉINES DE LA VIANDE : INVESTIGATION SUR LES MÉCANISMES SOUS-JACENTS..... 109

II. SÉPARATION ET ANALYSE DES PROTÉINES MUSCULAIRES.....	131
II.A. MÉTHODES DE SÉPARATION	131
II.B. L'ANALYSE PROTÉOMIQUE.....	133

<u>ARTICLE 2 : LA COMPOSITION MUSCULAIRE AFFECTE LÉGÈREMENT LA DIGESTION <i>IN VITRO</i> DE LA VIANDE MATURÉE ET CUITE : IDENTIFICATION DES MARQUEURS PROTÉOMIQUES ASSOCIÉS. (ACCEPTÉ)</u>	137
<u>CONCLUSION DE CETTE PARTIE <i>IN VITRO</i></u>	171
<u>INTRODUCTION DE LA PARTIE 2 : <i>IN VIVO</i></u>	175
I. MESURES DE DIGESTION <i>IN VIVO</i>	175
I.A. UTILISATION DES MODÈLES ANIMAUX : CONSIDÉRATIONS PRATIQUES ET PARTICULARITÉS PHYSIOLOGIQUES ..	177
I.B. MESURES DE DIGESTIBILITÉ	181
I.B.1) Digestibilité totale - Digestibilité iléale	183
I.B.2) Digestibilité iléale réelle.....	183
II. DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	189
II.A. PRÉPARATION DES REPAS TESTS.....	189
II.A.1) Cuissons et Préparation des repas.....	191
II.A.2) Caractérisation de la viande de veau et digestions <i>in vitro</i>	193
II.A.3) Présentation d'une journée de prélèvements	195
<u>ARTICLE 3 : LA TEMPÉRATURE DE CUISSON PERMET DE MODULER LA VITESSE DE DIGESTION DES PROTÉINES DE LA VIANDE, SANS AFFECTER LEUR DIGESTIBILITÉ DANS L'INTESTIN GRÊLE. (EN PRÉPARATION)</u>	197
<u>CONCLUSION DE CETTE PARTIE <i>IN VIVO</i></u>	245
<u>DISCUSSION GÉNÉRALE</u>	249
<u>RÉFÉRENCES</u>	265
<u>ANNEXES</u>	301

Liste des abréviations

4-HHE : 4-hydroxy-2-hexenal

4-HNE : 4-hydroxy-2-nonenal

AA/ AAI : Acides Aminés/ Acides Aminés Indispensables

AGPI : Acide Gras PolyInsaturé

AGS : Acide Gras Saturé

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BBP : Bleu de BromoPhénol

Ca²⁺ : Calcium

DFD : Dark, Firm, Dry

DNPH : DiNitroPhénylHydrazine

DO : Densité Optique

ERO : Espèces Réactives à l'Oxygène

GA3PDH : Glycéraldéhyde 3-Phosphate DésHydrogénase

HCA : Amine HétéroCyclique

HSP : Heat Shock Protein

kDa : Kilo Dalton

LCn-3 PUFA : Acide Gras PolyInsaturé à Longue Chaîne n-3

MCV : Maladies CardioVasculaires

MDA : MalonDiAldéhyde

NOCs : Composés nitrosés

PAH : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

PSE : Pale, Soft, Exsudative

SDS-PAGE : Sodium DodécylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SOD : SuperOxyde Dismutase

TBA-RS : Substances Réactives à l'Acide ThioBarbiturique

Tables des illustrations

Figures

Figure 1 Structure du muscle squelettique.	10
Figure 2 Distribution des différentes protéines au sein de la fibre musculaire cardiaque.	18
Figure 3 Mécanismes d'actions des protéines chaperonnes pour le repliement de protéines dénaturées.	20
Figure 4 Structure d'un monomère de tropocollagène.	22
Figure 5 Évolution des concentrations de phosphocréatine et d'ATP en fonction de l'extensibilité du muscle après l'abattage de l'animal.	24
Figure 6 Qualités technologiques de la viande en fonction de l'évolution <i>post mortem</i> du pH musculaire.	26
Figure 7 Mécanismes plausibles par lesquels l'oxydation des protéines affecte les qualités technologiques et sensorielles de la viande.	28
Figure 8 Cycle d'auto-oxydation d'un lipide insaturé RH.	30
Figure 9 Effet d'un traitement thermique sur l'hydrophobie des protéines mis en évidence par la coloration au bleu de bromophénol sur des coupes de tissu musculaire.	38
Figure 10 Effet du chauffage sur la morphologie des fibres musculaires du <i>Rectus abdominis</i> bovin un jour <i>post mortem</i>	38
Figure 11 Schéma simplifié montrant l'interdépendance des oxydations lipidiques et protéiques.	44
Figure 12 Les principales conséquences de l'oxydation des protéines.	44
Figure 13 Évolution de la distribution des carbonyles au cours du chauffage du <i>Rectus abdominis</i> bovin avec la sonde fluorescente Cy3.	48
Figure 14 Illustration schématique de cinq mécanismes d'agrégation protéique.	50
Figure 15 Observation de myofibrilles de porc en microscopie électronique à balayage.	52
Figure 16 Mécanismes potentiels par lesquels l'hème de la viande favorise la cancérogenèse intestinale.	72
Figure 17 Positionnement de différentes sources alimentaires par rapport à la composition de la protéine de référence.	74
Figure 18 Composition en acides aminés des protéines contractiles et du collagène de bovin. ...	76

Figure 19 Relation entre les teneurs en collagène et acides aminés indispensables dans les viandes et abats de bovin 76

Figure 20 Composition en acides aminés de viandes et abats bovin se différenciant par leur teneur en collagène. 78

Figure 21 Cinétique d'apparition de la leucine dans le sang périphérique chez des personnes âgées après l'ingestion de 30 g de différentes protéines : les protéines du lactosérum, la caséine, la viande chez des sujets ayant une bonne dentition, ou porteurs d'une prothèse complète. 88

Figure 22 Relation inverse entre l'apparition de la leucine dans le sang périphérique et le degré de déstructuration du bol alimentaire dégluti, ici caractérisé par la résistance à une force de cisaillement, chez des personnes âgées ayant reçu un repas de viande bovine. 88

Figure 23 Schéma du protocole expérimental de l'étude. 96

Figure 24 Représentation des paramètres de digestion *in vitro* : Vitesse initiale, Temps de demi-vie et la dégradation maximale et l'équation mathématique servant à modéliser nos données. 106

Figure 25 Représentation de la dérivée de la courbe de cinétique, son équation et les paramètres de digestion : Vitesse maximale et le temps d'obtention de la vitesse maximale. 106

Figure 26 Exemple de séparations électrophorétiques des protéines musculaires. 130

Figure 27 Mécanisme d'action possible de la pepsine en fonction des traitements thermiques et les conséquences sur les paramètres de digestion *in vitro* 172

Figure 28 Comparaison de la physiologie digestive du rat et de l'Homme. 178

Figure 29 Représentation des flux d'azote dans le tractus digestif. 180

Figure 30 Influence de la quantité d'acides aminés alimentaires sur les mesures de digestibilités iléales apparente et réelle. 188

Figure 31 Schéma du protocole expérimental de l'étude. 190

Figure 32 Cinétiques de montée et de descente en températures à 60, 75 et 95°C des morceaux de viande et suivis des températures du bain-marie. 190

Figure 33 Schéma du déroulement d'une journée de prélèvements et les mesures réalisées... 194

Figure 34 Organisation schématique de l'ANR PRONUTRIAL et positionnement du projet de thèse 300

Tableaux

Tableau 1 Caractéristiques des différents types de fibres musculaires chez les mammifères. 12

Tableau 2 Digestibilité réelle dans l'intestin grêle de différentes protéines, chez l'Homme..... 82

Tableau 3 Données comparatives de digestibilités iléales apparentes et réelles de l'azote chez différentes espèces animales et chez l'Homme. 184

Tableau 4 Composition des repas tests. 192

Tableau 5 Résultats de la caractérisation biochimique et des paramètres de digestion *in vitro* par la pepsine seule ou couplée à la trypsine et l' α -chymotrypsine sur la viande de veau marquée..... 192

Introduction

&

Synthèse Bibliographique

Préambule

Mes recherches étaient intégrées dans le programme PRONUTRIAL (Cf. Annexes), financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR 09-ALIA-008-02). Les travaux ont été réalisés au sein de deux unités de Recherche du Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix : l'Unité Qualité des Produits Animaux et plus particulièrement l'équipe Biochimie et Protéines Musculaires dirigée par Véronique Santé-Lhoutellier qui a assuré la direction de ma première partie de thèse, et l'Unité de Nutrition Humaine et plus particulièrement l'équipe Nutrition et Signaux Protéiques dirigée par Dominique Dardevet qui a fusionné le 1^{er} Janvier 2012 avec l'équipe Adaptation Musculaire Métabolique pour former une nouvelle équipe Nutrition, Métabolismes et Masse Musculaire dirigée par Yves Boirie. Dans cette équipe, ma deuxième partie de thèse a été dirigée par Didier Rémond.

Pour réaliser ce travail de thèse j'ai bénéficié du soutien financier de la région Auvergne (50%), des Fonds Européen de Développement Régional (FEDER, 25%) et de l'INRA (Unités Nutrition Humaine et Qualité des Produits Animaux, 25%).



Introduction Générale

En France, la consommation de viande représente un tiers des apports en protéines chez les adultes. Cette proportion tend cependant à baisser avec l'âge. Les protéines carnées apportent tous les acides aminés indispensables, en quantité équilibrée par rapport aux besoins de l'Homme, ce qui leur confère, en plus de leur intérêt en tant que vecteur de vitamine B12 et de fer, un potentiel nutritionnel très intéressant. Ce potentiel peut cependant être modulé 1) par une digestion des protéines plus ou moins importante dans l'intestin grêle (digestibilité), ce qui détermine la quantité d'acides aminés absorbés, 2) par une vitesse de digestion plus ou moins élevée, ce qui influence la capacité d'assimilation des acides aminés absorbés par l'organisme du consommateur. D'autre part, l'intérêt nutritionnel des viandes pourrait également résider dans l'apport de composés bioactifs (coenzyme Q₁₀, carnosine, peptides anti-hypertensifs,...).

La préparation de la viande nécessite l'application de traitements technologiques (maturation, hachage, cuisson, salage,...) dont les impacts sur la digestibilité et la vitesse de digestion des protéines sont encore mal connus.

Dans ce contexte, mon travail de recherche a consisté à caractériser les modifications physicochimiques des protéines induites par les principaux traitements technologiques appliqués aux viandes, et en déterminer les conséquences sur leur utilisation digestive. L'hypothèse initiale de mon travail était qu'une oxydation des protéines au cours des différents traitements technologiques, induit la formation d'amas moléculaires, ou agrégats protéiques, qui limitent l'efficacité et l'accessibilité des enzymes digestives aux protéines, et affectent ainsi les paramètres de la digestion. Pour valider cette hypothèse, j'ai développé une approche simplifiée *in vitro*, permettant de suivre la dynamique de la digestion des protéines par les enzymes digestives pour un nombre important de modalités de préparation des viandes. Ensuite, j'ai utilisé une approche *in vivo*, sur le miniporc, permettant sur un nombre plus restreint de modalités, de vérifier que les effets observés *in vitro* se retrouvaient bien dans des conditions intégrant les régulations physiologiques de la digestion.

Après un point sur les connaissances actuelles de l'évolution de la fraction protéique des viandes au cours des procédés de transformation, la synthèse bibliographique présentera l'état des

connaissances sur la digestion des protéines carnées, et sur leur intérêt nutritionnel dans le cadre d'une alimentation diversifiée. Le travail expérimental sera ensuite développé en 2 parties. La première fera le lien entre la caractérisation biochimique et protéomique, les modifications physicochimiques des composants musculaires des viandes et l'activité des enzymes de la digestion dans l'approche *in vitro*. La deuxième présentera les répercussions *in vivo* de ces modifications suite à l'ingestion d'un repas complet, chez le miniporc, utilisé comme animal modèle pour l'Homme.

Synthèse Bibliographique

La viande est issue de muscles squelettiques des mammifères et des oiseaux. C'est une matrice, solide et hétérogène, complexe qui résulte d'une série de réactions biochimiques se déroulant dans les cellules musculaires dès la mort de l'animal, et dont l'amplitude et la vitesse impactent sur la fonctionnalité des protéines, et donc les qualités sensorielles, technologiques et nutritionnelles des viandes. D'un point de vue structural, la formation du complexe actomyosine (interaction actine-myosine, permettant la conversion d'énergie chimique en mécanique) se traduit par la perte de flexibilité du tissu musculaire et la rigidité des structures, une fois les réserves énergétiques épuisées. D'un point de vue biochimique, les modifications des équilibres ioniques ainsi que l'acidification du tissu musculaire *post mortem* en condition anaérobie bouleversent l'équilibre pro/antioxydant de la cellule, favorisant la génération d'espèces réactives à l'oxygène qui vont initier des réactions en chaînes d'oxydation des acides gras insaturés et des protéines. Par ailleurs, l'acidification du milieu va favoriser la libération des protéases lysosomales et leur action protéolytique, en synergie avec le système protéolytique calcium-dépendant, et ainsi initier la dégradation des protéines.

Les viandes subissent généralement un ou plusieurs traitements technologiques avant d'être consommées. Il en existe 3 grandes classes : le traitement mécanique qui consiste à fractionner le produit puis à le restructurer; le traitement chimique qui par l'action de solutés va modifier la structure et la composition du tissu; et le traitement thermique, dont les effets sur la structure et la composition sont variables selon la température et la durée ciblées. Les traitements les plus couramment utilisés sont le chauffage ainsi que l'addition de sel.

Lors des étapes de la transformation du muscle en un aliment prêt à être consommé, la macro et microstructure de la matière première est altérée en lien notamment avec les modifications physicochimiques à l'échelle moléculaire que subissent les protéines, les lipides et les micronutriments. Ces modifications de structure de la matrice carnée sont susceptibles d'influer sur le processus de mastication en bouche. L'action complémentaire, synergique ou antagoniste, de ces processus reste à évaluer *in fine*, en lien avec la bioaccessibilité des enzymes de la digestion à leurs sites de coupures. Le devenir digestif des protéines pourrait ainsi être potentiellement modifié par le mode de préparation des viandes.

La digestion *in vivo* des protéines carnées a été peu étudiée. Les rares études, chez l'Homme, montrent que l'utilisation digestive des protéines de la viande, mesurée sur l'ensemble du tractus digestif, est très élevée (97-100%; Young *et al.*, 1975; Wayler *et al.*, 1983). L'intérêt de ces mesures sur l'ensemble du tractus digestif est cependant limité. En effet, seules les protéines alimentaires digérées dans l'intestin grêle participent à la fourniture d'acides aminés pour l'organisme. L'absorption des acides aminés au niveau du gros intestin est en outre très limitée, voire inexistante, principalement en raison de l'absence d'une concentration significative en acides aminés libres, ou peptides, à l'intérieur de ce compartiment digestif. L'efficacité de la digestion dans l'intestin grêle va dépendre de l'importance de la digestion dans l'estomac. Celle-ci est en partie déterminée par l'étape de mastication, elle-même reliée à la structure de l'aliment.

Dans un premier temps, nous allons ainsi caractériser la matrice carnée par sa structure, sa composition, et l'ensemble des modifications physiques et chimiques du tissu musculaire *post mortem*, en d'autres termes, les modifications dues à la phase de maturation et aux procédés technologiques. Dans un deuxième temps, nous présenterons les qualités nutritionnelles de la viande. Cette dernière étant souvent décriée, nous verrons son rôle dans l'alimentation, un bilan sera fait sur le lien entre la consommation de viande et la santé et pour finir nous verrons les qualités nutritionnelles des protéines carnées.

I. Du muscle à la viande

I.A. Le Muscle : Structure, fonction et composition

Le muscle est l'organe responsable du mouvement et du maintien de la posture chez les vertébrés. On distingue trois types de muscles : les muscles lisses qui conditionnent la structure des organes et des viscères, le muscle cardiaque qui permet d'assurer la circulation du sang et l'apport continu d'oxygène et les muscles striés ou squelettiques qui assurent les mouvements et permettent de transformer l'énergie des nutriments en force motrice. Dans ce mémoire, nous nous intéresserons uniquement aux muscles squelettiques (Warris, 2000; Jurie et Listrat, 2010).

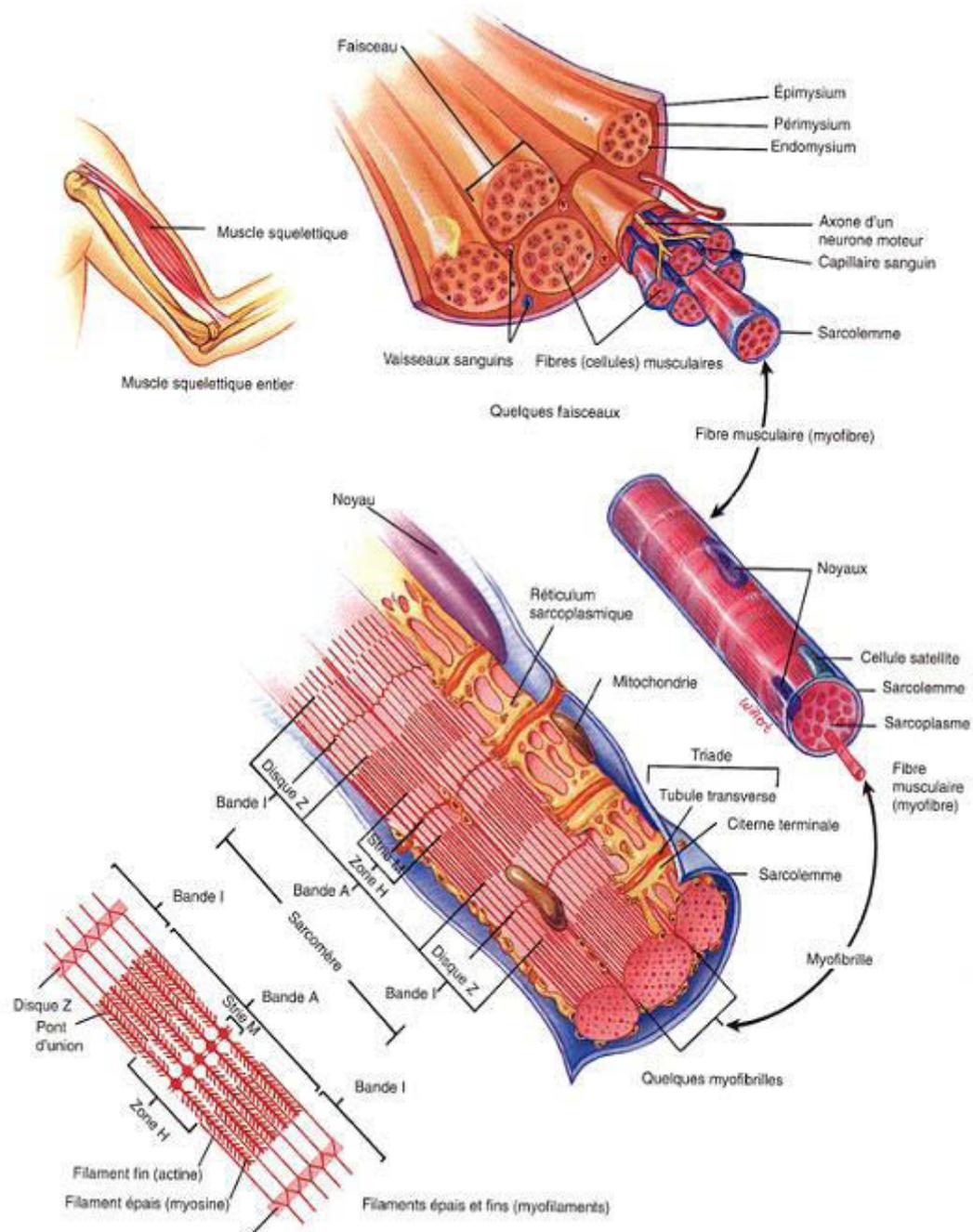


Figure 1 Structure du muscle squelettique. (Tortora et Grabowski, 1994)

I.A.1) Structure

Le muscle constitue en moyenne 40% du poids corporel total. Le muscle squelettique de mammifère (Figure 1) a généralement la forme d'un fuseau aux extrémités duquel se trouvent les tendons qui assurent l'attachement du muscle à l'os. Les tendons sont formés de tissu conjonctif (collagène) et vont permettre d'assurer le mouvement en relayant le message musculaire aux parties osseuses. Le muscle est constitué de fibres ou cellules musculaires (75-92% du volume musculaire) entourées d'une membrane, l'endomysium. Ces fibres sont assemblées en faisceaux (myofibrilles, longues structures filamenteuses alignées) maintenus par le pérимysium, eux-mêmes ceints par l'épimysium. Les fibres musculaires sont dites des cellules géantes (longues et fines) puisque leurs tailles peuvent varier de 10 à 100 µm. De plus, ce sont des cellules plurinucléées dont les noyaux sont localisés en périphérie. Elles résultent de la fusion de milliers de myoblastes (cellules souches responsables de la différenciation musculaire).

La fibre musculaire est traversée par des bandes étroites et denses, les stries Z, qui la segmentent en unités contractiles élémentaires, les **sarcomères** (Figure 1). Les deux protéines principales du sarcomère sont l'actine, constituant le filament fin, et la myosine, constituant le filament épais. Le sarcomère est borné de part et d'autre par le disque Z ainsi que de la moitié d'une bande I. Entre ces bandes I se trouve la bande A, elle-même constituée de la bande H et de la strie M. Ces différentes bandes issues de l'alignement des différents filaments (fins et épais) sont très visibles en microscopie électronique.

Quelques protéines impliquées dans ces structures :

- ✓ De la bande I à la bande A, il est retrouvé principalement les filaments d'actine formant ainsi le filament fin.
- ✓ Dans la bande A et se superposant dans la bande M se trouvent les filaments de myosine pour former le filament épais.
- ✓ De la strie Z à la bande M, se trouve la titine. Il s'agit d'une protéine élastique de plus de 3000 kDa possédant de nombreux sites de liaison aux autres protéines comme l'actine et la myosine. Elle permet d'assembler et de maintenir la structure du sarcomère.

Cependant, il existe bien d'autres protéines constituant le sarcomère et qui sont essentielles à son maintien et à son fonctionnement telles que la tropomyosine, les troponines... qui seront présentées ultérieurement dans le manuscrit.

Tableau 1 Caractéristiques des différents types de fibres musculaires chez les mammifères. (Bacou et Vigneron, 1976)

	Types de fibres musculaires		
Appellation			
Brooke et Kaiser (1970)	I	Ila	Ilb ou Iix
Ashmore et Doerr (1971)	β R	α R	α W
Peter <i>et al.</i> (1972)	Slow oxidative (SO)	Fast oxido-glycolytic (FOG)	Fast glycolytic (FG)
Physiologie			
Unité motrice	S	FR	FF
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	+++	++	+
Métabolisme	Oxydatif	Oxydo-glycolytique	Glycolytique
Morphologie			
Réticulum sarcoplasmique	+	+++	+++
Couleur	Rouge	Rouge	Blanche
Myoglobine	+++	+++	+
Densité capillaire	+++	++	+
Nombre de mitochondries	+++	+++	+
Aire de section transversale	+	+++	+++
Métabolisme énergétique			
Teneur en glycogène	+	+++	+++
Teneur en lipides	+++	+++	+
ATPase myofibrillaire	+	+++	+++
Hexokinase	+++	++	+
Phosphorylase	+	++	+++
Enzymes oxydatives	+++	++	+
Enzymes de la glycolyse	+	++	+++

I.A.2) Fonction

La fonction principale du muscle est d'assurer le maintien de la posture et la motricité de l'organisme au travers de l'alternance entre la contraction musculaire et le relâchement. Le muscle est aussi la réserve d'acides aminés utilisables par l'organisme en situation de stress ou de carences. Ce dernier point ne sera pas développé.

La **contraction** résulte du glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine, en présence d'énergie (Adénosine TriPhosphate ou ATP) et de calcium (Ca^{2+}). Suite à un stimulus nerveux il se produit un relargage d'un ion calcium qui va se lier sur la troponine C (qui en temps normal inhibe l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine) et induire un changement de conformation de cette dernière pour permettre aux têtes de myosine de se fixer aux filaments d'actine. Le raccourcissement des sarcomères est dû à un cycle de liaison-dissociation, entre l'actine et la myosine, associé à des changements de conformation de la myosine. Ce cycle nécessite de l'ATP et ne peut se dérouler qu'en présence d'une concentration élevée en calcium (au moins $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), nécessaire pour démasquer les sites de liaison de la myosine sur l'actine. Cela conduit à une rétractation du sarcomère et donc à une contraction du muscle.

Le **relâchement/décontraction** nécessite également de l'énergie et permet de retrouver l'état initial. Lorsque la concentration en calcium libre diminue, en raison de la séquestration de ce dernier par la calséquestrine, les troponines C ne vont plus être liées par le calcium et donc retrouver leur fonction inhibitrice. Les myosines vont ainsi revenir à leur position initiale.

Les muscles possèdent des caractéristiques morpho-fonctionnelles différentes (Bacou et Vigneron, 1976; Jurie et Listrat, 2010) spécifiques de leur rôle, en fonction des différents pourcentages des fibres musculaires. Ainsi, on distingue 3 grands **types de fibres** selon leur vitesse de contraction et leur métabolisme énergétique (Tableau 1) :

- ✓ Fibre de type I ou « rouge », plus efficace en métabolisme oxydatif (aérobie) particulièrement riche en myoglobine, en mitochondries, en triglycérides et en enzymes oxydatives. Ce sont des fibres à contraction lente et continue pour le maintien de la posture et pour l'endurance, elles sont fines et développées lors de la pratique du cyclisme et du VTT entre autres.
- ✓ Fibre de type IIa de couleur rouge et à métabolisme oxydo-glycolytique et plus spécifique des contractions rapides. On les retrouve chez les nageurs.

- ✓ Fibre de type IIb/IIx ou « blanche », plus efficace en métabolisme glycolytique (anaérobie) particulièrement riche en glycogène et en enzymes glycolytiques et pauvre en myoglobine et en mitochondries. Ce sont des fibres à contraction rapide produisant plus de puissance pendant de courtes impulsions, elles sont plus sensibles à la fatigue. Celles-ci sont les plus volumineuses. On les retrouve plus particulièrement chez les sprinters.

I.A.3) Composition

Le muscle est composé de 70-75% d'eau, d'environ 19-20% de protéines, de 2-6% de lipides et de 1-2% de composés solubles non protéiques (glycogène, vitamines, minéraux). Les protéines représentent, après l'eau, la portion la plus importante, elles sont riches en acides aminés indispensables et notamment en acides aminés soufrés (pour revue générale : Bottinelli et Reggiani, 2000).

Les protéines musculaires se répartissent en 3 groupes : les protéines myofibrillaires, les protéines sarcoplasmiques et celles du tissu conjonctif.

- ✓ Les **protéines myofibrillaires** et celles de la matrice extracellulaire représentent près de 2/3 du total des protéines du muscle. Les myofibrilles sont composées de protéines contractiles, régulatrices et de structure.

Les protéines contractiles :

- Chaque filament épais est constitué de 200-400 molécules de myosine (520 kDa). La myosine représente 45% des protéines myofibrillaires. Il s'agit d'une protéine hexamérique de haut poids moléculaire. Elle est composée de 2 longues chaînes lourdes (MyHC) de 200-220 kDa et de 4 courtes chaînes légères (MyLC) de 16-20 kDa. Elle possède une activité ATPasique activée en présence d'ions Ca^{2+} . Elle se fixe à l'actine pour former le complexe actomyosine. Il s'agit d'une protéine qui forme un gel pendant le chauffage, elle est donc importante au niveau de la texture, de l'aspect et de la stabilité des produits cuits (Hayakawa *et al.*, 2012).
- Le filament fin ou actine fibreuse (actine F) est formé par la polymérisation de l'actine globulaire (environ 400 molécules d'actine G, 42 kDa) en double hélice. L'actine représente environ 10% des protéines totales.

Les protéines régulatrices :

- Le complexe tropomyosine-troponine. La tropomyosine est une protéine fibreuse dimérique (composée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β d'environ 34-36 kDa chacune) logée dans le sillon du filament d'actine. Les molécules forment des filaments et sont disposées tête-bêche. Elles assurent la rigidité du filament fin et régulent l'interaction actine-myosine. Elles s'enroulent autour de celui-ci pour le stabiliser. Dans les filaments, il y a un dimère de tropomyosine tous les sept monomères d'actine.
- La tropomyosine est associée à la troponine dans les cellules musculaires striées. La troponine est une molécule composée de 3 chaînes respectivement dénommées troponine-T, troponine-I et troponine-C. Chaque chaîne possède une fonction différente; 1) la troponine-T (environ 32 kDa) est responsable de la liaison troponine-tropomyosine en présence de Ca^{2+} , permettant donc la fixation de la tête de myosine sur l'actine; 2) la troponine-I (environ 22 kDa) possède une activité inhibitrice de l'activité ATPasique de la myosine, elle empêche ainsi la liaison entre la myosine et l'actine et amorce la décontraction musculaire; 3) la troponine-C (environ 18 kDa) possède 4 sites de fixation pour le calcium qui, lorsqu'ils sont occupés, lèvent l'action inhibitrice de la troponine-I et permettent la liaison actine-myosine et donc la contraction musculaire.

(<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/contractionmuscle/contractmuscle.htm>)

- L' α -actinine est une protéine dimérique permettant la liaison entre deux filaments d'actine. Elle permet l'interaction actine-myosine.
- Les protéines C et M. La protéine C ou protéine C kinase est une protéine d'environ 140 kDa qui lie la myosine à des intervalles réguliers le long du filament épais au niveau de la région C-terminale et N-terminale. La région C-terminale permet aussi la liaison avec la titine. La protéine M et la myoméline sont des protéines de la zone M qui se lient à la M-créatine kinase, à la myosine et à la titine. Elles ont des poids moléculaires proches, à savoir 165 kDa pour la protéine M et 185 kDa pour la myoméline, mais aussi la même structure.

Les protéines responsables de la structure des myofibrilles :

Ce sont les protéines du cytosquelette qui soutiennent l'ensemble de la structure myofibrillaire et l'alignement de la strie Z des myofibrilles, et assurent le maintien de l'intégrité musculaire.

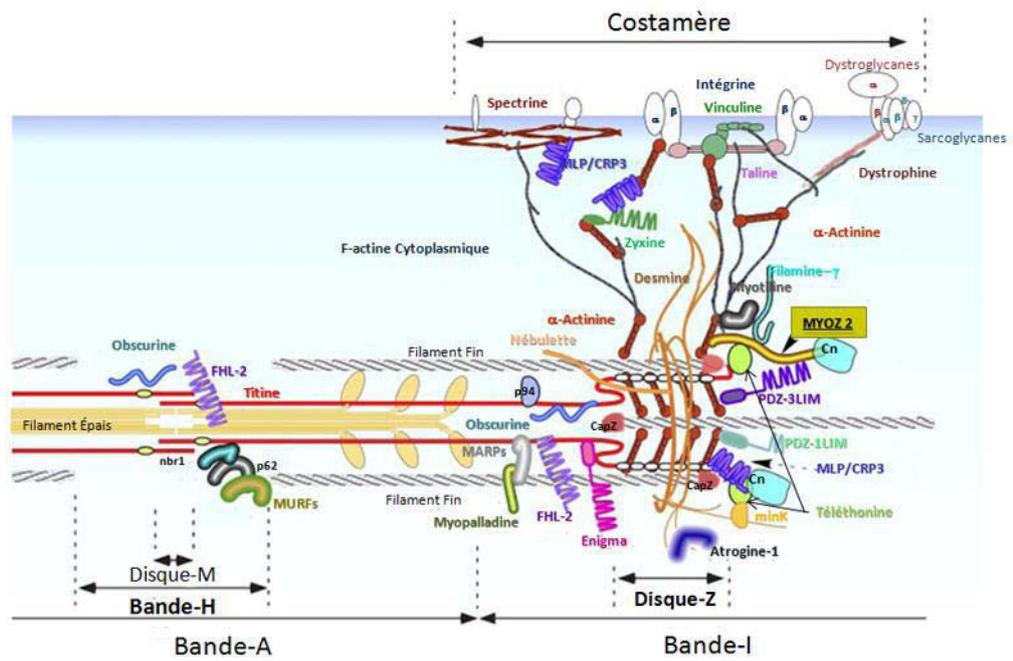


Figure 2 Distribution des différentes protéines au sein de la fibre musculaire cardiaque. (Hoshijima, 2006)

Pour assurer cette structure musculaire, un grand nombre de protéines interviennent comme le montre la Figure 2. Cette dernière présente la distribution des protéines de structure au sein d'une fibre musculaire cardiaque. Ces dernières sont sensiblement les mêmes que celles du muscle squelettique avec cependant quelques différences notamment la nébulette (116 kDa) qui correspond à la nébuline dans le muscle squelettique (775 kDa).

Elles permettent l'ancrage des myofibrilles à la membrane cellulaire ou sarcolemme (titine, nébuline, desmine, vimentine, tubuline,...).

- La titine est une protéine de haut poids moléculaire (3000 kDa), se liant à la myosine. Elle se lie aussi aux protéines de la strie Z (actinine, téléthonine, cal sarcine/calcalcineurine), à l'actine et aux protéines de la zone M. Elle est donc à l'intersection avec les liaisons des filaments fins et épais. Elle contrôle l'agencement du sarcomère et maintient la structure en interagissant avec de nombreuses protéines, en leur fournissant une certaine élasticité et en opposant une résistance à l'étirement.
- La nébuline est une protéine de 775 kDa qui se trouve au niveau de la strie Z. La partie N-terminale se projette dans la bande I et sert de modèle pour le filament fin. Elle permet la stabilisation et la polymérisation de l'actine.
- La desmine est présente au niveau de la strie Z. Elle participe à la structure du cytosquelette de la cellule en stabilisant le sarcomère au moment de la contraction musculaire.
- ✓ Les **protéines sarcoplasmiques** représentent environ un tiers des protéines, parmi lesquelles les enzymes de la voie glycolytique prédominent. Les protéines sarcoplasmiques, pour la plupart globulaires, ont des poids moléculaires compris entre 17 kDa (myoglobine) et 92,5 kDa (glycogène phosphorylase b).

Parmi les protéines majoritaires, figurent la myoglobine, protéine héminique assurant le transport de l'oxygène dans la cellule musculaire, les protéines de réserves d'énergie (créatine kinase) et les protéines chaperonnes. Il est retrouvé de nombreuses protéines intervenant dans diverses voies métaboliques comme la glycolyse ou glycolyse (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, phosphoglucomutase, glycogène phosphorylase, malate déshydrogénase...) ou les systèmes antioxydants (péroxyredoxine, glutathion-S-transférase, superoxyde dismutase).

Les protéines chaperonnes comme les HSP (Heat Shock Protein) permettent d'assurer le maintien de la structure 3D des protéines, d'assurer leur activité biologique en restaurant leur

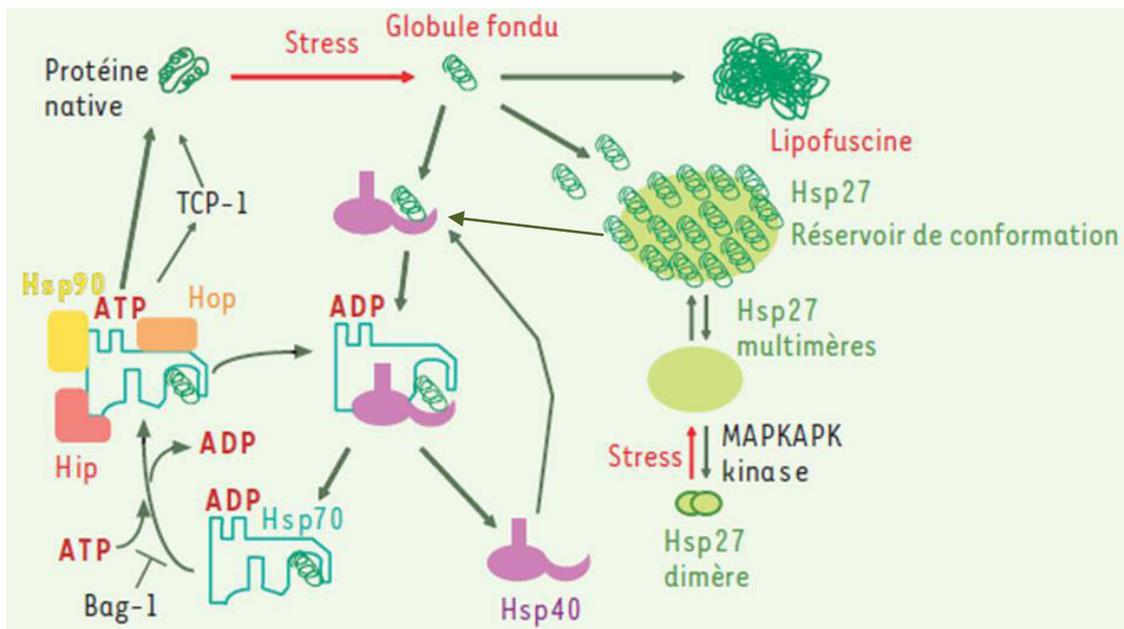


Figure 3 Mécanismes d'actions des protéines chaperonnes pour le repliement de protéines dénaturées. (Arrigo, 2005)

conformation native suite à différents stress physiologiques, comme l'augmentation de la température, un déséquilibre osmotique ou des dommages oxydatifs. Une protéine chaperonne a trois rôles : 1) la reconnaissance des protéines dénaturées, 2) l'induction de modifications conformationnelles et 3) le transport de protéines lors de la traduction des ARNm (Wilhelmus *et al.*, 2007). Ces changements de conformation des protéines, s'ils sont trop importants, deviennent délétères pour la cellule et notamment peuvent induire une agrégation irréversible des protéines et entraîner la mort des cellules. Afin de lutter contre ces dommages, un mécanisme de défense est mis en place, qui va activer la synthèse des HSP pour rétablir l'intégrité des protéines. Cependant, il est à noter qu'il existe une expression constitutive de ces protéines qui agissent durant la synthèse protéique et permettent l'assemblage de structures multiprotéiques dans le réticulum endoplasmique et dans le dépliement des polypeptides lors de leur passage à travers les membranes.

Parmi les HSP, il est distingué différentes protéines en fonction de leur poids moléculaire : HSP 90, 70, 60, 40 et 27 (Arrigo, 2005). Les protéines dénaturées ou en cours de synthèse vont être reconnues par les HSP. Les HSP se complexent aux protéines pour permettre leur repliement et ceci par l'intermédiaire d'une cascade de réactions consommant de l'ATP. Les protéines dénaturées qui échappent à la reconnaissance des HSP vont former des agrégats (Figure 3). La particularité des HSP de haut poids moléculaires (60, 70 et 90 kDa) est de posséder un site de liaison à l'ATP alors que celles de poids moléculaires inférieurs ou « small HSP » (27 et 40 kDa) n'en ont pas. Par contre ces sHSP possèdent un site de liaison à l' α -cristalline au niveau C-terminal, qui est une autre protéine chaperonne qui vient se complexer aux sHSP pour aider au repliement. D'une manière générale les protéines chaperonnes interagissent entre elles de façon synergique, notamment l'HSP 70 dont le rôle est majeur dans le repliement des protéines. Cette dernière est capable d'interagir avec toutes les autres HSP. L'HSP 27 quant à elle permet d'éviter l'agrégation protéique. Dans des conditions où le processus de repliement des protéines par les HSP est saturé par un afflux trop important de protéines dénaturées, les HSP sont capables de mettre en place un système de stockage transitoire (réservoir de conformation) en attendant leur prise en charge par les autres molécules chaperonnes pour rétablir leur fonction biologique.

Outre les HSP, d'autres types de protéines chaperonnes comme l'apolipoprotéine E (ApoE), les « heparan sulfate proteoglycans » (HSPGs), l' α -cristalline, la protéine DJ-1 œuvrent également au rétablissement de la conformation spatiale des protéines pour maintenir leurs fonctionnalités (activité enzymatique, de régulation, de transport,...).

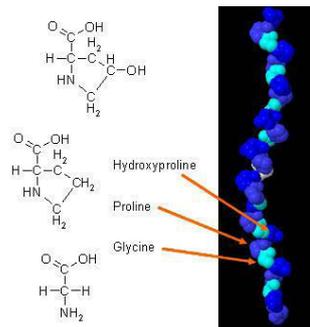


Figure 4 Structure d'un monomère de tropocollagène. <http://www.joint-muscle-relief.com/how-to-build-collagen.html>

- ✓ Le **tissu conjonctif** représente environ plus de 10% des protéines musculaires chez le bovin (plat de côte, paleron). Il est constitué de protéines fibreuses : le collagène, l'élastine et la réticuline.
 - Le collagène, grande protéine de 162 kDa, est le composé le plus important du tissu conjonctif puisqu'il représente environ 80% des protéines du tissu conjonctif. Il existe différents types de fibres de collagène qui sont composées de monomères de tropocollagène (Figure 4) dont l'assemblage et le niveau de réticulation conditionnent la structure finale de l'endomysium, du pérимysium et de l'épимysium. Formé de trois chaînes polypeptidiques reliées par des liaisons hydrogène covalentes, afin de former une triple hélice stable, le collagène est inextensible et résistant à la traction. Dans la composition du collagène, trois acides aminés prennent une part importante, à savoir la glycine (35%), la proline (7-9%) et l'hydroxyproline (12-14%).
 - L'élastine, protéine de 66 kDa, représente moins de 10% des protéines du tissu conjonctif. Contrairement au collagène, cette protéine fibreuse possède des propriétés élastiques. Elle comprend de nombreux résidus de lysine et peu d'hydroxyproline.
 - La réticuline est composée de fibrilles de collagène de type 3. Elle forme des fibrilles assemblées en fibres, plus fines que les fibres de collagène, fibres de collagène immatures qui sont indépendantes les unes des autres. Elles possèdent un rôle contractile.

I.B. Modifications mécaniques et biochimiques du muscle post mortem

I.B.1) Modifications mécaniques et réactions énergétiques post mortem

A la mort de l'animal, la cellule musculaire est privée de nutriments et d'oxygène. Afin de maintenir ses équilibres ioniques ou son homéostasie, cette dernière va puiser dans ses réserves énergétiques. Ces transformations vont en grande partie être responsables de la qualité finale des viandes.

Cette évolution se fait en trois phases : La pantelance, l'installation de la *rigor mortis* et la maturation (Figure 5 ci après).

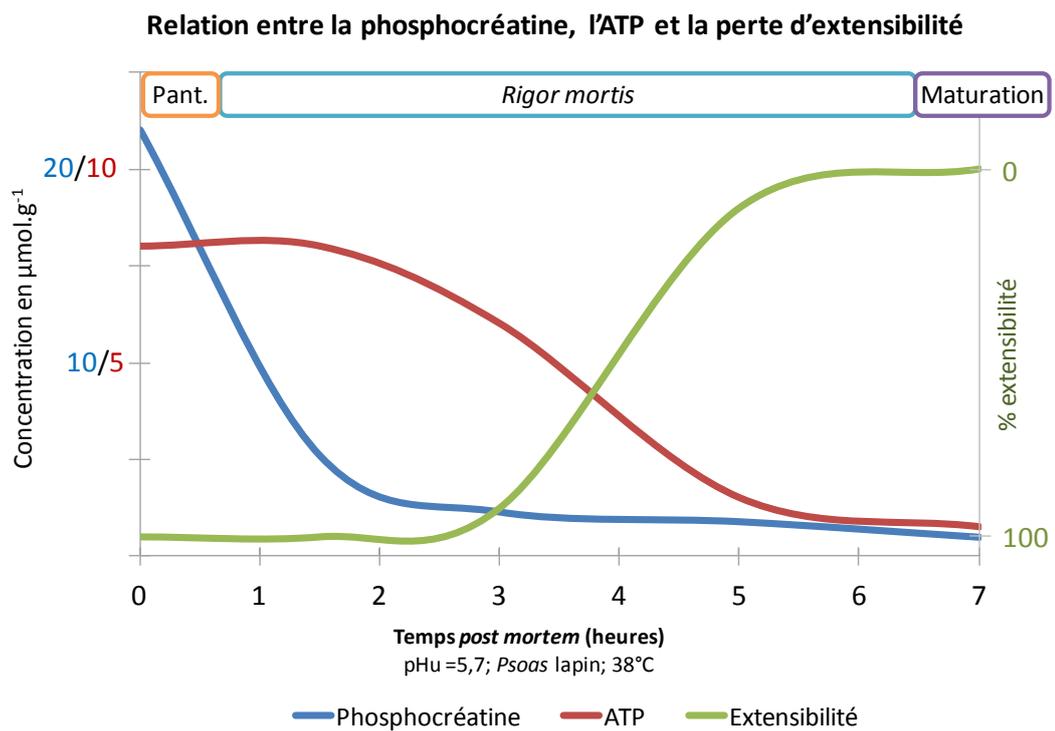


Figure 5 Évolution des concentrations de phosphocréatine et d'ATP en fonction de l'extensibilité du muscle après l'abattage de l'animal. (Monin, 1988)

Abbréviation: Pant. : Pantelance

La **pantelance** est la phase d'épuisement de la source énergétique du muscle qui est l'Adénosine TriPhosphate (ATP) résiduel. Elle dure moins de 30 minutes chez le bovin et est fugace chez le porc ou la volaille et de ce fait, difficile à estimer.

L'installation de la **rigor mortis** ou rigidité cadavérique est un phénomène dynamique caractérisé par la perte de l'élasticité du muscle et son acidification. Malgré l'interruption de la circulation sanguine, on observe une succession de contractions musculaires. Pour maintenir son homéostasie la cellule musculaire active des réactions de synthèse d'ATP notamment par la dégradation de la phosphocréatine qui permet de re-synthétiser un tiers de l'ATP dégradé. L'hydrolyse du glycogène en anaérobiose conduit à la formation d'acide lactique, qui s'accumule dans le tissu musculaire. L'accumulation d'acide lactique ou lactate qui s'ensuit participe à la baisse de pH de 7 à 5,5. La disparition de l'ATP coïncide avec l'entrée en *rigor* du muscle, par convention on parle alors de viande.

L'ensemble des réactions se produisant à l'abattage d'après Bendall (1973) et Monin (1988) sont les suivantes et sont illustrées sur la Figure 5 :

- 1) $(3+m)[\text{ATP}^{4-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP}^{3-} + \text{Pi}^{2-} + \text{H}^+]$
- 2) $m\text{ADP}^{3-} + m\text{PC}^{2-} + m\text{H}^+ \rightarrow m\text{ATP}^{4-} + m(\text{créatine})$
- 3) $3\text{ADP}^{3-} + 3\text{Pi}^{2-} + (\text{glucose})_n + \text{H}^+ \rightarrow 3\text{ATP}^{4-} + 2(\text{lactate})^- + (\text{glucose})_{n-1} + 2\text{H}_2\text{O}$

Total: $(\text{glucose})_n + (1+m) \text{H}_2\text{O} + m\text{PC}^{2-} \rightarrow (\text{glucose})_{n-1} + m\text{Pi}^{2-} + 2(\text{lactate})^- + m(\text{créatine}) + 2\text{H}^+$

m est de l'ordre de 1,5 ce qui signifie que le tiers environ de l'ATP resynthétisé pendant cette période l'est à partir de la phosphocréatine.

Il y a donc, une diminution rapide, durant les premières heures après l'abattage, de la phosphocréatine due à sa mobilisation et sa dégradation pour assurer le maintien d'un niveau suffisant d'ATP. Durant cette phase les muscles sont rigides. Quand les quantités de phosphocréatine s'épuisent, c'est la myokinase qui va permettre la production d'ATP (10% d'ATP; réaction 3 ci-dessous).

- 1) $(3+2q) [\text{ATP}^{4-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP}^{3-} + \text{Pi}^{2-} + \text{H}^+]$
- 2) $3\text{ADP}^{3-} + 3\text{Pi}^{2-} + (\text{glucose})_n + \text{H}^+ \rightarrow 3\text{ATP}^{4-} + 2(\text{lactate})^- + (\text{glucose})_{n-1} + 2\text{H}_2\text{O}$
- 3) $2q\text{ADP}^{3-} \rightarrow q\text{ATP}^{4-} + \text{AMP}^{2-}$
- 4) $q\text{AMP}^{2-} + q\text{H}^+ + q\text{H}_2\text{O} \rightarrow q\text{IMP}^{2-} + q\text{NH}^{4+}$

Total: $(\text{glucose})_n + (1+3q)\text{H}_2\text{O} + q\text{ATP}^{4-} \rightarrow (\text{glucose})_{n-1} + q\text{IMP}^{2-} + q\text{NH}^{4+} + 2q\text{Pi}^{2-} + 2(\text{lactate})^- + (2+q)\text{H}^+$

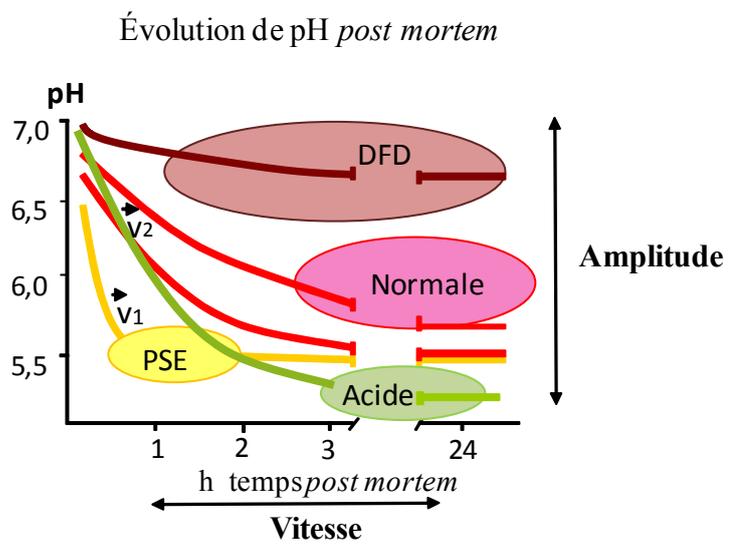


Figure 6 Qualités technologiques de la viande en fonction de l'évolution post mortem du pH musculaire. (Monin, 1988)

Abbréviations: DFD: Dark, Firm, Dry; PSE: Pale, Soft, Exsudative.

Au bout de 2 heures, le stock de phosphocréatine étant épuisé, il est observé une diminution de l'ATP et en parallèle, une perte de l'extensibilité musculaire. La myokinase participe à hauteur de 10% à la régénération d'ATP. L'accumulation des ions H^+ , produits par l'hydrolyse de l'ATP et l'acide lactique formé, se traduit par une baisse de pH jusqu'à une valeur dite de pH ultime (pH 5,4-5,7 chez le porc et le boeuf). Par convention cette valeur est prise 24 h après abattage. A cette étape, la glycolyse cesse soit par la disparition de co-facteurs tels que l'AMP, soit par la carence en glycogène donnant ainsi un pH ultime plus élevé que la normale.

La **maturation** se caractérise principalement par une augmentation progressive de la tendreté (attendrissage) due à des modifications des myofibrilles et du cytosquelette. Malgré l'épuisement des réserves énergétiques durant les phases précédentes, il subsiste des phénomènes oxydatifs et hydrolytiques qui vont tendre à désorganiser/dénaturer progressivement les différentes structures et composants du muscle. Cela se traduit par des changements de conformation, des modifications de solubilité et une augmentation de la sensibilité aux enzymes protéolytiques. Les durées de maturation à 4°C sont variables en fonction de l'espèce : 2 jours pour les volailles et lapins; 4-6 jours pour le porc, l'agneau et le veau et 10-21 jours pour le bovin. Ces dernières sont fonction de la composition du muscle et peuvent varier en fonction du muscle, de son utilisation culinaire, de l'âge de l'animal,... Ainsi, cette étape garantit la qualité organoleptique de la viande prête à être consommée. Cependant, la viande subit généralement une étape de chauffage, avant de se retrouver dans notre assiette, qu'il faut aussi prendre en compte.

1.B.2) Défauts de qualité de viande liés au métabolisme musculaire post mortem

En ce qui concerne la qualité de la viande obtenue après abattage, deux éléments sont importants, la vitesse de chute de pH ainsi que l'amplitude (Figure 6). En effet, pour avoir une viande dite « normale », le pH doit diminuer progressivement pour se stabiliser entre 5,8 et 6,3 (pH ultime). Si le pH ultime est trop élevé (i.e. supérieur à 6,3) la viande sera appelée « DFD » (Dark, Firm, Dry), elle sera alors de couleur rouge foncée, ferme et sèche. Inversement, si le pH est trop faible (inférieur à 5,5), la viande sera dite « acide ». De plus, si la vitesse de chute de pH est trop rapide (pH 1 h inférieur à 6) la viande sera dite « PSE » (Pale, Soft, Exsudative) la viande est pâle, flasque et perd beaucoup d'eau. Ces défauts peuvent être dus à la présence du gène *halothane*, à l'état de l'animal avant l'abattage (stress, activité physique) ou la méthode d'abattage et ils entraînent des altérations de la qualité organoleptique et sensorielle.

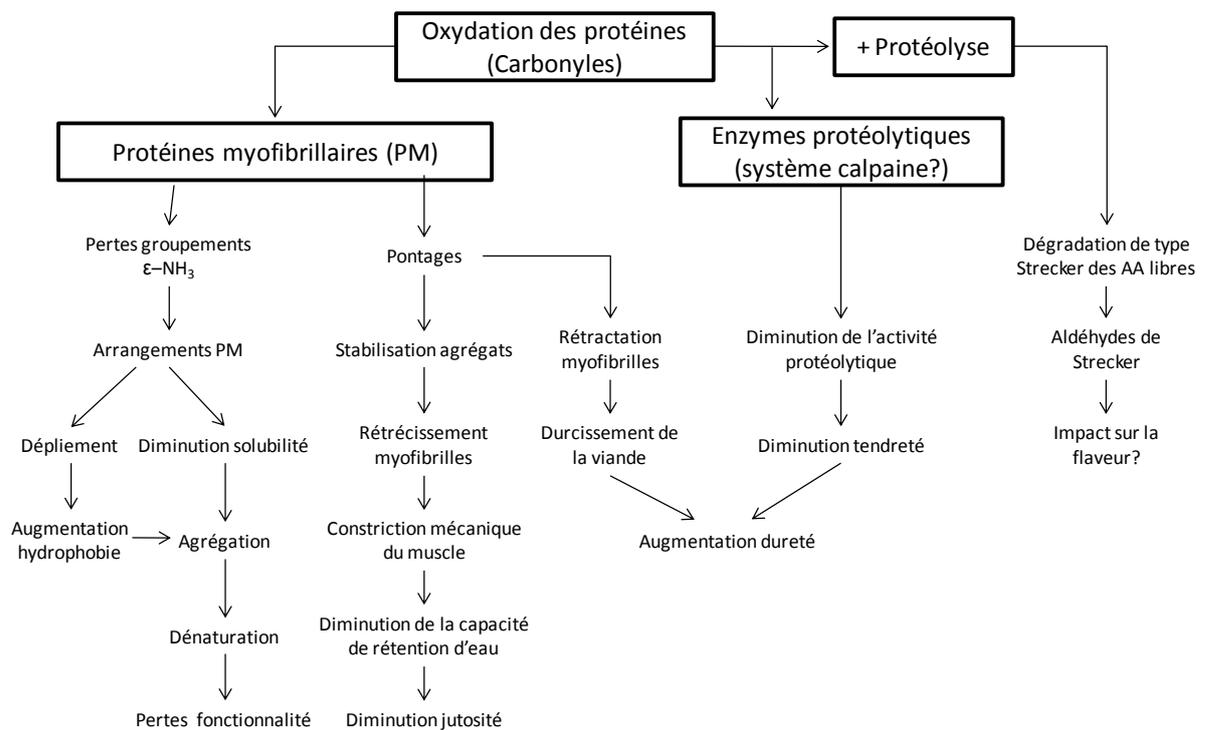


Figure 7 Mécanismes plausibles par lesquels l'oxydation des protéines affecte les qualités technologiques et sensorielles de la viande. (Estévez, 2011)

I.B.3) Modifications biochimiques au cours de la maturation

✓ **Impact de la transformation du muscle en viande sur l'oxydation protéique**

Les propriétés des myofibrilles en lien avec les qualités sensorielles dépendent essentiellement de l'évolution *post mortem* du pH et des réactions protéolytiques intervenant pendant la maturation. Minelli *et al.* (1995) et Monin *et al.* (1999) ont montré que la vitesse de chute du pH constitue le principal déterminant de la résistance myofibrillaire et de la dureté de la viande de porc notamment pour les viandes PSE. Cela peut s'expliquer par davantage de protéines dénaturées, ceci étant dû à une vitesse de chute de pH trop rapide (Van Laack et Kauffman, 1999) et donc une reconnaissance altérée par les protéases endogènes. D'une façon générale, la résistance mécanique de la viande diminue avec la durée de conditionnement ou de stockage (Wood *et al.*, 1996) et le pH ultime de la viande va également conditionner l'activité enzymatique des protéases (calpaines et cathepsines) et donc la tendreté finale du produit (Huff-Lonergan *et al.*, 2010).

A l'échelle microscopique, on observe une altération de l'organisation structurale de la cellule musculaire qui est le résultat de l'action de deux systèmes protéolytiques : le système calpaïne/calpastatine et le système cathepsines/cystatine (Ouali, 1991; Chéret *et al.*, 2007). Les calpaines sont des protéases calcium-dépendantes qui sont actives à pH neutre. Les cathepsines, protéases lysosomales, sont actives dans la gamme de pH allant de 4 à 6. Ces systèmes enzymatiques ont été très étudiés en relation avec les qualités organoleptiques des produits carnés. Récemment le rôle de l'oxydation protéique a été mis en évidence comme ayant un impact important sur les processus de maturation (Rowe *et al.*, 2004; Huff-Lonergan *et al.*, 2010). Estévez (2011) a proposé un schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans la perte de fonctionnalité des protéines (Figure 7). Plusieurs phénomènes favorisent l'oxydation protéique : la chute de pH *post mortem* couplée à une température élevée, le relargage du fer par la ferritine qui va initier la propagation de la peroxydation des lipides, la perte d'activité des enzymes antioxydantes,...

✓ **Anti et prooxydants de la cellule musculaire**

In vivo, il existe de nombreux moyens de défense dans la cellule musculaire pour limiter la production de radicaux libres notamment, les enzymes antioxydantes intracellulaires, telles que la SOD, la catalase et la glutathion peroxydase (GPx), qui freinent la production des radicaux libres oxygénés à l'origine du radical hydroxyle (HO°).

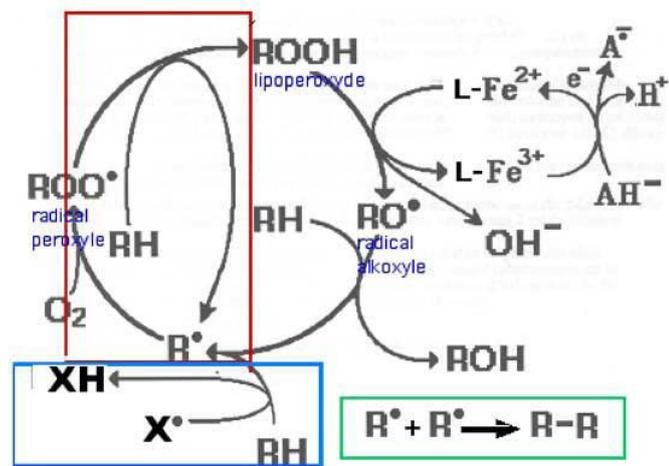


Figure 8 Cycle d'auto-oxydation d'un lipide insaturé RH. Encadrés **bleu** : phase d'initiation; **rouge** : phase de propagation constituant le cycle proprement dit; **vert** : phase de terminaison par dimérisation de 2 radicaux R[•]. Hors encadré : rôle des métaux de transition dans la genèse des radicaux alcoxyles RO[•]. [http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation au met oxygene/eroxlip.html](http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/eroxlip.html)

Mais aussi, différents minéraux, à différents degrés, ou en tant que co-facteurs d'enzymes (Cu-Zn, Mn-SOD, Se-GPx, Mg...) peuvent contribuer à freiner les oxydations. La viande est aussi une source de composés bioactifs et/ou antioxydants comme la taurine, la carnosine, l'ansérine, le glutathion, la vitamine E, la coenzyme Q₁₀, la créatine,... pouvant aider l'organisme à lutter contre les oxydations.

Des travaux récents au laboratoire ont identifié des marqueurs protéiques de stress oxydatif dans la fraction sarcoplasmique. Il s'agit principalement des protéines du métabolisme du fer (myoglobine et sérotransferrine). A l'inverse, l'oxydation protéique est négativement corrélée après 4 jours de maturation avec une protéine de la famille des 'Selenium-Binding Proteins' (SBP) et SOD (Promeyrat *et al.*, 2011). Le fer de la viande a un rôle central dans le métabolisme, qu'il s'agisse du fer héminique ou du fer complexé à la ferritine. Il est impliqué dans le métabolisme oxydatif au sein des cellules et il est un co-facteur de nombreuses enzymes. *In vivo*, le métabolisme et le transport du fer sont fortement régulés pour éviter l'exposition du fer libre et les dommages oxydatifs consécutifs. *Post mortem*, le fer libre peut aussi catalyser la génération de radicaux libres (Figure 8), à l'origine de dommages cellulaires membranaires et au niveau notamment de l'ADN (World Cancer Research Fund, 2007).

✓ **Oxydation des protéines au cours de la maturation**

Le degré d'oxydation des protéines est fonction de l'espèce, du type de muscles et des conditions de stockage. Martinaud *et al.* (1997) ont montré que 10 jours de maturation chez le bovin augmentaient le taux de carbonyles de 3,1 à 5,1 nmol/mg de protéines dans le *Longissimus lumborum* muscle oxydo-glycolytique et de 4,8 à 6,9 nmol/mg de protéines dans le *diaphragma pedialis* muscle oxydatif, soit une augmentation de plus de 64% et 43% respectivement. Cette augmentation a aussi été relevée dans d'autres espèces, comme l'agneau, la dinde (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008a,b) et le nandou (Filgueras *et al.*, 2010). La congélation (-20°C) ne permet pas de prévenir la formation de protéines carbonylées. L'augmentation de l'oxydation protéique au cours de la maturation, de la réfrigération/congélation s'explique par la lipoperoxydation qui semble initier l'oxydation protéique. Cependant, les niveaux d'oxydation protéique pendant la maturation sont inférieurs à ceux observés pendant la cuisson. Pour expliquer le faible niveau d'oxydation pendant la maturation, Gatellier *et al.* (2004) postulent que la production des radicaux libres est partiellement contrôlée par la protection antioxydante (enzymes et vitamines).

Hoac *et al.* (2006) ont ensuite montré que la conservation affecte légèrement les activités des enzymes antioxydantes telle que la glutathion peroxydase. Après un traitement thermique à 80°C, ces activités enzymatiques diminuent jusqu'à 80% de leur valeur initiale.

II. Impact des traitements technologiques sur les structures macro et microscopiques

Depuis sa découverte et son apprivoisement au Paléolithique, les Hommes ont développé l'utilisation du feu pour cuire les aliments. Carmody et Wrangham (2009) ont récapitulé les liens possibles entre la cuisson et l'évolution du régime alimentaire de l'Homme. Ils ont ainsi souligné que la cuisson améliorait l'état sanitaire, la saveur, l'aspect et l'arôme des produits, mais surtout maximisait l'énergie apportée par ces aliments. En effet, la digestibilité de certains constituants alimentaires comme l'amidon augmente due à sa gélatinisation au chauffage. Pour d'autres constituants les mécanismes mis en jeu concernaient l'inactivation des inhibiteurs de trypsine.

Les viandes et produits carnés sont presque toujours cuits avant d'être consommés. La cuisson sert à la fois à détruire les micro-organismes pathogènes ou d'altération et à conférer à l'aliment des qualités sensorielles qui sont spécifiques du produit cuit. Il existe différentes technologies mises en œuvre lors de la cuisson des viandes et produits carnés. Les cuissons nécessitant des temps longs sont réalisées par immersion dans l'eau ou à la vapeur alors que les fritures, les cuissons par contact ou par rayonnement sont adaptées aux cuissons courtes (Kondjoyan, 2008).

Quel que soit le procédé de transformation choisi, l'ajout d'antioxydants peut être réalisé pour réduire la peroxydation des lipides et de ce fait, améliorer la qualité de la viande et plus particulièrement la couleur. L'ajout peut se faire sur l'animal vivant par ajout dans la ration, ou dans les produits transformés. Il existe des antioxydants de synthèse comme le butylhydroxyanisole (BHA) ou le butylhydroxytoluène (BHT) ou des antioxydants naturels comme la vitamine E, le romarin, le thym, le citron, le raisin,... (Renner, 2002; Gobert, 2010).

Outre la cuisson, il existe cependant un grand nombre de procédés de transformation auxquels le traitement thermique peut être couplé comme le hachage, le salage, le marinage, le fumage,... La chaîne de production de viande s'est organisée pour assurer 1) la sécurité des produits, en contrôlant la santé animale, l'abattage, le refroidissement et les autres procédures de stockage,

2) le goût et l'appétence des produits et 3) la praticité des produits en lien avec le mode de vie moderne. Le hachage ou broyage sert notamment à utiliser des produits de valeur bouchère faible, ce type de traitement est destructif, il élimine la structure du muscle et a pour conséquence d'augmenter les zones de contact entre la viande et le milieu environnant (oxygène, lumière, micro-organismes,...). Les produits issus de ce traitement auront donc *a priori* une sensibilité plus forte à l'oxydation entraînant des défauts de flaveur et de couleur. Ces derniers ont donc, une durée de consommation très courte.

Le salage se fait à sec sur les produits carnés et nécessite l'ajout de sel. Le produit est ensuite stocké pendant plusieurs jours dans un endroit ventilé sous atmosphère contrôlée (température, hygrométrie), le temps que le sel pénètre peu à peu dans le morceau de viande. Il permet d'éliminer l'eau de constitution de la viande. C'est le cas pour la charcuterie ou les poissons qui peuvent être conservés plusieurs mois à 4°C.

L'action des agents de salaison (nitrate/nitrite) sur les composants de la viande conduit à 1) la formation de la couleur rouge-saumure (pouvant être aussi améliorée avec l'ajout de sucres), stable à la cuisson; 2) l'apparition de l'arôme typique de salaison et 3) la prolongation de la conservation.

Le marinage repose aussi sur l'utilisation du sel mais cette fois avec une immersion dans une solution acide. Du fait du travail en solution, le sel va pénétrer plus rapidement dans la viande. La marinade peut s'effectuer durant 1-2 h ou pendant plusieurs jours; cela dépend notamment de la taille et l'épaisseur du morceau à mariner. Une fois marinée, la viande a cependant une durée de conservation limitée.

Le fumage s'effectue sur une viande légèrement salée, séchée et soumise un certain temps à l'action de la fumée provenant de la combustion du bois. Pendant la phase du fumage, elle continue à se déshydrater en s'imprégnant en même temps des composés volatils de la fumée. Le fumage, au goût âcre est très léger et n'assure que faiblement deux types d'actions : antioxydante et bactériostatique. C'est avant tout un goût et une couleur que l'on donne au produit, la conservation étant assurée principalement par les opérations précédentes (salage et surtout séchage). Le produit fini est maintenu à 4°C et emballé sous vide.

Tous ces traitements technologiques sont générateurs d'oxydations lipidiques et protéiques et sont susceptibles d'altérer la structure physique et moléculaire de la viande (Belitz *et al.*, 2009; Warriss, 2000).

II.A. Modifications de structure - Dénaturation

Les propriétés fonctionnelles des protéines incluent, les capacités de gélification, d'émulsion et d'hydratation. Ces propriétés dépendent de la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire des chaînes polypeptidiques. Il est possible de détecter les phénomènes de dénaturation à l'aide de techniques d'optique en mesurant des absorbances dans le cas de mélange en solutions ou de microscopie, donnant une vue d'ensemble du tissu, à l'aide de sondes hydrophobes ciblant particulièrement les protéines.

II.A.1) Au niveau intracellulaire

On parle de protéine dénaturée lorsque les changements sont induits au niveau de la structure secondaire, tertiaire et/ou quaternaire et ne permettent plus à la protéine d'assurer sa fonction biologique. L'augmentation de la température a pour effet de rompre en premier lieu les liaisons faibles hydrogène reliant les charges électriques des radicaux de la chaîne. De même, en milieu trop acide, trop alcalin ou très concentré en électrolytes, la plupart des protéines se dénaturent. Les régions hydrophobes se tournent alors vers l'extérieur de la molécule alors que les hydrophiles se rassemblent au centre. Cela conduit à une perte de solubilité des protéines, leur précipitation et pour certaines leur gélification.

Parmi les protéines du tissu musculaire, la dénaturation de la myosine a été très étudiée notamment au chauffage. Abel-Mohsen *et al.* (2003) ont montré par des mesures de turbidité, que la dénaturation de la myosine commence dès 50°C. Par ailleurs, ils observent un effet additif de la maturation. En effet, la myosine s'agrège plus rapidement à des températures plus faibles, plus les temps de maturation sont longs. En parallèle, ils ont souligné une augmentation de l'hydrophobie de surface de la myosine avec la durée de maturation. Par calorimétrie différentielle, Stabursvik (1984) a montré qu'à des températures de 58°C et 66°C la myosine de porc présentait des transitions structurales, synonymes de changement de conformation, alors que pour l'actine, le pic se situe à une température supérieure : 78°C. Des sondes hydrophobes permettent d'évaluer également des modifications d'hydrophobie de surface des protéines induites par les traitements technologiques, que ce soit avec l'ANS (8-anilino-1-naphtalene sulfonic acid), le BBP (bleu de bromophénol) ou le Nile Red (Chelh *et al.*, 2006). Morita et Yasui (1991) ont montré que l'hydrophobie de la myosine augmentait graduellement pour un chauffage à 65°C, alors qu'à des températures plus élevées, l'hydrophobie de surface de la myosine diminuait.

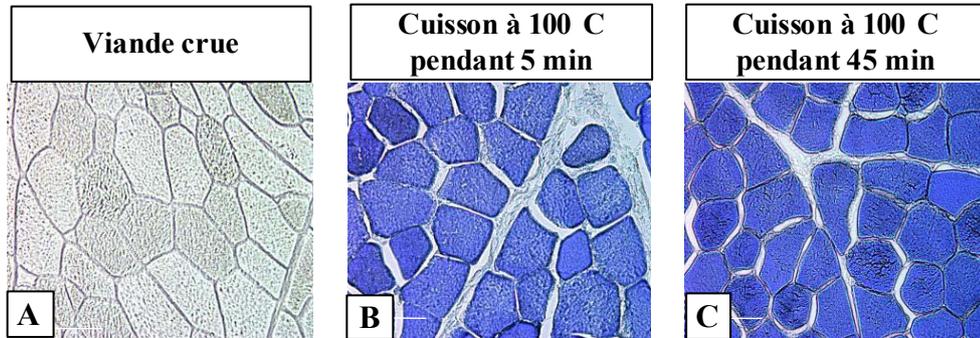


Figure 9 Effet d'un traitement thermique sur l'hydrophobie des protéines mis en évidence par la coloration au bleu de bromophénol sur des coupes de tissu musculaire. (Santé-Lhoutellier et al., 2008a)

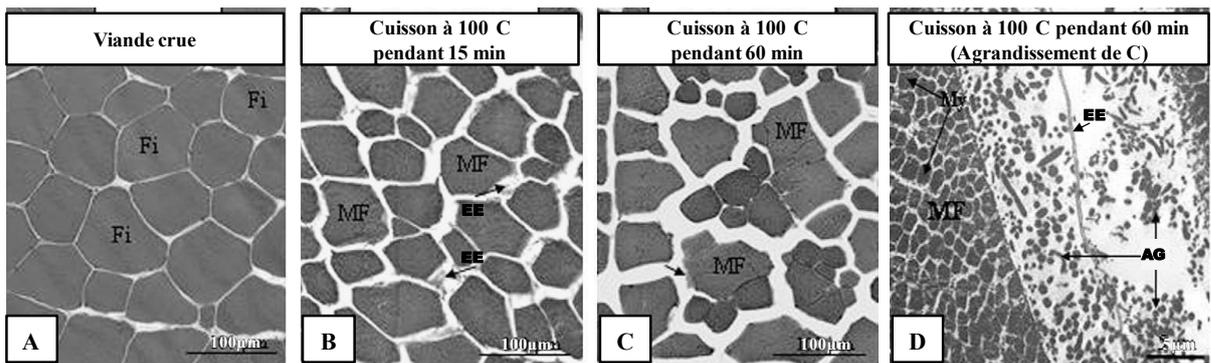


Figure 10 Effet du chauffage sur la morphologie des fibres musculaires du Rectus abdominis bovin un jour post mortem. Fi : Fibre, MF : Myofibrille, EE : Espace Extracellulaire, AG : Agrégat. (Astruc et al., 2010)

Ces données suggèrent la formation d'interactions protéines-protéines de type hydrophobe conduisant à un phénomène de gélification de la myosine. Des travaux récents ont montré que l'hydrophobie des protéines a tendance à augmenter très rapidement et rester stable ensuite. Par exemple, pour une cuisson à 100°C, l'hydrophobie de surface des protéines atteint son maximum dès 5 minutes de chauffage (Figure 9, Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008a). Cette augmentation souligne la rapidité à laquelle la dénaturation des protéines myofibrillaires s'opère lors de traitements thermiques et notamment l'exposition des acides aminés aromatiques à la surface des protéines. L'action de protection des protéines chaperonnes semble annihilée par la chaleur.

II.A.2) Au niveau de la matrice extracellulaire

Le chauffage induit une contraction de la matrice extracellulaire de la viande, qui conduit à une exsudation partielle d'eau ainsi qu'à des phénomènes d'évaporation, diminuant la tendreté et la jutosité de la viande. La contraction des fibres, transversalement et longitudinalement, débute à partir de 40°C, et augmente en fonction de la température. Le tissu conjonctif, pour des températures comprises entre 58-65°C, entre dans une étape de transition où l'on observe une contraction et des modifications de structure en passant de l'état natif (hélice) à une structure désordonnée (amorphe). Une fois cette étape terminée, il devient plus élastique (Lepetit, 2008). Au niveau structural, l'organisation de la cellule musculaire est fortement modifiée : la longueur des sarcomères est réduite, la strie Z perd son intégrité, les espaces intermyofibrillaires augmentent, et les myofibrilles sont fragmentées ou deviennent granuleuses. La paroi cellulaire est altérée et présente des trous. A partir de 80°C, à la contraction de la matrice extracellulaire s'ajoute la solubilisation du collagène (gélatinisation), qui à 100°C se présente sous forme granulaire (Wu, *et al.*, 1985). Concernant le collagène, les phénomènes de dénaturation ont lieu entre 53°C et 63°C. Ils débutent par la rupture des liaisons hydrogène déstructurant ainsi la structure fibrillaire et finissent par une contraction du collagène d'un quart par rapport à sa valeur au repos lors d'un chauffage entre 60°C et 70°C.

Une étude récente, menée par Astruc *et al.* (2010), montre ces changements structuraux sous l'effet du chauffage (Figure 10). A 100°C, l'espace extracellulaire augmente avec la durée de cuisson, de l'ordre de 27% dès 15 minutes et atteint un plateau à 34% entre 30 et 60 minutes. La coagulation/agrégation des protéines au niveau du sarcolemme apparaît au-delà de 15 min de chauffage. Cette localisation impliquerait des interactions de type hydrophobes.

II.B. Modifications chimiques - Oxydation

Pour lutter *in vivo* contre le stress oxydant, la cellule musculaire dispose de systèmes antioxydants liposolubles et hydrosolubles qui limitent ou neutralisent les réactions radicalaires. Cependant, *post mortem*, la balance entre les systèmes pro et antioxydants penche vers l'oxydation pendant les phases de maturation des viandes, phénomène qui s'accroît durablement pendant les traitements technologiques. Le chauffage, le hachage et l'ajout de solutés favorisent en effet, la formation de radicaux libres oxygénés (oxygène singulet $^1\text{O}_2$, radical superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$, radical hydroxyle HO°). Ces radicaux comportent un ou plusieurs électrons non appariés qui leur confèrent une forte réactivité chimique sur les constituants cellulaires avec lesquels ils vont échanger un électron; ils sont à l'origine d'une cascade de phénomènes radicalaires. La présence de fer, de myoglobine, des lipides et de composés phénoliques peut aussi augmenter l'oxydation des protéines. L'oxydation de la myoglobine (protéine hémique prooxydante en raison de son fer hémique) par exemple, peut être un bon initiateur de l'oxydation des protéines et est, de plus, responsable de la couleur de la viande. Durant l'auto-oxydation du pigment, il y a formation de metmyoglobine, du radical $\text{O}_2^{\circ-}$ et de H_2O_2 . L'interaction de la metmyoglobine avec H_2O_2 génère le radical ferryl-myoglobine ($\text{P}^{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}}$) impliqué dans l'oxydation des lipides. Une revue sur le muscle de Baron et Andersen (2002) a récapitulé les mécanismes de l'oxydation de la myoglobine et leurs implications dans l'oxydation des lipides.

Des procédés technologiques amplifient les phénomènes d'oxydation comme la réfrigération, la congélation, le broyage, la restructuration, l'irradiation, le chauffage, l'emploi de sel,...

II.B.1) L'oxydation des lipides

La viande contenant également des lipides (2-6%), il est observé une oxydation/liperoxydation de ces derniers lors de la maturation (Renerre, 2002) et de façon très importante lors des traitements thermiques. Les lipides ayant la plus grande réactivité avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont les acides gras insaturés et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés (AGPI). Ces derniers se trouvent plus particulièrement dans les membranes des muscles. Cette oxydation des lipides entraîne des défauts de qualité sensorielle et nutritionnelle des viandes. En effet, l'oxydation des lipides induit des défauts de flaveur (rancissement), de couleur (décoloration), de texture et une perte de la valeur nutritionnelle du fait de l'apparition de nombreux composés (radicaux libres à courte durée de vie, hydroperoxydes lipidiques labiles, aldéhydes, alcanes,...) dont certains potentiellement toxiques comme le malondialdéhyde (MDA)

qui est mutagène et carcinogène et les hydroxyalkénals 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) et 4-HHE (4-hydroxy-2-hexenal) qui sont des produits de terminaison des AGPI ω 6 et AGPI ω 3 respectivement et qui sont cytotoxiques (Marnett, 2000).

La dégradation des lipides se fait en 3 étapes (voir Figure 11 ci après):

1) *L'initiation*

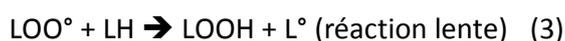
Il y a un équilibre entre le système prooxydant (substances réactives à l'oxygène) et le système antioxydant qui commence à tendre en faveur de l'oxydation et qui peut commencer à se développer et à endommager les tissus notamment suite à l'abattage. En présence d'un initiateur (I) comme une ERO, les lipides insaturés (LH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre (L° , radical alkyle).



Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être aussi produit par des radiations ionisantes, des activateurs chimiques, des systèmes enzymatiques produisant des espèces réactives à l'oxygène, ou des ions métalliques.

2) *La propagation*

Les systèmes prooxydants prennent le dessus des antioxydants et il y a un relargage des ions métalliques tels que le fer contenu notamment dans la myoglobine qui va se fixer sur des co-facteurs comme l'eau oxygénée pour augmenter le stress oxydatif. Les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxydes instables (LOO° , réaction 2) qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes ($LOOH$, réaction 3) et des nouveaux radicaux alkyles (L°). Il est généralement admis que chaque radical alkyle (L°) peut être à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroperoxydes ($LOOH$) avant le démarrage de la phase de terminaison.



L'étape de propagation est augmentée à la suite des traitements thermiques.

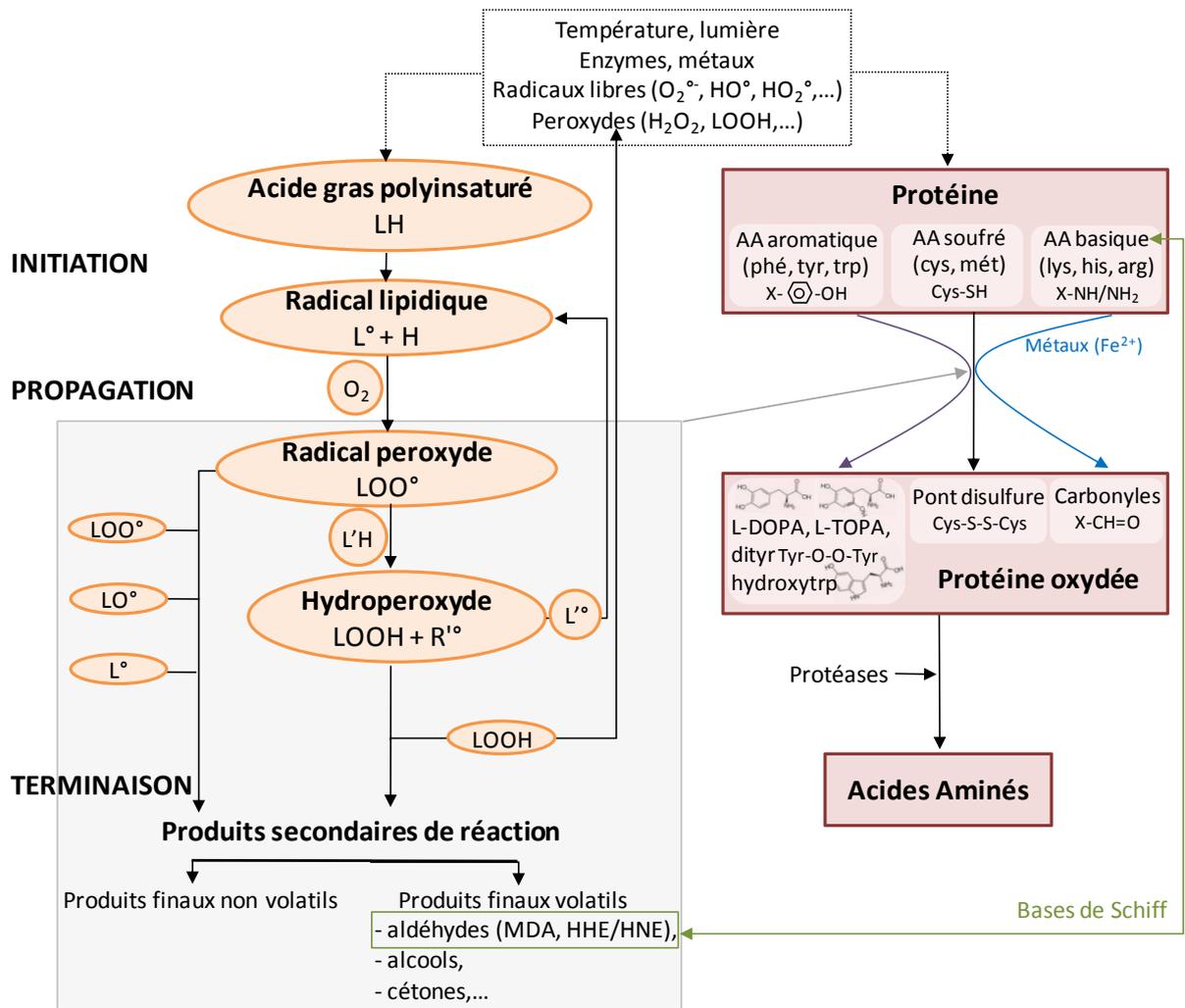


Figure 11 Schéma simplifié montrant l'interdépendance des oxydations lipidiques et protéiques. AA: acide aminé, L-DOPA: L-dihydrophénylalanine; L-TOPA: L-trihydrophénylalanine, Dityr: dityrosine, hydroxytrp: hydroxytryptophane, MDA: malondialdéhyde, HHE: 4-hydroxy-2-hexenal, HNE: 4-Hydroxy-2-nonenal. (adapté d'après Denys et al., 2010; Gatellier & Santé-Lhoutellier, 2010; Lund et al., 2011; Estévez, 2011; Stadtman & Berlett, 1997)

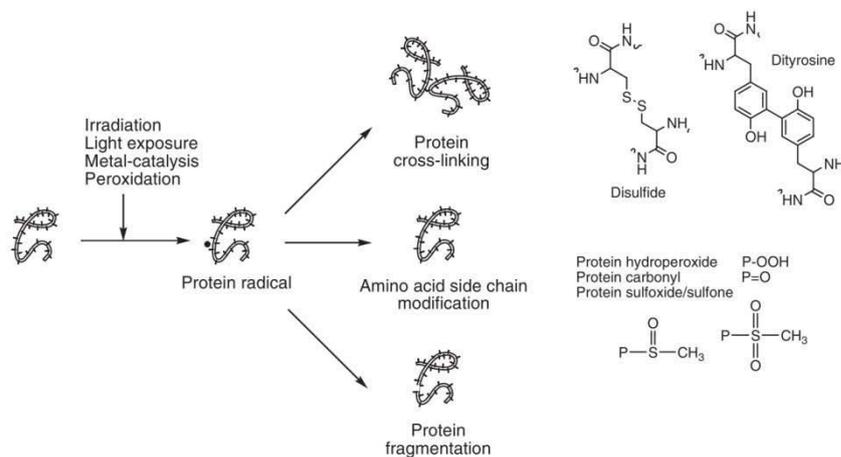


Figure 12 Les principales conséquences de l'oxydation des protéines. (Lund et al., 2011)

3) *La terminaison*

Les radicaux formés réagissent entre eux (réactions 4, 5, 6) pour former des dimères ou des polymères, ou se décomposent.



Ils génèrent alors de nombreux composés secondaires non radicalaires possédant des fonctions chimiques variées : des aldéhydes dont le MDA et les TBA-RS (Substances Réactives à l'Acide ThioBarbiturique), des 4-hydroxyalkénals (HHE/HNE), des alcanes, des acides,... Les différents composés produits lors de l'oxydation des lipides vont par la suite être impliqués notamment dans l'oxydation des protéines (Figure 11).

Plusieurs stratégies sont utilisées afin de limiter l'oxydation des lipides. La première consiste à optimiser la capacité antioxydante du muscle en apportant des antioxydants dans la ration des animaux (vitamine E, polyphénols, plantes aromatiques,...), notamment si cette ration est enrichie en acides gras polyinsaturés hautement réactifs à l'oxygène (Gobert *et al.*, 2010; Gatellier *et al.*, 2004, 2010a). D'un point de vue technologique, il est possible de traiter directement la viande en apportant des antioxydants par imprégnation de la viande, par exemple dans les marinades ou par simple dépôt en surface. Enfin, le mode de conditionnement des produits (sous vide ou atmosphère modifiée, opaque, température,...) va être déterminant pour limiter la propagation de la lipoperoxydation du produit prêt à consommer.

II.B.2) L'oxydation des protéines

L'oxydation des protéines cause de nombreuses modifications physicochimiques incluant l'oxydation des acides aminés (Figure 11), la perte de solubilité des protéines, la perte d'activité enzymatique et impacte sur la digestibilité. D'après Xiong (2000), l'oxydation des protéines peut être générée par 4 modes d'action : 1) une oxydation directe de la chaîne latérale des acides aminés, 2) une fragmentation du squelette peptidique, 3) une réaction avec les sucres réducteurs et 4) une fixation avec des composés carbonylés non protéiques. Lund *et al.* (2011) ont schématisé les conséquences de l'oxydation protéique en termes de pontage, de fragmentation et d'oxydation des acides aminés (Figure 12) au niveau du muscle.

✓ **Acides aminés cibles**

L'oxydation des protéines par les radicaux libres concerne 3 classes d'acides aminés : les acides aminés basiques, les acides aminés soufrés et les acides aminés aromatiques.

Les acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine) qui présentent des fonctions amines libres (NH ou NH₂) sur leurs chaînes latérales sont particulièrement sensibles à l'oxydation. En présence des métaux tels que le fer ou le cuivre, ces acides aminés subissent une désamination oxydative conduisant à la formation des groupements carbonyles (Stadtman, 1990). Récemment les aldéhydes spécifiques de l'oxydation de la lysine et de l'arginine ont été identifiés par des méthodes basées sur la spectrométrie de masse (Estévez *et al.*, 2009). Il s'agit de semialdéhydes : α -aminoadipique et γ -glutamique (AAS et GGS, respectivement). L'AAS est obtenu suite à l'oxydation de la lysine et le GGS issu de l'oxydation de l'arginine. Ce sont des composés actifs qui peuvent être impliqués dans plusieurs réactions chimiques, avec des conséquences sur la qualité de la viande. Ces semialdéhydes représentent près de 70% des aldéhydes formés (Estévez, 2011).

Les groupements carbonyles ainsi formés peuvent réagir avec les fonctions amines libres (non oxydées) de la lysine pour former des liaisons amides (-CO-NH-) (Morzel *et al.*, 2006). Ces liaisons amides sont impliquées dans les phénomènes de pontage des chaînes peptidiques pouvant conduire à la polymérisation et à l'agrégation des protéines (Davies, 1987, 2005; Stadtman, 1990, 1993; Grune *et al.*, 2004; Morzel *et al.*, 2006; Santé- Lhoutellier *et al.*, 2008a; Promeyrat *et al.*, 2010a,b). Ces acides aminés sont des acides aminés indispensables, leur oxydation va donc conduire à une perte de la qualité nutritionnelle des produits.

Les acides aminés soufrés, comme la cystéine, sont sensibles aux attaques radicalaires. L'oxydation de la cystéine entraîne la formation des ponts disulfure (Cys-S-S-Cys) entre les chaînes peptidiques. Morzel *et al.* (2006) ont montré, sur de la viande de porc, que ces ponts disulfure intra- ou interchaînes peuvent conduire à l'agrégation des protéines, s'ils sont formés entre deux protéines différentes. L'oxydation de la méthionine va donner de la méthionine sulfone et de la méthionine sulfoxyde.

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et le tryptophane), quant à eux, sont très sensibles à l'oxydation en subissant des réactions d'hydroxylation sur les noyaux aromatiques. La phénylalanine et la tyrosine s'oxydent en L-dihydrophénylalanine (L-DOPA) ou

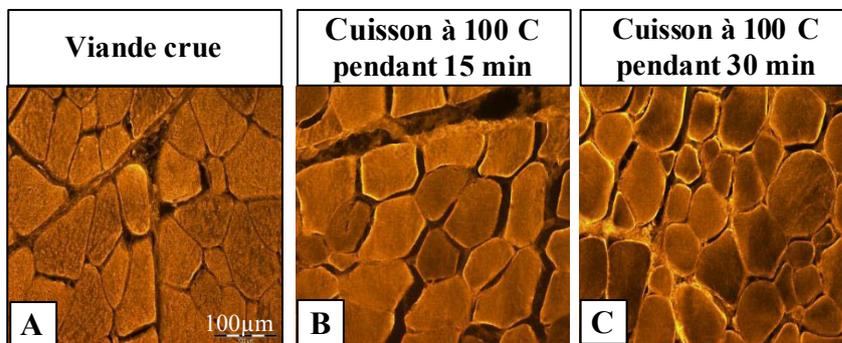


Figure 13 Évolution de la distribution des carbonyles au cours du chauffage du Rectus abdominis bovin avec la sonde fluorescente Cy3 (jaune). (Astruc et al., 2007)

en L-trihydrophénylalanine (L-TOPA), le tryptophane est oxydé en hydroxytryptophane, la phénylalanine peut aussi s'oxyder en tyrosine. L'oxydation de deux tyrosines voisines conduit à la formation de dityrosine (Tyr-O-O-Tyr). La formation de molécules de dityrosine se révèle être un marqueur discriminant de l'oxydation des myofibrilles et de l'agrégation des protéines quand elle est formée à partir de deux chaînes peptidiques différentes (Morzel *et al.*, 2006). Dans cette étude, l'oxydation est induite *in vitro* par ajout d'oxydants (radicaux libres : H₂O₂, Fe).

✓ **Localisation de l'oxydation protéique *in situ***

La lipoperoxydation et l'oxydation protéique sont des phénomènes fortement imbriqués et inter-dépendants, notamment au cours du chauffage où les vitesses de réaction sont décuplées (cf. Figure 11). Les travaux d'Astruc *et al.* (2007) ont mis en évidence au cours du chauffage que l'oxydation protéique semble s'initier en périphérie des cellules (coloration jaune), où se situe aussi la lipopéroxydation des phospholipides des membranes cellulaires. Ces travaux ont utilisé une méthode originale d'immunomarquage au dinitrophénylhydrazine (DNPH, marqueur de la fonction carbonyle) sur coupe tissulaire. Au cours du chauffage, le marquage s'intensifie plus fortement à la périphérie des membranes comparé à l'intérieur de la cellule et ce phénomène est d'autant plus marqué que la durée de chauffage est longue (Figure 13) et que la température est élevée.

Par contre pour des températures inférieures (65 et 95°C) et des durées très courtes (moins de 5 minutes, Gatellier *et al.* (2010a,b) n'ont pas observé d'oxydations protéiques en utilisant la méthode biochimique classique au DNPH. En revanche, pour une température en surface très élevée (type grillade « extrême » 123°C/207°C), le taux de carbonyles est augmenté d'un facteur 5 après 5 min. L'application de procédés de cuisson est incontestablement source d'une augmentation des carbonyles dans la viande et le couple temps/température revêt une importance à prendre en compte.

II.C. Agrégation protéique

Au cours des traitements technologiques et notamment thermiques, les protéines sont modifiées au niveau structural (dénaturation) et au niveau biochimique (oxydation). Ces modifications peuvent donner lieu à de nouvelles interactions de types protéines-protéines, protéines-lipides ou encore protéines-sucres menant ainsi à des phénomènes d'agrégation, comme le montre Estévez *et al.* (2011) et illustrés par la Figure 7 (cf. p28).

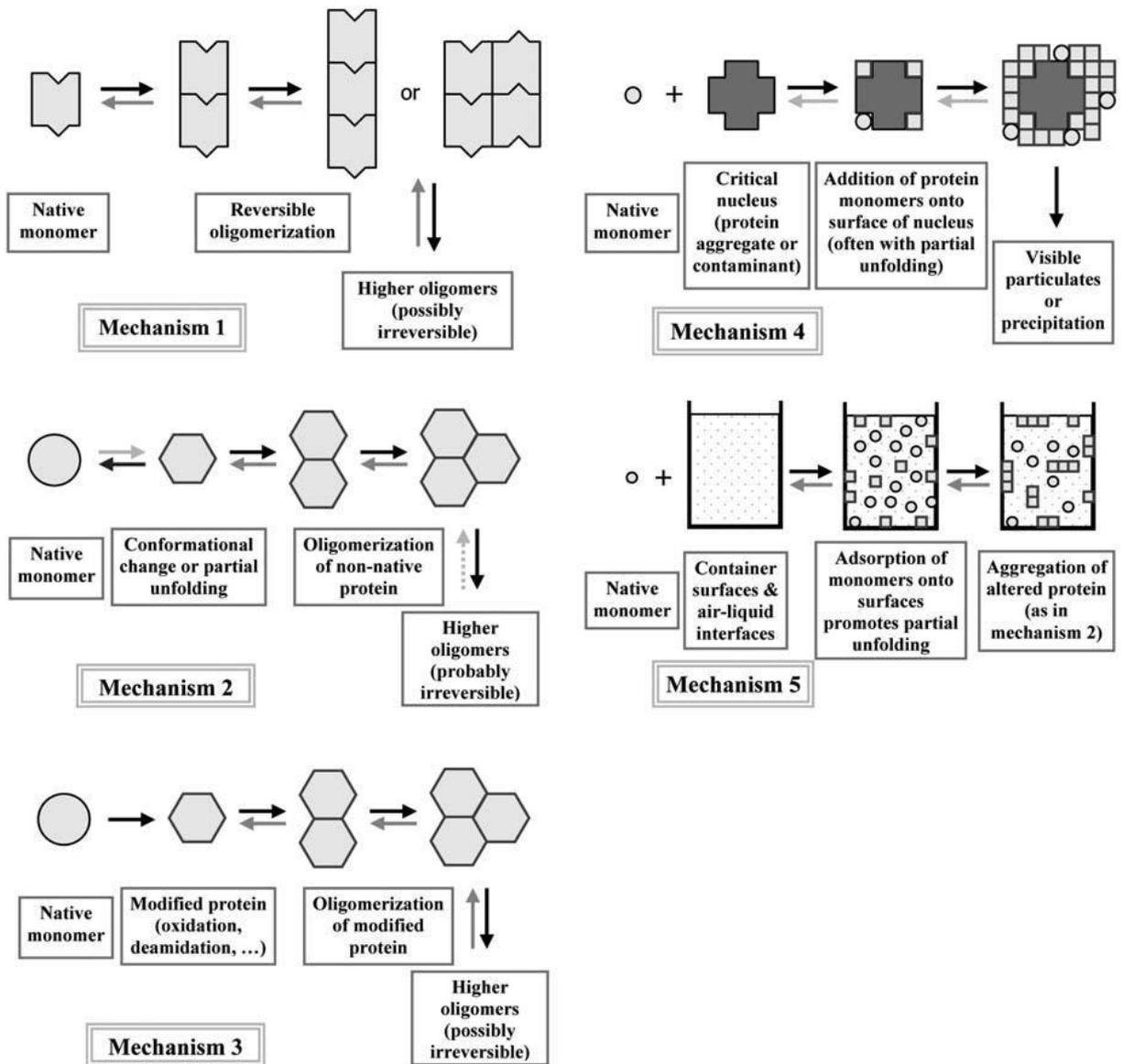


Figure 14 Illustration schématique de cinq mécanismes d'agrégation protéique. (Philo et Arakawa, 2009)

II.C.1) Les mécanismes

Roberts (2007) propose une revue générale sur les cinétiques d'agrégation des protéines réalisées *in vitro*. Dans cette revue, il est considéré deux types d'agrégation : l'agrégation non native qui se produit lorsque les protéines sont non natives c'est-à-dire qu'elles ne sont pas repliées correctement et éventuellement non fonctionnelles et l'agrégation native due à l'interaction de protéines fonctionnelles. Dans le premier cas, les particules non repliées vont ainsi se lier à d'autres pour former de nouvelles structures à savoir des agrégats très compacts, des gels, ou encore des types fibreux. Dans le deuxième cas, ce sont des protéines qui vont interagir entre elles pour former à leur tour aussi des gels, des agrégats plus fibrillaires que dans le premier cas.

Une revue générale plus récente de Philo et Arakawa (2009) propose aussi des mécanismes d'agrégation que l'on peut retrouver communément (Figure 14). Il a mis en évidence 5 mécanismes : le premier se base sur des associations réversibles de monomères natifs, le deuxième sur l'agrégation de monomères dont la conformation est altérée (dénaturation), le troisième sur l'agrégation de monomères chimiquement modifiés (oxydation, déamination), le quatrième sur l'agrégation de monomères autour d'un noyau pour former des vésicules et le dernier en milieu liquide montre une agrégation à la surface du liquide suite à des modifications conformationnelles. En fonction du modèle que l'on étudie l'un ou l'autre, voire plusieurs de ces mécanismes, peuvent être privilégiés.

II.C.2) Les interactions mises en jeu

Pour étudier les interactions mises en jeu, les études ont souvent porté sur des protéines isolées et non sur un mélange protéique qui s'avère plus complexe. L'agrégation résulte de nouvelles interactions entre les chaînes polypeptidiques, qu'elles soient liées à l'oxydation ou aux changements de conformation. La formation de carbonyles, de ponts disulfure ou dityrosine, les modifications de la charge et l'augmentation de l'hydrophobie à la surface des protéines provoquent des polymérisations et des agrégations protéiques (Davies *et al.*, 1987; Stadtman, 1990, 1993; Grune *et al.*, 2004). Or, dans le tissu musculaire, de nombreux composés possèdent potentiellement une capacité à favoriser l'agrégation. Il s'agit des sucres et des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique que les traitements technologiques risquent d'amplifier.

Les glucides simples comme les monosaccharides, tel que le glucose, peuvent être oxydés. Le glucose peut être considéré comme un piègeur de radicaux libres mais après cette réaction, il est à son tour oxydé (Sagone *et al.*, 1983). Cette molécule est capable de s'auto-oxyder afin d'être

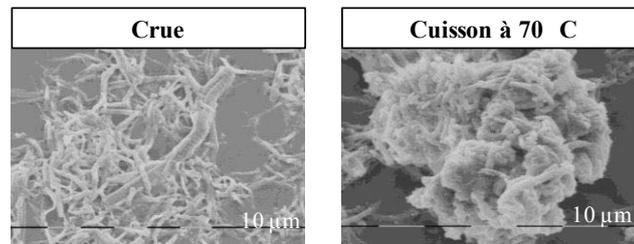


Figure 15 Observation de myofibrilles de porc en microscopie électronique à balayage. (Rémond et al., 2008)

activée ce qui lui permet d'interagir avec d'autres molécules, telles que les protéines conduisant à la formation de nouvelles structures. Un des exemples du pouvoir oxydant des sucres est la glycation, c'est-à-dire la glycosylation non enzymatique des protéines. Il s'agit d'une interaction entre les protéines contenant un groupement amine libre, comme celui de la lysine, avec un sucre réducteur présentant une fonction aldéhyde ou cétone libre. Les protéines ainsi modifiées, se réarrangent en bases de Schiff pour former un composé plus stable appelé composé d'Amadori, étape initiale de l'agrégation. Ces réactions sont de même nature si l'aldéhyde provient de la lipoperoxydation. Koschinsky *et al.*, (1997) ont montré que la formation de protéines glyquées (produits de la réaction de Maillard), était accrue de façon considérable lors d'un chauffage intense en présence de glucides et participait ainsi à la formation de ces agrégats. Dans le tissu vivant, les protéines chaperonnes (famille des HSP) jouent un rôle essentiel dans le repliement et la conformation des protéines pour prévenir l'agrégation protéique (Lindquist et Craig, 1988; Glover et Lindquist, 1998). L'action de l' α -cristalline (HSP 22 kDa) dans le maintien de l'activité enzymatique de la myosine et la prévention de son agrégation a été démontrée pour une température supra physiologique de 43°C (Melkani *et al.*, 2006). La stabilité et l'activité des HSP n'ont cependant pas été encore étudiées *post mortem* et lors des traitements technologiques. Dans le tissu musculaire, les protéines myofibrillaires, et en particulier la myosine, présentent une tendance à établir des interactions intermoléculaires pouvant mener à la gélification sous l'action d'éléments oxydants (Liu et Xiong, 2000a,b; Kamin-Belsky *et al.*, 1996; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2007) ou après traitement thermique (Liu et Xiong, 2000a,b; Lefèvre *et al.*, 2007). La caractérisation et l'étude des mécanismes sous-jacents à la formation des agrégats révèlent que l'oxydation de la myosine conduit à la formation de structures de haut poids moléculaires que les techniques classiques de séparation des protéines sur gel d'acrylamide ne permettent pas d'appréhender. Néanmoins, par des techniques de mesure de turbidité, de diffraction de lumière ou de microscopie, il est possible d'étudier la taille et la forme de ces structures (Figure 15).

Dans le tissu musculaire, selon que l'on considère les protéines sarcoplasmiques ou myofibrillaires, la température à partir de laquelle l'agrégation est détectée, varie. Pour la fraction sarcoplasmique, l'agrégation débute dès 40°C et s'arrête au-delà de 90°C. Elle a un rôle dans la consistance de la viande due à la formation de gel qui lie les différents éléments structuraux entre eux (Tornberg, 2005). Des mesures granulométriques sur l'état des protéines myofibrillaires en fonction de différentes températures et durées de chauffage montrent que le

nombre de particules diminue graduellement en fonction du temps pour des températures faibles (50, 60 et 70°C). Pour des températures supérieures à 80°C, la diminution est importante et a lieu dès les premières minutes de cinétique. En ce qui concerne la forme, on observe une augmentation de la circularité pour les températures supérieures à 80°C. La diminution du nombre de particules, associée à une augmentation de leur taille, suggère une agglomération des petites particules pour en former de plus grosses. Ainsi, lors d'une cuisson modérée (inférieure à 80°C), on observe une diminution du nombre des particules mettant en évidence un début d'agrégation qui devient plus prononcé avec une augmentation de la circularité pour des températures supérieures à 80°C (Promeyrat *et al.*, 2010a).

Si l'impact des procédés technologiques sur les modifications physicochimiques des protéines semble indéniable, les conséquences en termes de nutrition, de digestibilité, de biodisponibilité restent difficiles à appréhender car multifactorielles. En effet, certaines modifications vont entraîner ou non des pertes de fonction des protéines. L'effet peut donc être soit bénéfique soit néfaste. Cela dépend notamment du procédé utilisé, de la composition en oxydants/antioxydants et de la capacité à limiter la dénaturation protéique. Par exemple, Liu et Xiong (2000a,b) ont montré dans le cas de la myosine que quand celle-ci était oxydée, alors une augmentation de la protéolyse de la myosine était observée. Au contraire, une étude menée par Sun *et al.* (2011) a mis en évidence à partir de protéines myofibrillaires, qu'une température de 50°C n'influence pas la vitesse d'hydrolyse par la pepsine durant les trois premières heures. Concernant la digestion par la trypsine-chymotrypsine, ils ont observé une augmentation de la vitesse de protéolyse durant les 6 premières heures. Des travaux précédents rapportés par Gatellier et Santé-Lhoutellier (2009) avaient montré que la cuisson à 100°C pendant 10 ou 30 minutes réduisait la dégradabilité des protéines par les protéases du système digestif. Nous étudierons cela dans la prochaine partie de la synthèse bibliographique (Cf. parag. III.C p 75).

III. Qualités nutritionnelles de la viande

Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux viandes de boucherie (bœuf, porc, agneau, cheval) et à la volaille, en excluant les produits tripiers et les charcuteries. Au niveau des définitions usuelles, il faut noter que chez les anglo-saxons le terme "red meat" inclut la viande de porc, alors qu'en France le terme "viande rouge" regroupe uniquement le bœuf, l'agneau et le cheval.

De même, le terme "processed meat" concerne plus précisément la charcuterie, et n'inclut pas la viande de boucherie après cuisson. Ces précisions sont nécessaires pour l'interprétation des données épidémiologiques sur les relations entre la consommation de viande et la santé.

III.A. Place de la viande dans notre alimentation

En France, la consommation moyenne de viande (incluant les plats préparés) est d'environ 80 g/j pour les personnes de plus de 15 ans, avec une consommation totale en produits carnés (incluant charcuteries et produits tripiers) de 117 g/j (Hébel, enquête CCAF, 2007).

III.A.1) Les principales caractéristiques nutritionnelles

D'un point de vue nutritionnel, les viandes sont avant tout caractérisées par leur richesse en protéines. Avec le poisson, ce sont les aliments frais qui en contiennent le plus (20-25% du produit frais). La quantité de ces protéines est majoritairement conservée à la cuisson, bien que l'on en retrouve en faible quantité dans le jus de cuisson. Ainsi la viande contribue en moyenne à 25% des apports en protéines chez l'adulte (Hébel, enquête CCAF, 2007). De plus, ces protéines sont particulièrement riches en acides aminés indispensables, notamment en lysine et histidine, et elles ont un équilibre en acides aminés indispensables proche du besoin de l'Homme, de l'enfant à l'adulte. Cela signifie que l'efficacité de l'utilisation des acides aminés indispensables de la viande est potentiellement très élevée pour accroître ou renouveler les protéines corporelles et couvrir la plupart des besoins. Les lipides de la viande représentent une fraction beaucoup plus variable en quantité et en composition (Bauchart *et al.*, 2008). Celle-ci dépend largement du parage, réalisé par le boucher, du tissu adipeux intermusculaire des morceaux de viande. La teneur en lipides peut atteindre 14% du produit frais pour des produits extrêmes tels que le collier de bœuf (steak haché, 15%), mais en général elle est inférieure à 8% et à ce titre on ne peut pas considérer la viande comme un aliment gras (part des lipides dans l'apport énergétique inférieure à 35%). Ainsi, la viande ne contribue en moyenne qu'à 9% des apports en lipides chez les adultes (Hébel, enquête CCAF, 2007). Ces lipides sont caractérisés par une forte proportion d'acides gras saturés (40-50%), valeur élevée comparée à celle préconisée dans l'équilibre alimentaire journalier (25%). Même si sa teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI) est très modeste, la viande constitue une source significative d'AGPI: en moyenne 8% des apports totaux, et notamment d'AGPI à chaîne longue des séries n-6 et n-3. La viande n'apporte pas une quantité significative de glucides et n'est pas une source de fibres alimentaires. Par contre, c'est une bonne source de fer, zinc et sélénium. Ainsi, 100 g de viande cuite permettent de couvrir 25 à 40% des apports nutritionnels conseillés en fer chez l'adulte.

La viande possède 2 atouts : Le premier, le fer héminique qui représente 50 à 80% du fer de la viande, selon les espèces, est beaucoup mieux absorbé (coefficient d'absorption d'environ 25%) que le fer non héminique présent dans les légumes, légumes secs ou céréales (coefficient d'absorption entre 5 et 10%). Le deuxième, la viande améliore de deux à trois fois l'absorption du fer non héminique des autres aliments qui l'accompagnent au cours du repas (Coudray et Hercberg, 2001; Données CIV, 2010). En effet, son absorption est fortement influencée par des composés stimulateurs (la vitamine C, les acides citrique et lactique, la viande, le poisson et la volaille) et des composés inhibiteurs (l'acide phytique, les polyphénols et les protéines de soja) absorbés lors du même repas (Lynch, 1997). Les principales vitamines apportées par la viande sont la vitamine B12 (spécifique des aliments d'origine animale), les vitamines B2, B3 et B6. En revanche, la viande n'apporte pas certaines vitamines telles que celles des groupes C et D. Les apports vitaminiques sont beaucoup plus importants avec les abats et notamment le foie, en particulier pour la vitamine A et B9 (acide folique). Cependant, la viande étant cuite, les teneurs en vitamines peuvent de ce fait, être modifiées soit par dénaturation, soit dues aux pertes dans le jus de cuisson. D'après une revue générale de Leskovà *et al.* (2006), concernant les vitamines du groupe B, il est montré un taux de rétention de 72% des vitamines B2 dans la viande bouillie lentement. Pour de la viande de poulet, ce taux diminue avec des cuissons plus fortes et augmente avec des cuissons de types braisées ou micro-ondes, de plus il est variable en fonction du muscle. La vitamine B6 quant à elle montre des pertes de 6,5% sur de la viande frite, elle possède un taux de rétention de 23% pour la viande bouillie qui diminue entre 43-71% pour des cuissons plus fortes (grillade). La vitamine B12 est généralement considérée comme plutôt stable avec un taux de rétention de 66-78% pour de la friture. Etant soluble dans l'eau, la cuisson à l'eau fera perdre plus de vitamines B12 qu'une cuisson sèche. Pour la viande de bœuf, cuite ou crue, il est retrouvé une quantité moyenne de 3,17 µg de vitamines B12/100g (Benning et Ono, 1982) et 9,4 µg/100g pour le poulet cuit (Watanabe, 2007). Sa biodisponibilité dans la viande est supérieure à 60%, ce qui en fait une source importante.

La viande apparaît donc comme un aliment qui, par certains aspects, apporte les nutriments dont a besoin l'organisme dans des proportions adaptées (cas des acides aminés). En revanche, elle manque de certains autres. Elle doit donc s'intégrer dans une alimentation plus diversifiée qu'elle peut compléter.

III.A.2) La place de la viande dans une alimentation équilibrée

Comme aucun des nutriments traditionnellement pris en compte pour établir un régime équilibré ne lui est spécifique, il est possible de remplacer la viande par d'autres aliments. C'est ce que réalisent les régimes végétariens. Toutefois, des difficultés peuvent apparaître pour couvrir les besoins en vitamine B12, en fer et en zinc pour les personnes ayant des besoins accrus : enfants en croissance, femmes enceintes ou allaitantes, personnes âgées, sportifs.

La prise en compte de l'ensemble des recommandations alimentaires conduit à préconiser, chez l'adulte, une consommation de viande (blanche et rouge) de l'ordre de 120 g/j, 5 jours sur 7, en réservant les 2 autres jours au poisson (World Cancer Research Fund, 2007). Dans ce cadre, la part des apports journaliers qui est assurée par la viande est variable selon les nutriments. Elle est supérieure à 60% pour certains acides aminés indispensables, la vitamine B12 et le zinc, à 40% pour les protéines, la niacine (vitamine B3) et le cholestérol, à 20% pour le fer, le sélénium, la riboflavine (vitamine B2), la vitamine B6 et l'acide pantothénique (vitamine B5) et les acides gras saturés. En revanche, elle n'est ni une source appréciable d'acides gras polyinsaturés, de magnésium, de sodium et de calcium, ni de thiamine, d'acide folique et de vitamine E, et n'apporte pratiquement pas de vitamines A, D et C.

Une augmentation de la portion de viande conduit à accroître les apports en vitamine B12, zinc, cholestérol et protéines, ce qui ne présente pas de risque particulier si l'augmentation est modérée et, peut même être intéressant pour les personnes âgées. Ainsi, la consommation de viande plus de 4 fois par semaine était associée à une réduction du risque de mortalité et d'accidents vasculaires chez des personnes d'au moins 75 ans (Jamrozik *et al.*, 2000). Toutefois, une augmentation excessive (consommation supérieure à 150-200 g/j notamment de viandes grasses) conduit à des déséquilibres plutôt par excès de certains nutriments dont la viande est riche comme le fer, les acides gras saturés, le cholestérol, que par des carences, car les quantités d'aliments (ou d'énergie) substituées sont faibles.

En conclusion, il apparaît que la viande (plutôt maigre) a sa place dans la plupart des régimes équilibrés, même dans ceux prévus pour réduire les risques cardiovasculaires ou pour assurer une perte de poids régulière. En effet, en quantités modérées, elle contribue efficacement à améliorer la qualité des protéines du régime, à assurer la fourniture de vitamines B12 et B6, à prévenir des maladies cardiovasculaires (métabolisme de l'homocystéine) et à assurer la couverture des besoins en fer et en zinc, sans accroître la charge lipidique et induire du stress oxydant (Hodgson *et al.*, 2006).

III.B. Consommation de viande et santé

Le développement des études d'épidémiologie nutritionnelle a permis de constater que divers risques pathologiques pouvaient être associés au défaut ou à l'excès de consommation de viande.

III.B.1) Anémie et autres carences

L'absence de viande dans l'alimentation accroît les risques d'anémie par carence en fer et éventuellement en vitamine B12. De plus, des troubles du comportement et des performances intellectuelles ont été reliés à un éventuel déficit en fer et zinc. Dans les pays développés, cette carence est, chez les femmes non-ménopausées, l'une des plus fréquentes. Ainsi, l'étude SU.VI.MAX réalisée en France, auprès de 6648 femmes âgées de 35 à 60 ans indique que près de 23% d'entre elles avaient un statut martial précaire et que plus de 4% étaient anémiées. Une enquête alimentaire réalisée auprès de 3111 de ces femmes a montré que 93% des femmes non-ménopausées avaient des apports en fer inférieurs à l'apport conseillé (18 mg). Le principal facteur nutritionnel associé à cette carence était la consommation de viande. Il en était de même pour l'anémie (Galan *et al.*, 1998). En effet, la viande constitue une source majeure de fer assimilable (fer héminique) et de zinc, et elle favorise également l'assimilation du fer non héminique (Coudray et Hercberg, 2001). D'autre part, chez les jeunes enfants, la viande devrait aussi pouvoir être introduite précocement pour compléter l'alimentation lactée après 6 mois (Krebs, 2007). Chez l'enfant de 18 mois, les réserves en fer sont améliorées si de petites portions de viande ou de poisson sont incluses dans leur alimentation (Cowin *et al.*, 2001) et un complément à base de viande est plus efficace pour améliorer la croissance ainsi que les capacités physiques et cognitives d'écoliers kenyans qu'un complément à base de lait (Neumann *et al.*, 2007). Dans ce contexte, la consommation de viande paraît être un facteur déterminant pour améliorer le statut martial (Hambraeus, 1999).

La vitamine B12 se trouvant exclusivement dans les produits animaux, les régimes végétariens tendent également à conduire à des apports insuffisants et à un statut réduit en vitamine B12, associés avec une augmentation de l'homocystinémie. L'hyperhomocystinémie est considérée comme un facteur de risques pour les maladies cardiovasculaires (Cacciapuoti, 2011). L'homocystéine est produite à partir du métabolisme de la méthionine et l'élévation de sa concentration est généralement liée à des déficiences en vitamines B (B9, B6, B12, B2).

III.B.2) Maladies cardiovasculaires

Sur la base d'études épidémiologiques, la consommation de viande, et particulièrement de viande de boucherie, a par le passé été associée à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (MCV), avec pour principal déterminant la composition en acides gras des lipides de la viande, notamment la teneur en acides gras saturés. La mise en évidence des limites méthodologiques de ces études ont clairement remis en question cette association (McAfee *et al.*, 2010), et une récente méta-analyse, à partir d'une revue exhaustive des données de la littérature, ne retrouve aucun lien entre la consommation de viande de boucherie et l'incidence des maladies cardiovasculaires (Micha *et al.*, 2010).

Les recommandations alimentaires pour réduire les maladies cardiovasculaires sont de limiter la consommation de matière grasse et plus particulièrement d'acides gras saturés (AGS), et d'acides gras *trans* en raison de leurs effets hypercholestérolémiants. Même si les lipides des viandes sont riches en AGS, comme leur teneur en lipides totaux est modeste, elles contribuent seulement à 8% des apports d'AGS dans notre alimentation (Hébel, enquête CCAF, 2007). Les viandes produites aujourd'hui étant de plus en plus maigres. En ce qui concerne les acides gras *trans*, il semble que ceux présents dans les viandes, notamment l'acide trans-vaccénique qui est majoritaire, n'aient aucun effet sur les concentrations en cholestérol total ou LDL (low density lipoprotein) (Chardigny, 2008). La plupart des études d'interventions montrent maintenant qu'il n'y a pas de lien entre la consommation de viande de boucherie (quel qu'elle soit) et les marqueurs de risques de maladies cardiovasculaires (McAfee *et al.*, 2010). L'incorporation de viande maigre de bœuf dans un régime équilibré semble même pouvoir limiter le risque de maladies cardiovasculaires (Roussel *et al.*, 2012).

La viande contient des acides gras polyinsaturés à longue chaîne n-3 (LCn-3 PUFA) : acides eicosapentaénoïque (EPA), docosapentaénoïque (DPA), et docosahexaénoïque (DHA). Ceux-ci sont reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé du cœur et des artères. Leur concentration dans la viande est variable en fonction de l'alimentation des animaux. Les consommateurs de viande ont généralement des concentrations plasmatiques en LCn-3 PUFA supérieures aux végétariens (Rosell *et al.*, 2005; Mann *et al.*, 2006).

Enfin, à apport énergétique équivalent, la viande maigre est plus efficace que des glucides pour réduire la pression artérielle systolique chez des personnes souffrant d'une hypertension modérée (Hodgson *et al.*, 2006).

Cela pourrait être un effet des protéines carnées et plus particulièrement leur aptitude à libérer des peptides possédant une activité antihypertensive (Bauchart *et al.*, 2007a,b).

III.B.3) Composition corporelle - Contrôle du poids

Le surpoids a souvent été associé à la consommation de viande (Maskarinec *et al.*, 2000) et il est généralement admis que l'indice de masse corporelle des végétariens est inférieur à celui des non-végétariens. Pourtant, les protéines sont considérées comme plus efficaces que les glucides pour accroître la perte de poids dans les régimes à faibles teneurs en lipides. Cela tient d'une part, à un effet satiétogène plus important et d'autre part, à une thermogenèse postprandiale plus élevée. Il semble exister des différences entre les sources de protéines. Ainsi, la consommation de viande de porc est plus efficace pour accroître la dépense énergétique (Mikkelsen *et al.*, 2000) que celle des protéines de soja. Il existe également des différences entre les viandes, et dans un régime hypocalorique (réduction de 500 kcal/j), la viande de bœuf maigre est aussi efficace que la viande de poulet pour réduire le poids du corps, améliorer sa composition et normaliser les paramètres du profil lipidique sanguin (Melanson *et al.*, 2003). Cela peut permettre de varier les régimes hypocaloriques et d'accroître la compliance à ces régimes.

III.B.4) Ostéoporose

Trois millions de femmes touchées en France, une femme sur deux après 50 ans sont atteintes d'ostéoporose. Des études épidémiologiques ont suggéré que l'incidence de la fracture du col du fémur était corrélée positivement à la consommation de protéines et notamment de protéines animales et négativement à la consommation de protéines d'origine végétale (Frassetto *et al.*, 2000). La viande particulièrement a fait l'objet de nombreuses attaques en raison d'un potentiel acidifiant, lié à sa teneur en phosphates et acides aminés soufrés. L'hypothèse étant que pour rétablir l'équilibre acido-basique, le corps mobilise des éléments alcalinisants présents dans l'os : citrate et bicarbonate. Comme ils sont liés à du calcium, ce calcium serait alors éliminé dans les urines. Cependant, la comparaison d'un régime riche en protéines de soja à un régime riche en protéines de viande n'a montré aucun avantage du régime riche en protéines végétales par rapport aux protéines de la viande (Kerstetter *et al.*, 2006). En outre, une consommation suffisante en protéines permet de mieux conserver la masse osseuse (Hannan *et al.*, 2000) et de mieux récupérer des fractures ostéoporotiques (Munger *et al.*, 1999).

De plus, il n'y a pas de différences dans le taux de rétention du calcium ou la santé osseuse avec un régime riche (environ 300 g/j) ou pauvre en viande (environ 50 g/j) chez des femmes ménopausées en bonne santé (Roughead *et al.*, 2003).

L'augmentation des pertes urinaires en calcium observée avec le régime riche en viande étant compensée par une augmentation du taux d'absorption (Cao *et al.*, 2011). Des méta-analyses récentes montrent que ni les bilans calciques ni la résorption osseuse ne sont liés à la charge acide des régimes alimentaires, et que les régimes riches en phosphate, contrairement à l'hypothèse initiale, diminuent l'élimination urinaire du calcium et améliorent le bilan calcique (Fenton *et al.*, 2009). Il est également intéressant de noter qu'une étude sur cohorte a montré que chez des végétariens ayant un apport protéique limité, le risque de fracture du poignet est accru (Thorpe *et al.*, 2008).

III.B.5) Viande et cancers

En 2007, le World Cancer Research Fund (WCRF) conclue, au regard des études épidémiologiques, qu'il existe une association convaincante entre la consommation de viande rouge et l'incidence des cancers colorectaux (11% des cancers totaux). Cette association, qui est nette pour les charcuteries, est de plus faible amplitude pour les viandes rouges. Ces conclusions ont été critiquées, d'abord sur le critère de choix des études retenues dans l'expertise (Truswell, 2009), mais surtout sur la présence de colinéarité entre la consommation de viande rouge et d'autres facteurs : forte consommation de sucres raffinés et d'alcool, faible consommation de fruits et légumes, forte prévalence de fumeurs, faible activité physique et surpoids (Alexander et Cushing, 2010). Les études cas-témoins sont également peu probantes, la plupart ne permettant pas de mettre en évidence d'associations significatives (Yoon *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2007; Saebo *et al.*, 2008; Tabatabaei *et al.*, 2011). La dernière méta-analyse sur des études prospectives semble cependant confirmer l'association entre le cancer colorectal et la consommation de viande rouge, avec un risque relatif de 1,17 (intervalle de confiance de 95% = 1,05-1,31) pour une augmentation de l'ingestion de 100 g/j (Chan *et al.*, 2011). La controverse est donc loin d'être éclaircie. D'autant plus qu'une étude, sur une cohorte européenne, montre que le risque de cancer colorectal est plus élevé chez les végétariens que chez les consommateurs de viande (Key *et al.*, 2009). L'absence et la consommation excessive pourraient donc être toutes deux néfastes. Certaines études tiennent compte de la consommation quantitative de la viande afin de distinguer les faibles mangeurs des gros mangeurs, d'autres distinguent le type de viande rouge ou blanche (Bingham *et al.*, 2002).

Lorsqu'on compare la viande rouge et la viande blanche, il n'est souvent noté aucune connotation négative de la viande blanche et le risque associé à des maladies cardiovasculaires ou des cancers est nul.

En France, dans le cadre du Plan National Nutrition Santé (PNNS), il est ainsi recommandé de limiter à 500 g/semaine la consommation de viande de boucherie (poids après cuisson), et d'alterner avec de la volaille et du poisson. Ce qui est en parfait accord avec la composition d'un régime équilibré tel que défini précédemment.

Les facteurs responsables pourraient être des molécules produites lors de la cuisson de la viande (amines hétérocycliques: HCAs, hydrocarbures aromatiques polycycliques: PAHs tels que les benzopyrènes) ou de sa digestion. L'exposition à ces molécules augmente en fonction de la quantité de viande consommée (Hughes *et al.*, 2001; Bingham *et al.*, 2002; Kuhnle et Bingham, 2007).

Le rôle des HCAs semble moins important qu'initialement suspecté, d'une part parce que la viande de volaille contribue majoritairement à l'apport alimentaire de HCAs et que sa consommation n'est pas associée au risque de cancer colorectal, d'autre part parce que la dose de HCAs qui conduit au développement du cancer chez le rat et le singe est plus de 1000 fois supérieure à l'apport par la viande cuite chez l'Homme (Santarelli *et al.*, 2008).

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer un lien entre les protéines de la viande et l'incidence du cancer colorectal. L'ingestion de fortes quantités de protéines, ou celle de protéines résistantes à la digestion par les enzymes digestives, conduit à l'accroissement de la quantité de protéines entrant dans le côlon. Ainsi, la quantité de protéines qui échappe à la digestion dans l'intestin grêle augmente avec la quantité de viande ingérée (Silvester et Cummings, 1995).

A l'intérieur du côlon ces protéines seront dégradées par la flore résidante. Cette dégradation conduit à la production de nombreux métabolites (ammoniaque, sulfure d'hydrogène, phénol, crésol, polyamines, oxyde nitrique, composés N-nitrosés,...) pouvant interférer avec la santé de l'épithélium colique (Blachier *et al.*, 2007; Windey *et al.*, 2012). Une forte augmentation de la quantité de viande ingérée s'accompagne d'une augmentation de la production de composés N-nitrosés (NOCs) et de sulfure d'hydrogène dans le côlon (Bingham *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2000), deux molécules suspectées d'induire des mutations dans l'épithélium colique, et globalement on observe une augmentation de la génotoxicité des eaux fécales (Pearson *et al.*, 2009).

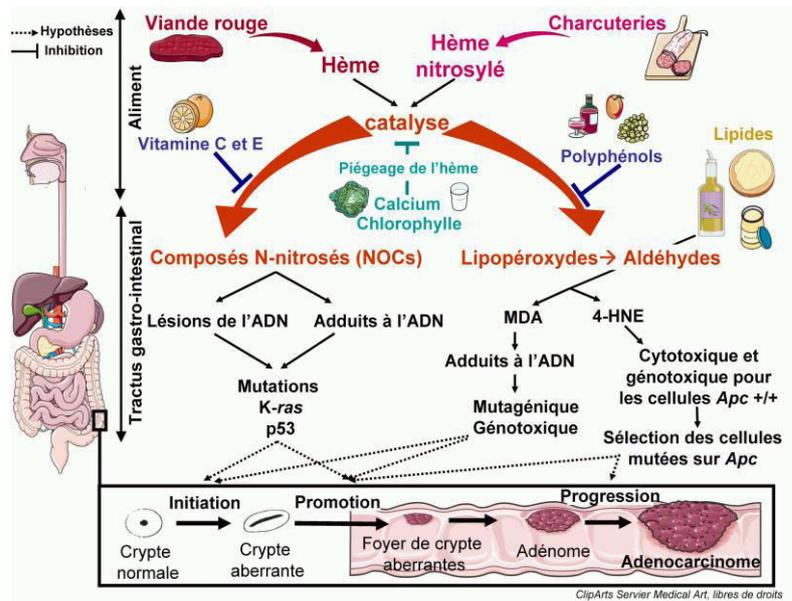


Figure 16 Mécanismes potentiels par lesquels l'hème de la viande favorise la cancérogénèse intestinale. (Pierre et al., 2010)

Une partie des sulfures produits dans le côlon proviennent de la fermentation des acides aminés soufrés (méthionine, cystéine) ou de leurs dérivés comme la taurine. Ceux-ci sont abondants dans la viande. Le sulfure d'hydrogène est suspecté d'être impliqué dans l'étiologie de la colite ulcéreuse (Blachier *et al.*, 2007), il pourrait également induire des dommages génomiques dans l'épithélium colique (Windey *et al.*, 2012). Il faut cependant noter que cet épithélium possède une forte capacité de détoxification des sulfures, notamment par leur conversion en thiosulfates (Levitt *et al.*, 1999).

Les NOCs sont produits par la réaction des nitrites ou des oxydes d'azote avec les amines secondaires et les N-alkylamides. Il a été montré que la quantité de NOCs augmente largement entre la bouche et les fèces (Hughes *et al.*, 2001). De nombreux NOCs, dont les nitrosamines, peuvent former des adduits avec l'ADN, et sont carcinogéniques. De tels adduits ont pu être mis en évidence dans les desquamations cellulaires coliques chez des volontaires sains recevant de la viande (Lewin *et al.*, 2006). Comme la viande blanche n'est pas impliquée dans la relation avec le cancer colorectal, un lien entre le fer héminique et les NOCs dans la promotion des cancers est privilégié. L'hème peut être facilement nitrosylé et peut catalyser la formation de NOCs, et l'augmentation de l'ingestion d'hème entraîne une augmentation de la teneur en NOCs des fèces (Cross *et al.*, 2003).

Les cancers colorectaux pourraient également être expliqués par une augmentation de la peroxydation lipidique par la voie des aldéhydes. En effet, *in vitro*, un mélange d'hémoglobine et d'acides gras polyinsaturés oxydés est suffisant pour induire la formation non-enzymatique de radicaux peroxydes (Sawa *et al.*, 1998). Des études chez le rat, montrent que la promotion de la cancérogenèse par l'hème est associée à un biomarqueur de peroxydation lipidique (le 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid ou DHN-MA) que l'on trouve dans l'urine (Pierre *et al.*, 2004). L'excrétion urinaire du DHN-MA est augmentée significativement aussi dans l'urine de volontaires mangeant du boudin noir, très riche en hème (Pierre *et al.*, 2006b). Le MDA (produits de la lipoperoxydation) est mutagène, et forme des adduits à l'ADN. Cependant, le mécanisme de la promotion semble venir principalement d'une résistance sélective des cellules précancéreuses à la peroxydation lipidique induite par l'hème : le 4-HNE induit la mort cellulaire (apoptose) des cellules normales mais pas des cellules mutées sur le gène Apc (gène actif durant les phases précancéreuses) (Pierre *et al.*, 2006a; Figure 16).

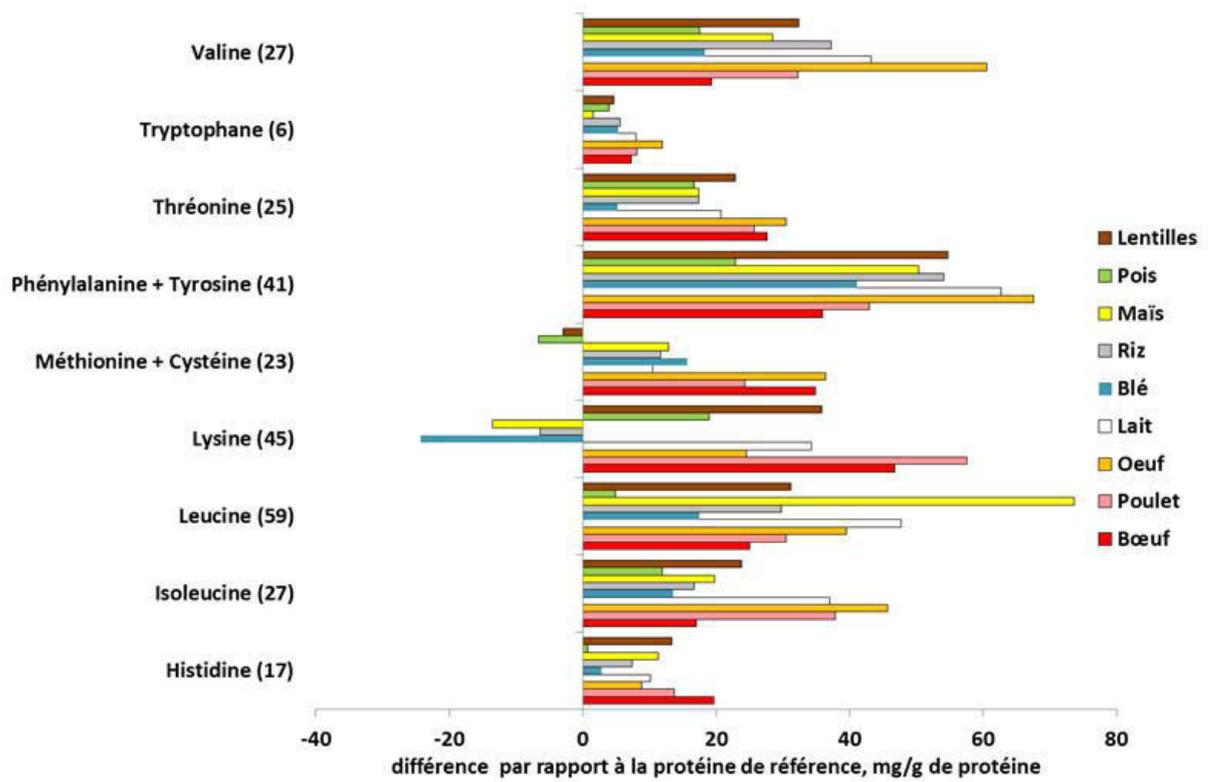


Figure 17 Positionnement de différentes sources alimentaires par rapport à la composition de la protéine de référence. (données entre parenthèses références issues de l'Afssa, 2007 et valeurs nutritives des aliments adaptées d'après Souci et al., 2000)

Plus récemment, une nouvelle hypothèse est apparue dans la littérature. En partant du constat que la relation entre la consommation de viande et l'incidence du cancer colorectal correspond aux régions où la consommation de viande de bœuf est élevée (zur Hausen, 2012). Des agents infectieux spécifiques aux bovins pourraient être transmis à l'Homme après consommation de viande crue ou peu cuite. Ces agents pourraient être relativement thermorésistants et développer leur activité carcinogénique en synergie avec les carcinogènes chimiques issus des procédés de transformation.

Certaines études épidémiologiques (cas-témoins) sur les causes du cancer du pancréas suggéraient que l'une d'elles pouvait être la consommation excessive de viandes rouges grillées au barbecue (Anderson *et al.*, 2002, 2005) mais cela n'a pas été mis en évidence dans la seule étude de cohorte importante (Michaud *et al.*, 2003). En ce qui concerne le cancer du sein, des résultats contradictoires ont été rapportés : association possible avec la consommation de viande rouge, en particulier chez les femmes ménopausées (Taylor *et al.*, 2007), et dans le cas de grande friture (Dai *et al.*, 2002), ou absence d'association (Missmer *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2003). La consommation importante de viande rouge grillée a aussi été associée à une augmentation du risque de cancer de la prostate (Tang *et al.*, 2007). Bien que cette association ait été remise en question par une récente méta-analyse des études prospectives (Alexander et Cushing, 2010), le doute subsiste pour la viande de boucherie bien cuite ou cuite au barbecue (Punnen *et al.*, 2011). La consommation de viande est nettement associée avec le risque de cancer de l'estomac dans plusieurs études, les résultats les plus convaincants venant de l'étude EPIC (Jakszyn *et al.*, 2011), qui associe le fer héminique au risque de cancer gastrique.

III.C. Qualités nutritionnelles des protéines de la viande

III.C.1) Composition en acides aminés indispensables

La qualité nutritionnelle d'une protéine est avant tout déterminée par sa composition en acides aminés indispensables (AAI). Cette qualité s'évalue par rapport à un profil de référence, basé sur les besoins respectifs des différents AAI pour l'organisme. Ce profil de référence (protéine de référence en mg/g de protéines) a été estimé à partir d'un besoin en acides aminés de 0,66g/kg/j de protéines (Afssa, 2007). La Figure 17 illustre le bon positionnement des viandes par rapport aux autres sources de protéines en termes d'équilibre en acides aminés.

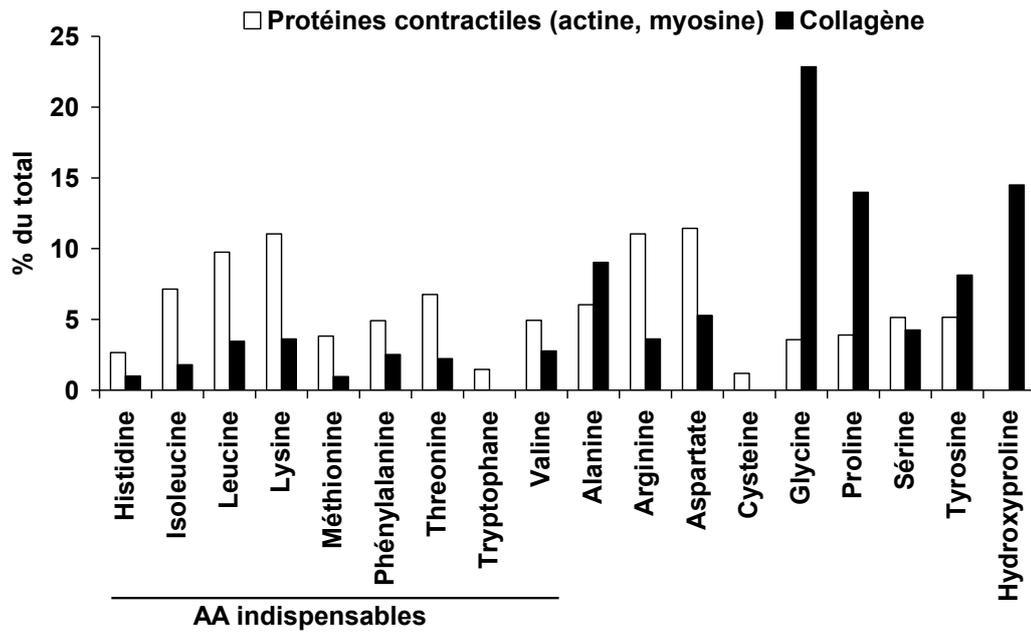


Figure 18 Composition en acides aminés des protéines contractiles et du collagène de bovin. (Tomé, 2008)

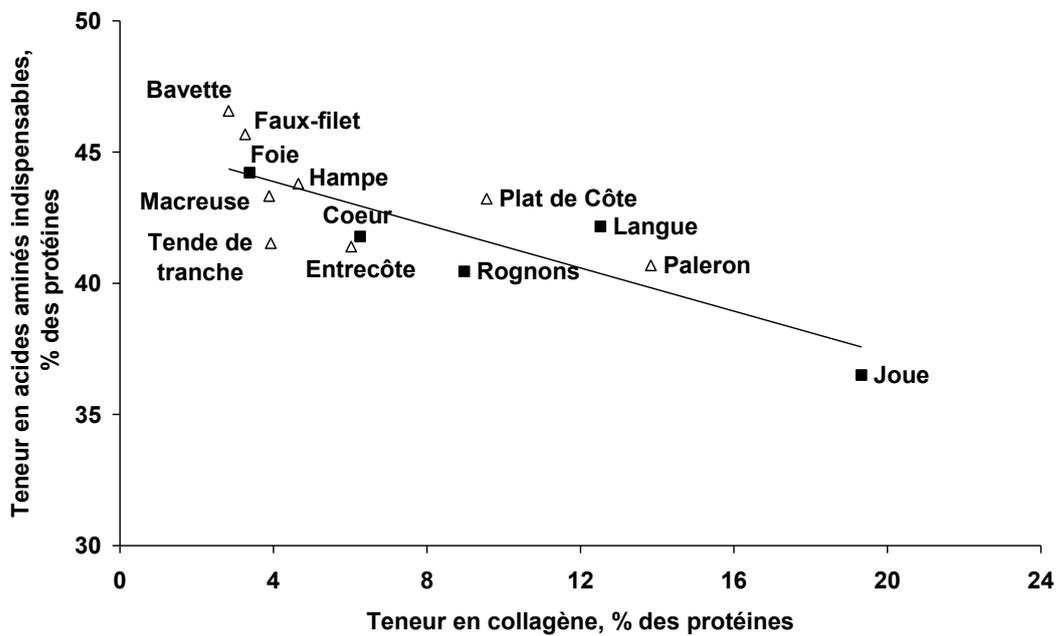


Figure 19 Relation entre les teneurs en collagène et acides aminés indispensables dans les viandes (△) et abats de bovin (■). (Rémond et al., 2010)

La composition en acides aminés des différentes sortes de viandes est très semblable. Elle est essentiellement influencée par la teneur du muscle en collagène, dont la composition en acides aminés est très particulière (pauvre en AAI, carencé en tryptophane, riche en proline, hydroxyproline et glycine) (Figure 18). Ainsi, plus la viande est riche en collagène moins elle contient d'AAI (Figure 19). Il faut cependant noter que même pour des teneurs extrêmes en collagène (20% dans la joue) l'impact sur la composition en AAI reste modéré (Figure 20).

La stricte composition en AAI n'est cependant pas suffisante pour prédire la qualité des protéines, car elle ne tient pas compte de la digestibilité des protéines et de la biodisponibilité des acides aminés. Il est donc important de bien connaître les différents facteurs qui vont déterminer l'absorption des acides aminés dans l'intestin grêle.

III.C.2) Devenir digestif des protéines de la viande

Chez l'Homme, l'utilisation digestive des protéines de la viande cuite mesurée sur l'ensemble du tractus digestif est très élevée (97-100%, Young *et al.*, 1975). Des études chez le rat suggèrent que cette valeur n'est pas affectée par la teneur en collagène de la viande (Laser-Reutersward *et al.*, 1982). Les mécanismes de la digestion, de la bouche au côlon, semblent donc très efficaces vis-à-vis de la plupart de ces protéines.

✓ Phase buccale

La cavité buccale représente le premier compartiment dont dispose l'organisme pour remplir son rôle dans la digestion en préparant l'aliment à son assimilation. Cette étape buccale est d'autant plus importante que l'aliment est solide et cohésif, ce qui est le cas de la viande. Une étude réalisée chez l'Homme jeune relate ainsi un effet significatif de la mastication sur la digestibilité des produits carnés dans l'ensemble du tractus digestif (Farrell, 1956).

Au cours de la mastication, la bouchée d'aliment est d'abord déstructurée mécaniquement par des actions de compression et de cisaillement entre les dents, auxquelles s'ajoute le travail de la langue. L'aliment est ainsi réduit en particules de plus petites tailles que la langue rassemble. Au fur et à mesure de leur réduction, les particules sont mélangées à la salive dont la libération est stimulée par l'action mécanique de mastication et l'action chimique due à des composés gustatifs contenus dans l'aliment (Humphrey et Williamson, 2001).

Dans le cas de la viande, la dégradation mécanique consiste en la déstructuration et la désorganisation de l'architecture des fibres musculaires. Plus le nombre de cycles de mastication

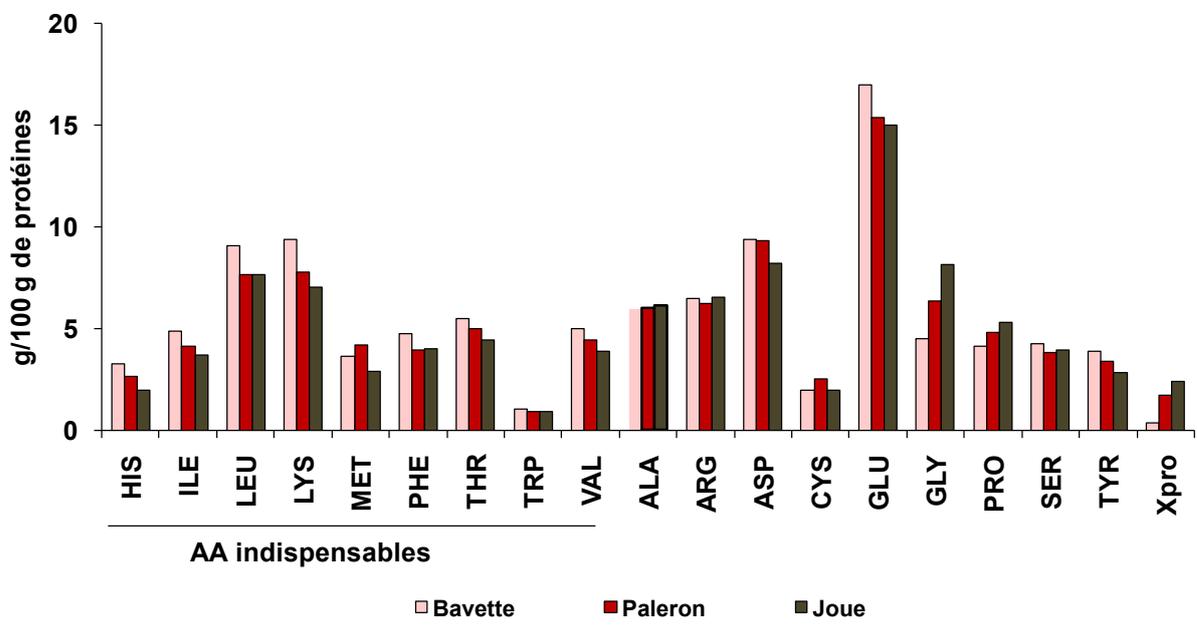


Figure 20 Composition en acides aminés de viandes et abats bovin se différenciant par leur teneur en collagène. (Rémond et al., 2010)

augmente avant la déglutition, plus la viande est déstructurée et plus le bol alimentaire ou bolus est imprégné de salive (Mioche *et al.*, 2003). Les contraintes de cisaillement entre les dents sont prépondérantes dans cette action au cours de laquelle la salive est incorporée et éventuellement mélangée au jus libéré par la matrice fibreuse. La texture initiale de la viande influence le temps de mastication et son efficacité. Les viandes les plus dures donnent ainsi des bolus déglutis plus durs malgré l'augmentation du nombre de coups de dents, de l'intensité du travail musculaire des mâchoires et de l'imprégnation salivaire. Dans des conditions normales d'état dentaire, la mastication est une fonction qui s'adapte en permanence à la structure initiale de l'aliment et au bol qui se forme. Cependant, chez les personnes âgées, malgré l'allongement des séquences de mastication, les morceaux de viande déglutis sont moins déstructurés que chez des sujets jeunes (Mioche *et al.*, 2004) et la baisse d'efficacité masticatoire observée chez les personnes porteuses de prothèses complètes accentue encore la baisse de déstructuration des bols déglutis, quel que soit l'aliment ingéré (Yven *et al.*, 2005; Mishellany-Dutour *et al.*, 2008).

✓ **Digestion dans l'estomac**

La digestion gastrique permet de réduire la taille des particules entrant dans l'estomac par l'action combinée du péristaltisme gastrique et de la digestion acide. Le temps de comminution/fragmentation sera d'autant plus long que les particules dégluties sont de tailles importantes. Ainsi il a été montré que pour un repas contenant des cubes de jambon, plus la déstructuration de l'aliment par la mastication est importante plus le temps de vidange gastrique diminue (Pera *et al.*, 2002). Des mesures réalisées par scintigraphie, avec des morceaux de foie de volaille, montrent également que le temps moyen de séjour dans l'estomac est plus long (117 vs 70 min) lorsque la taille des morceaux ingérés est importante (10 vs 0,25 mm) (Weiner *et al.*, 1981).

En ce qui concerne la comminution des particules, un temps de séjour plus long dans l'estomac peut ainsi permettre de compenser un défaut de mastication. Toutefois, cet allongement de la phase stomacale peut avoir des répercussions importantes sur le temps d'exposition aux enzymes gastriques, et donc sur la nature des produits entrant dans le duodénum, ainsi que sur la cinétique d'absorption des nutriments.

La digestion des protéines de la viande, dans le compartiment gastrique, est peu documentée. La résultante de cette digestion, après l'ingestion de repas constitués de viande ou de poisson, a été étudiée chez le porc, en prélevant en cinétique le contenu digestif entrant dans l'intestin grêle à l'aide d'une canule implantée dans le duodénum (Bauchart *et al.*, 2007b).

Les résultats montrent que dans les 3 h qui suivent l'ingestion du repas 74% de la viande et 90% du poisson ont été évacués de l'estomac. La texture plus compacte de la viande pourrait expliquer le temps de séjour dans l'estomac légèrement supérieur à celui du poisson. Outre sa rapidité, la digestion gastrique est également très efficace. En effet, aucun peptide, précédemment détecté dans la chair de truite cuite et dans la viande bovine cuite, n'a été mis en évidence dans le contenu duodéal après l'ingestion de ces mêmes aliments, indiquant que ceux-ci sont rapidement dégradés dans l'estomac (Bauchart *et al.*, 2007a; Bauchart, 2006). De plus, alors que les peptides mis en évidence dans la chair de truite et la viande bovine avaient une masse allant jusqu'à 5 kDa, ceux détectés dans le contenu duodéal avaient une masse inférieure à 2 kDa. Ces peptides sont caractéristiques de l'hydrolyse par la pepsine avec notamment de nombreuses séquences avec un acide aminé aromatique en position N-terminale. Les peptides identifiés proviennent principalement de l'actine et de la myosine. Environ 20% des peptides identifiés sont retrouvés de façon quasi constante dans les contenus duodéaux (si on compare les contenus digestifs de différents animaux). Par ailleurs, il est particulièrement intéressant de noter que 6 séquences peptidiques sur 18 sont identifiées de manière reproductible dans les contenus duodéaux, après l'ingestion de chair de truite, et étaient exactement les mêmes que celles issues de viandes bovines. Il s'agissait de fragments d'actine (96-106, 171-178, 24-33), de chaîne lourde de myosine (835-842), de créatine kinase (195-204), et de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou GA3PDH (232-241). Cette observation est surprenante compte tenu des matrices différentes que représentent la chair de truite et de la viande bovine en termes de teneur en collagène, de texture et de structure. Une étude complémentaire montre que suite à l'ingestion de faux-filet grillé ou de paleron braisé on retrouve également dans les contenus duodéaux les fragments d'actine 96-106 et 171-178, ainsi que celui de GA3PDH (Bauchart, 2006). Il semble ainsi que certains peptides sont générés de façon constante au cours de l'hydrolyse gastrique, quel que soit le muscle originel et son mode de préparation.

Il n'y a actuellement pas de données sur l'impact des modifications structurales générées par les traitements technologiques des viandes, sur leur digestion *in vivo* dans l'estomac. Les modèles de digestion *in vitro* montrent cependant clairement un effet négatif de l'augmentation des dommages oxydatifs des protéines carnées sur leur vitesse de digestion par la pepsine (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2007). Des résultats identiques ont depuis été rapportés dans la littérature (Sun *et al.*, 2011).

Tableau 2 Digestibilité réelle dans l'intestin grêle de différentes protéines, chez l'Homme

Aliment	Digestibilité iléale réelle (%)	Références
Farine de blé (toast)	90,3	Bos <i>et al.</i> , 2005
Farine de lupin	91,0	Mariotti <i>et al.</i> , 2002
Isolat de soja	91,5	Mariotti <i>et al.</i> , 1999
Protéines de pois	89,9	Mariotti <i>et al.</i> , 2001
Protéines de colza	84,0	Bos <i>et al.</i> , 2007
Œuf (cru/cuit)	51,3-90,9	Evenepoel <i>et al.</i> , 1998
Caséine	98,0	Deglaire <i>et al.</i> , 2009
Bœuf	94,3	Silvester et Cummings, 1995

✓ **Digestion dans l'intestin grêle**

Dans l'intestin grêle, les produits de dégradation des protéines par la pepsine sont de nouveau clivés par les enzymes pancréatiques (trypsine, α -chymotrypsine, carboxypeptidases, élastase) qui libèrent un mélange d'acides aminés libres et de petits peptides. Les acides aminés libres peuvent être directement transportés dans les entérocytes. Les di- et tri-peptides sont, soit hydrolysés par les aminopeptidases membranaires des entérocytes, soit transportés dans les entérocytes avant d'être hydrolysés par les peptidases cytoplasmiques.

La digestibilité dans l'intestin grêle des protéines de la viande a été rarement mesurée chez l'Homme en raison des difficultés de prélèvements d'effluents iléaux. L'unique étude dans le domaine, réalisée sur des patients iléostomisés, suggère que la digestibilité des protéines carnées dans l'intestin grêle est très élevée (94,3%, Silvester et Cummings, 1995) (Tableau 2). Cependant, il n'existe pas de travaux permettant d'évaluer l'impact du type de viande ni des traitements technologiques sur ce paramètre.

L'étude, décrite dans la partie précédente, réalisée sur des porcs munis de canules intestinales (Bauchart *et al.*, 2007b), montre que le nombre de peptides issus des protéines carnées présents dans la partie médiane de l'intestin grêle (jéjunum) est globalement supérieur à celui observé à la sortie de l'estomac (duodénum). Les séquences peptidiques identifiées de façon reproductible sont les plus riches en résidus proline (Bauchart, 2006). Ceci est en accord avec une plus grande résistance à l'hydrolyse digestive des peptides contenant de la proline (Vanhoof *et al.*, 1995). On peut également noter que le fragment de GA3PDH (232-241), présent dans le contenu digestif à la sortie de l'estomac, résiste à l'hydrolyse par les enzymes pancréatiques et est toujours présent dans le contenu digestif au niveau du jéjunum.

Bien que certains peptides issus de la viande semblent pouvoir résister plus longtemps à l'hydrolyse digestive, il est peu probable qu'ils contribuent, *in fine*, significativement aux flux d'azote à la fin de l'intestin grêle. On considère généralement que les enzymes sécrétées par l'intestin grêle et la capacité d'absorption ne sont jamais limitantes pour l'hydrolyse des protéines alimentaires. La digestibilité dans l'intestin grêle est donc essentiellement déterminée par la matrice macroscopique qui renferme les protéines, la matrice macroscopique avec des liaisons moléculaires plus ou moins fortes, et par le temps de transit dans ce compartiment.

Quantitativement, la digestion dans l'intestin grêle des protéines, quelle que soit leur origine, est très élevée (Tableau 2).

On peut cependant noter que la majorité des mesures a été réalisée avec des protéines isolées, et qu'il y a peu d'informations sur ce paramètre pour des aliments complexes. La cuisson joue un très grand rôle dans la digestibilité des protéines de l'œuf, mais on ne sait pas si ce procédé technologique a un effet sur la digestibilité des protéines de la viande.

III.C.3) Impact de la cinétique d'absorption des acides aminés sur l'assimilation des protéines de la viande

Au-delà de la composition en AAI et de la digestibilité des protéines, un autre critère est également intéressant pour mettre en évidence des différences de qualité nutritionnelle des protéines : la cinétique de digestion. Il a été clairement montré que cette cinétique conditionne l'efficacité d'utilisation postprandiale des protéines alimentaires, la cinétique optimale n'étant pas nécessairement la même en fonction de l'âge et de l'état physiopathologique.

Le concept de protéines à digestion rapide et protéines à digestion lente a été établi par Boirie *et al.* (1997) à partir des principales fractions protéiques du lait. Après ingestion, les caséines forment un coagulum dans l'environnement acide de l'estomac, leur entrée dans l'intestin grêle est alors ralentie et ces protéines sont lentement digérées. Les protéines du lactosérum, solubles en milieu acide, transitent avec la phase liquide du contenu digestif et sont rapidement digérées. Les travaux chez les jeunes adultes montrent que les protéines à digestion lente sont globalement mieux utilisées pour l'anabolisme postprandial que les protéines à digestion rapide. En effet, bien que les protéines à digestion rapide produisent une stimulation plus intense de la synthèse protéique corporelle, l'apport trop rapide en acides aminés conduit à leur élimination par déamination puis oxydation, ce qui limite *in fine* leur disponibilité pour la synthèse protéique (Dangin *et al.*, 2003; Bos *et al.*, 2003; Lacroix *et al.*, 2006). Si la cible est uniquement la synthèse protéique musculaire, comme dans le cas des sportifs, l'utilisation de protéines à digestion rapide demeure plus efficace pour stimuler la synthèse protéique après un exercice (West *et al.*, 2011).

Contrairement aux jeunes adultes, chez les personnes âgées, il semble préférable d'utiliser des protéines à digestion rapide pour obtenir une meilleure utilisation postprandiale des acides aminés alimentaires pour la synthèse des protéines corporelles (Dangin *et al.*, 2003). Ceci pourrait s'expliquer par l'installation d'une résistance du tissu musculaire aux signaux anaboliques que constitue l'augmentation de l'acidoémie et de l'insulinémie en phase postprandiale.

La synthèse protéique musculaire reste cependant stimulable, mais en provoquant des augmentations plus élevées de l'aminoacidémie (Volpi *et al.*, 1998). Parmi les acides aminés, la leucine joue un rôle prédominant. En concentration physiologique postprandiale, elle est capable de stimuler la synthèse musculaire *in vitro* de la même façon qu'un mélange d'acides aminés (Dardevet *et al.*, 2000). Au cours du vieillissement, le muscle devient moins sensible à l'effet stimulateur de la leucine et il est donc nécessaire d'augmenter la leucinémie postprandiale pour atteindre une stimulation équivalente à celle observée chez les jeunes adultes (Dardevet *et al.*, 2000). Tout se passe comme si chez la personne âgée, il y avait une élévation du seuil de sensibilité de l'anabolisme protéique. Ainsi avec des protéines trop lentement digérées, la libération des acides aminés dans le sang peut être trop lente pour provoquer l'augmentation d'aminoacidémie nécessaire à la stimulation de l'anabolisme postprandial.

Cette diminution de la sensibilité du métabolisme protéique pourrait en partie expliquer la fonte musculaire observée au cours du vieillissement (sarcopénie). Des stratégies nutritionnelles sont aujourd'hui développées pour lutter contre cette fonte musculaire : concentration de l'apport protéique sur un repas, et/ou utilisation de protéines rapidement digérées, visant à maximiser l'augmentation de l'aminoacidémie postprandiale. La viande pourrait, dans ce cadre, constituer un aliment très intéressant en raison de sa forte teneur en protéines très digestibles permettant de concentrer l'apport protéique sur un seul repas. Peu de données sont cependant disponibles sur les protéines carnées en ce qui concerne leur vitesse de digestion. Il semble que la viande puisse être considérée comme une source de protéines à digestion rapide (Figure 21 ci-après) comme l'ont démontré Rémond *et al.* (2007).

En effet, la cinétique d'apparition des acides aminés dans le sang suite à l'ingestion de viande est comparable à celle observée après l'ingestion de protéines du lactosérum. Entre les deux cinétiques, la principale différence réside dans un décalage dans le temps d'environ 20 min correspondant au différentiel de temps de transit dans l'estomac entre un aliment liquide et un aliment solide. Des travaux antérieurs mettaient également en évidence des aminoacidémies atteignant leur maximum entre 90 et 180 min après l'ingestion de viande de bœuf, de volaille ou de poisson (Uhe *et al.*, 1992; Soucy et LeBlanc, 1998). Étant donné sa richesse en protéines, et sa vitesse de digestion élevée, la viande est donc un aliment intéressant dans le cadre des stratégies nutritionnelles proposées pour lutter contre la sarcopénie chez les personnes âgées.

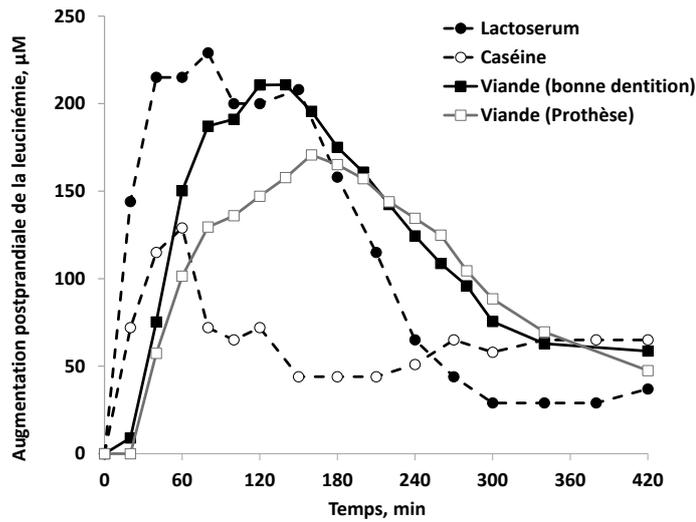


Figure 21 Cinétique d'apparition de la leucine dans le sang périphérique chez des personnes âgées après l'ingestion de 30 g de différentes protéines : les protéines du lactosérum, la caséine, la viande chez des sujets ayant une bonne dentition, ou porteurs d'une prothèse complète. (Dangin et al., 2003; Rémond et al., 2007)

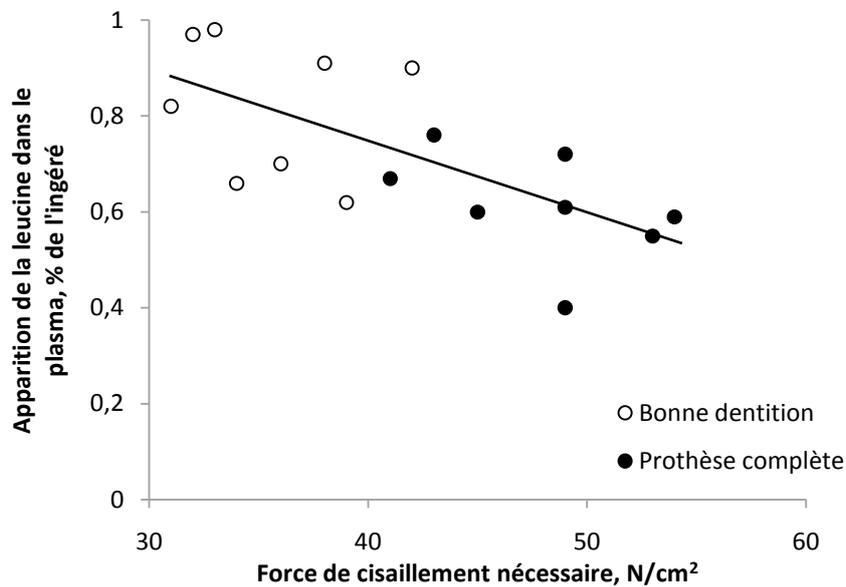


Figure 22 Relation inverse entre l'apparition de la leucine dans le sang périphérique et le degré de déstructuration du bol alimentaire dégluti, ici caractérisé par la résistance à une force de cisaillement, chez des personnes âgées ayant reçu un repas de viande bovine. (Rémond et al., 2007)

Des travaux récents soulignent l'intérêt de cette source protéique, même en quantité modérée (ingestion de 113 g de bœuf soit 30 g de protéines) pour relancer la synthèse protéique musculaire (Symons *et al.*, 2009).

Il faut cependant noter qu'une baisse importante de l'efficacité masticatoire, accompagnée d'une déglutition de morceaux de viande moins déstructurés, peut ralentir l'apparition des acides aminés dans le sang (Figure 21). Ce ralentissement est dommageable pour les personnes âgées, dans la mesure où il s'accompagne d'une moins bonne utilisation des acides aminés absorbés pour la synthèse protéique postprandiale. Celle-ci pourrait s'expliquer à la fois par le ralentissement de la vitesse de digestion mais également par une baisse de digestibilité des protéines de la viande dans l'intestin grêle. Ces travaux ont, en effet, permis de mettre en évidence l'existence d'une relation inverse entre le degré de déstructuration du bol alimentaire avant déglutition (force de cisaillement nécessaire) et l'apparition des acides aminés dans le sang périphérique des personnes âgées, suite à l'ingestion d'un repas de viande (Figure 22). Ils soulignent ainsi l'importance de la mastication en tant que phase préparatoire de la digestion des aliments solides.

L'intérêt de la consommation de viande pour lutter contre la fonte musculaire chez les personnes âgées nécessiterait donc une bonne prise en compte de leurs capacités masticatoires et le développement de textures et formes de présentations adaptées, permettant à la viande de manifester tout son potentiel.

Conclusion

D'un point de vue nutritionnel, la viande est très intéressante pour sa teneur en fer, zinc, sélénium, et vitamines du groupe B, en acides gras insaturés, mais c'est, avant tout, une excellente source de protéines en raison de sa composition en acides aminés indispensables.

Il apparaît clairement aujourd'hui que la seule composition d'un aliment en acides aminés n'est pas suffisante pour définir la qualité nutritionnelle des protéines. De nouveaux critères doivent être intégrés pour définir cette qualité :

- La digestibilité des protéines dans l'intestin grêle, pour mieux évaluer la biodisponibilité des acides aminés,
- La vitesse de digestion qui influence l'utilisation métabolique des acides aminés.

Ces deux critères sont étroitement dépendants de la macro et microstructure de l'aliment ingéré et par conséquent, des procédés de transformation appliqués aux matières premières.

Le devenir digestif de la viande a été peu étudié (Silvester et Cummings, 1995). Il suscite aujourd'hui un regain d'intérêt, pour deux raisons. D'abord, parce que la viande rouge est incriminée, sur la base d'études épidémiologiques, d'être à l'origine de cancers colorectaux notamment. L'activité prooxydante du fer qu'elle contient, et plus particulièrement le fer hémique, mais également la dégradation de résidus protéiques carnés dans le côlon, pourraient être impliquées dans cette carcinogénèse colique (Pierre *et al.*, 2010). Il est donc très important de mieux connaître la digestibilité réelle de la viande dans l'intestin grêle. Ensuite, de par sa forte teneur en protéines et sa vitesse de digestion élevée, la viande est un aliment de choix dans les stratégies nutritionnelles développées pour contrecarrer la fonte musculaire liée au vieillissement (Rémond *et al.*, 2007). Il est cependant montré que ce critère de vitesse de digestion est étroitement conditionné par la forme de présentation de la viande et l'efficacité masticatoire du consommateur, l'interaction de ces deux facteurs impactant sur le temps de séjour de la viande dans l'estomac. Une baisse d'efficacité masticatoire étant souvent associée au vieillissement, ces observations ouvrent un champ d'innovation important dans le développement de produits carnés de texture adaptée à l'alimentation des séniors (Rémond *et al.*, 2007).

Les données obtenues *in vitro* suggèrent également que le degré d'oxydation des protéines, pendant les procédés de transformation, peut jouer un rôle important dans la détermination de la vitesse de digestion (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011). Une bonne maîtrise de l'impact de ces procédés sur les paramètres de digestion (vitesse et digestibilité dans l'intestin grêle) devrait ainsi permettre d'optimiser ceux-ci pour accroître la qualité nutritionnelle des viandes prêtes à consommer. Enfin, les viandes sont rarement consommées seules. Au cours d'un repas les protéines carnées ingérées se retrouvent dans l'estomac, dans un mélange de différents macro et micronutriments pouvant interférer sur leur temps de séjour dans l'estomac et l'importance de la protéolyse par les sécrétions gastriques. D'autre part, l'apport conjoint d'antioxydants (polyphénols, vitamines C et E) pourrait limiter l'oxydation et l'agrégation intragastrique des protéines carnées, initiées par les diverses formes du fer alimentaire, et favoriser ainsi une digestion rapide. Des données *in vivo* sur ces aspects font encore cruellement défaut.

Pour conclure, la digestion (vitesse de digestion, digestibilité), jusque-là peu étudiée, demeure un point clé dans la progression de nos connaissances de l'impact (positif ou négatif) des modifications biochimiques et structurales des protéines induites par les procédés technologiques, sur la qualité nutritionnelle des protéines carnées. Les outils *in vitro* récemment développés, ainsi que les approches sur animaux modèles, devraient permettre dans un proche avenir l'obtention de données importantes pour comprendre et modéliser le devenir digestif de ces protéines.

C'est dans cette optique que s'intègre mon travail de thèse dans le but d'essayer d'apporter des éléments de réponses concernant l'impact des traitements thermiques à la fois sur les protéines (oxydations, dénaturations), et sur leur potentiel digestif tant *in vitro* que *in vivo* (vitesse de digestion, potentiel de dégradation, libération des acides aminés, digestibilité,...).

Partie 1:

Caractérisation des viandes

et Digestion in vitro

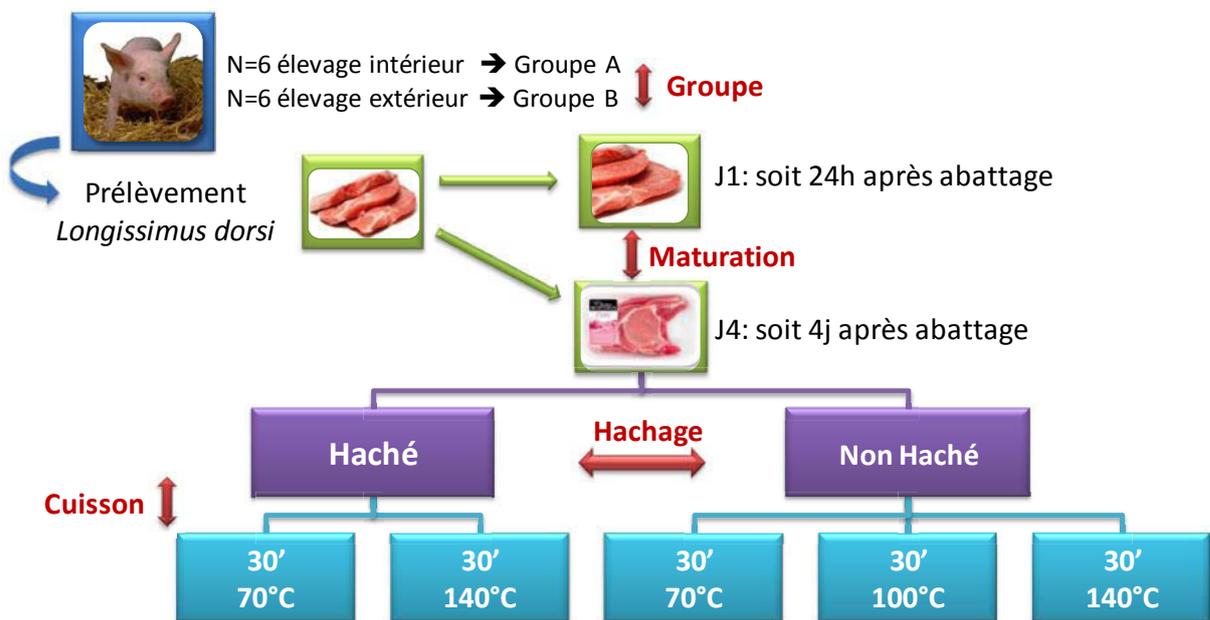


Figure 23 Schéma du protocole expérimental de l'étude.

Introduction de la Partie 1 : *In vitro*

Cette partie s'attache à la caractérisation de la viande d'un point de vue biochimique et protéomique ainsi qu'à la mise au point d'un modèle de digestion *in vitro* mimant la phase gastrique et intestinale. Ces mesures sont réalisées sur des échantillons crus, maturés et ayant subis ou non des procédés de transformation. Ici deux procédés sont sélectionnés, le hachage et l'application de traitement thermique. L'analyse de ces différentes conditions va permettre de caractériser et déterminer l'effet des procédés sur les modifications physicochimiques des protéines de la viande et leurs aptitudes à être dégradées dans le tractus digestif.

I. Matériel et Méthodes

I.A. Le protocole expérimental

Le protocole expérimental est le suivant (Figure 23) :

Deux groupes de 6 porcs mâles Basques d'environ 100 kg ont été sélectionnés selon des modes d'élevage différents. Les systèmes de production impactent la composition du tissu musculaire (Lebret, 2008) et notamment le potentiel oxydant de la viande. Les travaux de Lebret *et al.*, (2011) ont rapporté des niveaux d'exsudat, lors de la conservation de la viande, supérieurs pour des élevages à l'extérieur. Ces données reflètent des changements conformationnels protéiques plus importants. Les porcs du groupe "A" ont été élevés dans un système conventionnel à l'intérieur tandis que ceux du groupe "B" ont été élevés en plein air. Bien que les apports alimentaires soient identiques, les porcs élevés à l'extérieur ont accès à une alimentation plus variée et non entièrement contrôlée (ingestion d'herbe, boues,...), mettant éventuellement en jeu des mécanismes de défenses de l'organisme contre des éléments ingérés et ils ont plus d'espaces pour se déplacer.

Ce dispositif va nous permettre de disposer des 2 groupes d'animaux ayant potentiellement des compositions tissulaires différentes qu'il s'agira de caractériser par une approche protéomique. Afin d'évaluer l'impact de la maturation une partie des muscles prélevés va ainsi être caractérisée 24 h après abattage et 4 jours après.

Quatre jours étant la durée de maturation couramment utilisée chez le porc. Après prélèvement, les muscles sont directement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

Pour finir, l'effet des procédés de transformation va être étudié. Nous avons choisi 2 procédés : le traitement thermique et le hachage.

Pour le traitement thermique, il a été choisi 3 températures : 70°C, 100°C et 140°C. Ces températures sont des fourches de températures extrêmes allant de la cuisson type jambon pour 70°C, à la cuisson type "pot au feu" pour 100°C et à la cuisson type en surface des grillades pour 140°C. Afin de pouvoir rester dans des conditions comparables, les cuissons sont réalisées uniquement sur le muscle mûré (J4) durant un temps fixe de 30 minutes.

Pour le hachage, nous avons utilisé un broyeur ménager (waring blender) pour déstructurer la viande puis nous l'avons laissée 24 h à 4°C sous film perméable à l'obscurité, avant d'effectuer les traitements thermiques. Dans le cas du hachage, seules les 2 températures les plus extrêmes ont été réalisées (70°C et 140°C).

A chaque condition, une caractérisation de la viande sera réalisée à savoir, des mesures d'oxydation des protéines, et des lipides, de dénaturation, d'agrégation et des digestions *in vitro*. Pour les échantillons crus à J1, des analyses protéomiques seront réalisées et sur le J1 et J4 les activités antioxydantes et le potentiel glycolytique seront aussi mesurés.

1.B. Les mesures réalisées

Les cuissons ont été réalisées sur des cubes de 0,5 à 1 cm dans un bain à sec thermostaté. Les échantillons sont ensuite immédiatement refroidis dans la glace. Le poids avant et après cuisson est mesuré pour estimer les pertes en eau, puis le tout est congelé à -80°C en attente d'analyses.

$$\% \text{ de pertes en eau} = \left(\frac{(\text{Poids frais} - \text{Poids cuits})}{\text{Poids frais}} \right) \times 100$$

✓ **Le potentiel glycolytique**

Le potentiel glycolytique (PG) permet d'estimer le potentiel d'acidification du muscle, il permet de mesurer le taux de glycogène musculaire et glucose résiduels qui pourront libérer des sucres réducteurs susceptibles de se lier aux protéines et produire du lactate (acide lactique) lors de la glycolyse *post mortem*.

Le glycogène, le glucose-6-phosphate, le glucose et le lactate sont dosés sur la viande crue par une mesure enzymatique selon les méthodes de Dalrymple et Hamm (1973) et Bergmeyer (1974). Ces derniers sont dosés suite à une hydrolyse par une amyloglucosidase, dans le broyat total pour le glycogène résiduel et dans le surnageant pour le lactate.

Cette quantité est exprimée en μmol d' « équivalents lactate » par gramme de tissu frais :

$$PG = 2 \times ([\text{glycogène}] + [\text{glucose-6-phosphate}] + [\text{glucose}]) + [\text{lactate}]$$

✓ **Les activités antioxydantes**

La mesure des activités des enzymes antioxydantes, renseigne sur le statut antioxydant endogène du muscle et sa résistance face aux agressions (oxydations, radicaux,...). Ici il a été mesuré la Catalase et la SuperOxyde Dismutase (SOD). Les méthodes de dosage employées sont inspirées d'Aebi (1974) pour la catalase et de Marklund et Marklund (1974) pour la SOD.

✓ **L'oxydation des lipides**

L'oxydation des lipides ou lipoperoxydation est mesurée avec la méthode des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (SR-TBA) de Lynch et Frei (1993). L'acide thiobarbiturique réagit avec les aldéhydes produits dont le malondialdéhyde (MDA) qui est un constituant majeur des produits de lipoperoxydation.

✓ **L'oxydation des protéines**

L'oxydation des protéines (attaque des acides aminés basiques par les substances réactives à l'oxygène) donne naissance à des composés carbonylés (R-CHO, R-CO-R, R-CO-CO-R). Cette dernière est donc déterminée avec la mesure des groupements carbonyles selon la méthode d'Oliver *et al.* (1987) qui utilise la DNPH (dinitrophénylhydrazine) pour former une DNP hydrazone colorée détectable à une longueur d'onde de 370 nm.

✓ **La dénaturation thermique**

La dénaturation thermique se caractérise par l'extériorisation des groupements hydrophobes des protéines. Elle se calcule en mesurant l'hydrophobie de surface des protéines, c'est-à-dire le taux de groupements hydrophobes accessibles. Pour cela, il est utilisé des sondes hydrophobes comme le bleu de bromophénol qui va se fixer sur les zones hydrophobes et donc l'intensité de fixation va refléter le degré de dénaturation. La méthode employée a été décrite par Chelh *et al.* (2006).

✓ **L'agrégation**

L'agrégation se mesure à l'aide d'un granulomètre (FPIA-3000, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Cet appareil permet de caractériser les particules d'une suspension en fonction d'un grand nombre de paramètres et notamment ceux utilisés ici, le diamètre du cercle équivalent à la particule (EC diamètre), la circularité et ratio Feret. Il permet aussi de comptabiliser les particules présentes dans la solution. Suite à des essais sur cet appareil, il a été démontré dans l'équipe qu'il était favorable de délipider au préalable les échantillons car les granules lipidiques étant nombreuses celles-ci contaminent trop les résultats (Promeyrat *et al.*, 2010b). Le mélange de solvants utilisés ne dénature pas les protéines.

I.C. Les modèles de digestion in vitro

I.C.1) Les modèles expérimentaux

Des modèles de digestion *in vitro* ont été développés. Ces systèmes peuvent servir à étudier l'effet de la texture, d'un enrobage, de l'ajout d'un composé, d'un traitement mécanique ou d'autres procédés de transformation. De nos jours, il existe un très grand nombre de modèles de digestion, allant d'un système basique mimant une étape de digestion pour des analyses de routine et des mesures de grandes quantités d'échantillons, jusqu'à des modèles très évolués mimant le plus fidèlement possible la physiologie humaine.

Une revue récente de Hur *et al.* (2011) a tenté d'en répertorier un certain nombre mais il est bien évident que les enzymes utilisées, les temps (de 30 min à 2 h) et les concentrations varient d'un modèle à l'autre. Certaines études vont porter sur la phase stomacale où la pepsine va être utilisée. Cette étape stomacale est encore la moins variable dans les modèles car elle ne fait intervenir qu'un seul type d'enzymes. La digestion intestinale quant à elle va faire intervenir soit le couple trypsine/ α -chymotrypsine, soit la pancréatine, soit les sucs biliaires,... ou encore un mélange de 2-3 composants ou plus, les concentrations et les durées (de 30 min à plus de 6 h) sont d'autant plus variables.

L'utilisation de 1-2 types d'enzymes permet de standardiser les conditions et de pouvoir effectuer des comparaisons ou comprendre un mécanisme d'action. Lorsque l'on utilise un mélange complexe cela est certes plus réaliste et donne de meilleures digestibilités mais des interactions entre les différents composants sont aussi possibles et donc plus difficilement interprétables.

Un modèle de digestion « basique » peut se réaliser dans des tubes à essai, dans lesquels l'ajout de tampon et d'enzymes mimera une condition particulière. Des systèmes un peu plus évolués comme décrits par exemple par Gatellier et Santé-Lhoutellier (2009) utilisent un système de pompes et de membranes pour mimer les mouvements de flux de nutriments. Ce système permet de faire sortir les petites molécules par dialyse qui, *in vivo*, seraient absorbées dans la barrière intestinale.

Ensuite, il existe des modèles plus évolués que sont les digesteurs artificiels. Il s'agit de modèles gastro-intestinaux dynamiques artificiels nommés TIM qui simulent par ordinateur les conditions environnementales, chimiques et dynamiques de l'estomac et de l'intestin grêle de l'Homme. Oomen *et al.* (2002) ont comparé 5 modèles de digesteurs (un d'Angleterre, un d'Allemagne, un de Belgique et deux du Pays-Bas). Ils se distinguent sur la quantité nécessaire pour une analyse pouvant varier de 1 g à 10 g ainsi que dans les volumes des différents compartiments gastro-intestinaux. Certains modèles sont statiques avec juste des rotations et des agitations et d'autres, comme la méthode TIM du TNO au Pays-Bas, possèdent la capacité de recréer les mouvements péristaltiques donnant ainsi une approche dynamique supplémentaire. Ces modèles se distinguent aussi par la présence ou non de la partie salivaire et comme dans les modèles *in vitro*, les concentrations, le type d'enzymes et les durées d'incubation sont variables dans les différents compartiments gastro-intestinaux. Parmi les 5 modèles, la méthode TIM du TNO semble être la plus « proche » de la réalité car les sécrétions dans les différents compartiments évoluent graduellement en fonction du temps. Par exemple, au niveau de l'estomac le pH initial est à 5 puis diminue à 3,5 après 30 minutes jusqu'à 2 après 90 minutes. Cela est plus représentatif des modifications que l'absorption de l'aliment provoquent chez l'Homme, comparé aux autres modèles qui maintiennent un pH fixe.

1.C.2) Les mesures obtenues

Suivant la complexité du modèle *in vitro* considéré, différentes mesures sont possibles.

Sur des modèles enzymatiques « basiques », il est possible de mesurer des vitesses de digestion en $\Delta DO/h$, l'absorbance maximale, le temps de demi-vie comme le montre Gatellier et Santé-Lhoutellier (2009). Ces mesures sont robustes et permettent déjà de comparer différentes conditions de manière standardisée.

Avec les digesteurs artificiels, il est possible de suivre la courbe de libération de l'aliment dans le contenu stomacal et intestinal, le temps de vidange gastrique, ainsi que l'évolution du pH gastrique, comme le montre l'étude de Blanquet-Diot *et al.* (2011).

Cette étude présente entre autres, la différence qu'il peut y avoir entre la digestion d'un verre d'eau et d'un aliment solide. Pour le verre d'eau on voit que ce dernier est digéré entièrement au bout de 60 min dans l'estomac et passe dans l'iléon dès 30 min et atteint son maximum 5 h après ingestion. Le pH quant à lui passe de 6 à 2 en une heure puis reste stable. Pour l'aliment solide, il est observé un retard de la libération gastrique. En effet, la totalité de l'aliment est libérée au bout d'environ trois heures, il est retrouvé dans l'iléon à partir d'une heure et au bout de cinq heures, seul un peu plus de 60% de l'aliment a été digéré. Pour le pH gastrique celui-ci passe de 6 à 2 en trois heures. Cet exemple montre donc bien que la digestion est variable en fonction de l'aliment considéré.

De par sa similitude avec l'*in vivo*, il est, suivant les cas, possible d'effectuer des mesures de biodisponibilité et de digestibilité dont j'aborderai les notions un peu plus tard (Cf. Partie II *in vivo*, p 181). Dans sa revue San'Ana (2011) a relevé des digestibilités *in vitro* de 86% pour le lait en poudre, de 91% pour les protéines isolées de soja et de 84% pour de la viande bovine. Ces données sont en accord avec celles trouvées *in vivo* et soulignent donc bien la validité de ces méthodes.

I.D. Création d'un modèle basique de digestion in vitro

I.D.1) Mise au point du modèle

Afin de pouvoir comparer l'effet des procédés sur les protéines et les conséquences au niveau digestif, il a été développé un modèle basique de digestion *in vitro*. Cela permet ainsi de tester un grand nombre de conditions de traitements. Pour sa mise en place, plusieurs concentrations d'enzymes ont été testées (5, 10, 20 et 50U/ mg de protéines myofibrillaires), nous avons retenu 10U de pepsine/mg de protéines pour la phase gastrique, et 6,55U de trypsine/mg et 0,33U d' α -chymotrypsine/mg de protéines. Lors de la digestion de la pepsine couplée avec la trypsine et l' α -chymotrypsine, il est choisi arbitrairement d'effectuer une digestion par la pepsine d'une heure sur les protéines myofibrillaires. Ce temps est une valeur fixée, elle semble cohérente avec la réalité. Kong et Singh (2008) parlent d'un temps moyen d'ingestion de 50% du repas (liquide et solide) allant de 10 à 60 min. Edelbroek *et al.* (1992) donnent un temps de plus de 100 min pour digérer de la viande de bœuf. En se fixant à 60 minutes de digestion sur un extrait protéique, il est estimé que l'action de la pepsine doit être au même niveau que ce qu'il doit se produire *in vivo* sur la viande.

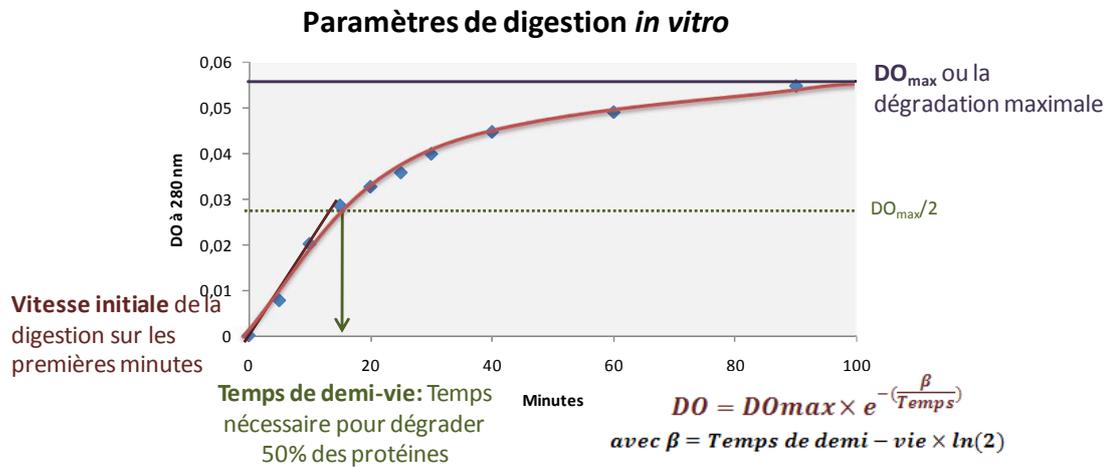


Figure 24 Représentation des paramètres de digestion *in vitro* : Vitesse initiale, Temps de demi-vie et la dégradation maximale et l'équation mathématique servant à modéliser nos données.

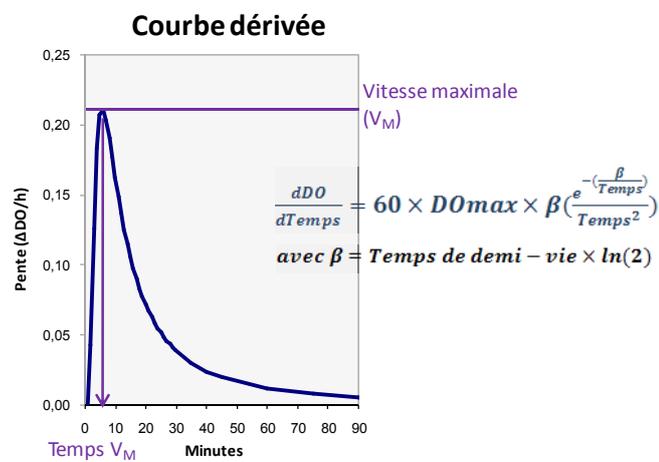


Figure 25 Représentation de la dérivée de la courbe de cinétique, son équation et les paramètres de digestion : Vitesse maximale et le temps d'obtention de la vitesse maximale.

1.D.2) Détermination des paramètres de digestion

Une fois le protocole de digestion établi, les paramètres de digestion ont été déterminés.

En général sur les cinétiques de digestion, il est mesuré la vitesse initiale en $\Delta DO/h$, la dégradation maximale et le temps de demi-vie, comme le montre une étude faite par Gatellier et Santé-Lhoutellier (2009). Ces paramètres sont représentés sur la Figure 24. Les données expérimentales peuvent être ajustées par l'équation suivante :

$$DO = DO_{max} \times e^{-\left(\frac{\beta}{Temps}\right)} \text{ avec } \beta = Temps \text{ de demi - vie } \times \ln(2).$$

Dans cette étude, deux autres paramètres ont été mesurés, la vitesse maximale et le temps d'obtention de cette vitesse maximale. Ces derniers sont déterminés à partir de la dérivée de l'équation d'ajustement de la cinétique de digestion.

L'équation dérivée est la suivante :

$$\frac{dDO}{dTemps} = 60 \times DO_{max} \times \beta \left(\frac{e^{-\left(\frac{\beta}{Temps}\right)}}{Temps^2} \right) \text{ avec } \beta = Temps \text{ de demi - vie } \times \ln(2).$$

Les 2 paramètres sont illustrés sur la Figure 25.

Ces différents paramètres sont robustes et vont pouvoir permettre la comparaison de différentes conditions de traitements en grand nombre et dans des conditions maîtrisées et standardisées et applicables à tout type de matrices.

Dans le cas de la digestion à la pepsine couplée à la trypsine/ α -chymotrypsine, un dernier paramètre est mesuré, il s'agit de la DO initiale. Il s'agit du premier point de cinétique au moment de l'ajout de la trypsine et de l' α -chymotrypsine, cette valeur correspond à la digestion à la pepsine durant une heure.

Article 1 : La température de cuisson est un élément clé pour la vitesse de digestion *in vitro* des protéines de la viande : Investigation sur les mécanismes sous-jacents.

Plusieurs études sont réalisées sur les effets des procédés notamment les traitements thermiques sur différents types de protéines pures la plupart du temps, d'autres se sont penchées uniquement sur la digestion de protéines. Mais peu d'entre elles ont essayé de faire les liens entre les modifications induites par le chauffage ou d'autres procédés et l'impact sur la digestion des protéines.

Cet article s'intéresse donc à l'effet des procédés de transformation sur les paramètres de digestion *in vitro* des matrices carnées. Nous nous sommes intéressés à décortiquer les différents éléments d'un procédé technologique depuis la maturation, le hachage jusqu'à la température de cuisson. Dans un premier temps la caractérisation physicochimique des protéines a été réalisée afin d'évaluer les différents types de modifications produites sur les protéines de la viande par chacun des traitements. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la perte en eau à la cuisson, à la mesure des phénomènes d'oxydation des lipides et des protéines, à la conformation des protéines par des mesures d'hydrophobies de surface et de granulométrie. La caractérisation du potentiel antioxydant des viandes crues, des mesures d'activités d'enzymes antioxydantes et le potentiel glycolytique ont aussi été mesurés. Enfin il a été réalisé les mesures de digestion *in vitro* et la détermination des paramètres de digestion.

L'ensemble de ces données va permettre de comprendre et de proposer des mécanismes d'action des procédés de transformation sur les protéines et leurs effets au niveau digestif.

Cooking Temperature Is a Key Determinant of in Vitro Meat Protein Digestion Rate: Investigation of Underlying Mechanisms

Marie-Laure Bax,^{†,‡,§} Laurent Aubry,[†] Claude Ferreira,[†] Jean-Dominique Daudin,[†] Philippe Gatellier,[†] Didier Rémond,^{‡,§} and Véronique Santé-Lhoutellier^{*,†}

[†]INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

[‡]INRA, UMR1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[§]Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, B.P. 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT: The present study aimed to evaluate the digestion rate and nutritional quality of pig muscle proteins in relation to different meat processes (aging, mincing, and cooking). Under our experimental conditions, aging and mincing had little impact on protein digestion. Heat treatments had different temperature-dependent effects on the meat protein digestion rate and degradation potential. At 70 °C, the proteins underwent denaturation that enhanced the speed of pepsin digestion by increasing enzyme accessibility to protein cleavage sites. Above 100 °C, oxidation-related protein aggregation slowed pepsin digestion but improved meat protein overall digestibility. The digestion parameters defined here open new insights on the dynamics governing the in vitro digestion of meat protein. However, the effect of cooking temperature on protein digestion observed in vitro needs to be confirmed in vivo.

KEYWORDS: meat protein, oxidation, aggregation, in vitro digestion, processing

INTRODUCTION

Consumers are aware of the impact of food on their health. In addition to food hygiene and sensory aspects, nutritional quality is becoming an increasingly important factor in food choices, especially against a background of increasing demand for convenience foods.

Meat is regularly given a “negative” health image. Epidemiological studies report that red meat is linked to cardiovascular disease and colon cancer.¹ The basis of these links has recently been challenged,^{2,3} and even the link between meat cooking and risk of colorectal cancer is now being called into question.⁴ A consensus has emerged that moderate meat consumption as part of a balanced diet is unlikely to increase the risk of cardiovascular disease or colon cancer. Meat is also a major source of proteins and a valuable source of micro-nutrients (iron, zinc, selenium, and vitamins B6 and B12), providing all of the body's essential amino acids. However, the nutritional quality of a protein source cannot be determined by amino acid composition alone; other factors such as digestibility in the small intestine, which determines amino acid bioavailability, and protein digestion rate, which shapes whole-body metabolism of the absorbed amino acids,⁵ must also be taken into account. Few studies have focused on the determining of these parameters for meat products in human diet. It has been reported that grilled beef steak has high protein digestibility in the small intestine (about 95%) and high speed of digestion,^{6,7} but it remains unknown how these parameters are affected by different meat-processing practices.

Meat storage and technological treatments such as mincing, salting, or cooking all assist in achieving a safe and palatable product; however, these treatments can play a significant role in the development of oxidation and denaturation processes, because they affect not just the structural properties of the

meat⁸ but also the physical–chemical state of the meat proteins and the bioavailability of their constitutive amino acids.^{9–11} The oxidation of protein amino acid residues generates oxidation products, protein–protein cross-linkages, and protein fragmentation.^{12,13} Furthermore, Schiff bases can also form in meat via the interaction between proteins and aldehyde products formed during lipid oxidation¹⁴ or from reducing sugars.¹⁵ It has been shown that meat protein aggregation during cooking is linked to the increase in protein surface hydrophobicity (i.e., protein insolubility^{11,16}), which can reduce the rate of protein digestion by digestive tract enzymes.^{9–11,17,18} Due to the complexity of in vivo approaches designed for studying digestion,¹⁹ the ability to estimate meat protein digestion parameters in vitro is extremely valuable for assessing the nutritional qualities of meat products. Studies have tackled this issue over the past few years,^{9,17,18,20,21} but without determining the kinetics involved. Furthermore, the connection between digestion and chemical oxidation of meat proteins is not yet fully elucidated, and results frequently diverge. The present study aimed to evaluate the digestion rate and nutritional quality of pig muscle proteins in relation to different meat processes (aging, mincing, and cooking). In vitro digestion parameters (initial slope, maximal degradation, and half-life time) are presented and discussed in connection with antioxidant composition, glycolytic potential, lipid and protein oxidation, denaturation, and aggregation.

Received: December 16, 2011

Revised: February 14, 2012

Accepted: February 16, 2012

Published: February 16, 2012

MATERIALS AND METHODS

Animals and Aging. The experiment was carried out on 12 male commercial Basque pigs (6 months old) slaughtered at about 100 kg liveweight in a commercial slaughterhouse. After 24 h, the Longissimus dorsi muscle was removed from each carcass. One part of the muscle was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (D1 samples), whereas the other part was kept for 3 days at 4°C under air-permeable film before being frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until sample preparation and analysis (D4 samples).

Sample Preparation and Heating Procedure. The heating procedure was performed on only D4 samples. Three temperatures were applied: 70, 100, and 140°C . These temperatures were chosen to represent cooked ham, boiled meat, and grilled meat. Thawed meat samples (3 g/tube) were placed in polypropylene test tubes (inner diameter = 10 mm, thickness = 1 mm) and heated for 30 min in a digital temperature-controlled dry bath (BT3-heater from Prolabo). The heat treatment was then immediately stopped by placing the samples on ice. Samples were weighed and immediately frozen at -80°C . Cooking loss (CL) was calculated as the ratio of postcooking weight to precooking weight, expressed as a percentage (% CL = [(thawed weight - cooked weight)/thawed weight] \times 100).

A mincing procedure was also applied to evaluate the combined effect of mincing and heating. Six grams of frozen muscle cut into 10–12 pieces of around 5 mm each was minced using a Waring blender (Waring, Hartford, CT, USA) by applying four 5 s pulses and then kept for 1 day at 4°C under air-permeable film before being cooked as described above. For technical reasons, only the two extreme temperatures (70 and 140°C) were applied on these minced meat samples.

Antioxidant Enzyme Activities. After thawing, muscle samples (1 g) were homogenized with 10 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) in an Ultra Turrax homogenizer (IKA T25 Digital, Staufen, Germany), centrifuged at 4000g for 15 min at 4°C , and the supernatant was collected. Protein concentration in supernatant was determined according to the biuret method. Total superoxide dismutase (SOD) activity (Cu-Zn-SOD and Mn-SOD) was measured, in duplicate, according to the method of Marklund and Marklund²² using inhibition of pyrogallol autoxidation in a basic medium. One unit (U) was taken as the activity that inhibits pyrogallol autoxidation by 50%. Catalase activity was measured, in duplicate, by the rate of decomposition of H_2O_2 at 240 nm according to the method of Aebi²³ and expressed as nanomoles of decomposed H_2O_2 per minute per milligram of protein.

Muscle Glycogen, Lactate, and Glycolytic Potential. Glycogen, glucose, glucose-6-phosphate, and lactate from muscle homogenate were measured, in duplicate, by enzymatic methods according to the methods of Dalrymple and Hamm²⁴ and Bergmeyer,²⁵ with slight modifications. Muscle tissue (1 g) was homogenized with 10 mL of 0.5 M perchloric acid. Aliquots of homogenate (0.5 mL) were taken for enzymatic determination of glycogen, glucose, and glucose-6-phosphate after glycogen hydrolysis with amyloglucosidase. Lactic acid was determined in the supernatant from homogenate centrifuged at 4000g for 20 min at 4°C and expressed in micromoles per gram of fresh tissue. Glycolytic potential (GP, i.e., the amount of compound that can be transformed into lactic acid) was calculated at D1 and D4 using the following formula:²⁶

$$\text{GP} = 2 \times ([\text{glycogen}] + [\text{glucose-6-phosphate}] + [\text{glucose}]) + [\text{lactic acid}]$$

GP was expressed as micromoles of equivalent lactate per gram of fresh tissue.

Biochemical Parameters. All biochemical parameters were assessed on either fresh or cooked samples in duplicate.

Determination of Carbonyl Content. Protein carbonyl groups were evaluated according to the method of Oliver et al.,²⁷ with slight modifications. A 1 g muscle sample was homogenized in 10 mL of 0.15 M KCl + 0.1 mM BHT for 60 s in an Ultra Turrax homogenizer. Carbonyl groups were detected by reactivity with 2,4-dinitrophenylhy-

drazine (DNPH), leading to the formation of protein hydrazones. Carbonyl content was determined in fresh and cooked meat and expressed as nanomoles of DNPH fixed per milligram of protein.

Determination of Protein Surface Hydrophobicity. The hydrophobicity of myofibrillar proteins was determined using hydrophobic chromophore bromophenol blue (BPB) as described in Chelh et al.,²⁸ with slight modifications. This method is based on fixing BPB with insoluble myofibrillar proteins and quantifying the amount of bound BPB. Myofibrillar proteins were suspended at a concentration of 3 mg/mL in 20 mM phosphate buffer at pH 6. One milliliter of myofibril suspension was added to 300 μL of 1 mg/mL BPB (in distilled water) and mixed well. A myofibril-free control sample (blank) was performed by adding 300 μL of 1 mg/mL BPB (in distilled water) to 1 mL of 20 mM phosphate buffer at pH 6. Samples and control samples were continually shaken at room temperature for 10 min and then centrifuged at 4000g for 15 min at 4°C . Supernatant absorbance corresponding to free BPB was measured at 595 nm against a phosphate buffer blank. The amount of bound BPB (μg) was calculated as the difference between total and free BPB and used as an index of hydrophobicity. Each determination was performed in duplicate. Bound BPB (μg) = 300 μg \times (OD control - OD sample)/OD control.

Determination of Lipid Oxidation. Lipid oxidation was measured by using the thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) method according to Lynch and Frei,²⁹ with slight modifications. Muscle samples (1 g) were homogenized with 10 mL of 0.15 M KCl + 0.1 mM butyl hydroxytoluene (BHT) in an Ultra Turrax homogenizer. Homogenates (0.5 mL) were incubated with 1% (w/v) 2-thiobarbituric acid in 50 mM NaOH (0.25 mL) and 2.8% (w/v) trichloroacetic acid (0.25 mL) for 10 min in a boiling water bath. After cooling at room temperature for 30 min, the pink chromogen was extracted with *n*-butanol (2 mL), and its absorbance was measured at 535 nm against an *n*-butanol blank. TBA-RS concentrations were calculated using 1,1,3,3-tetraethoxypropane (0–0.8 μM) as standard and expressed as milligrams of malondialdehyde (MDA) per kilogram of meat (TBA units).

Measurements of Protein Aggregation. A meat sample (0.5 g) was homogenized in 5 mL of a 0.15 M ice-cooled KCl solution containing 0.1 mM of BHT, using an Ultra Turrax homogenizer. Homogenization was performed via a short burst (20 s) at low speed (1100 rpm) to minimize protein denaturation. The protein concentration of the meat extract was then estimated by using the biuret method and adjusted to 3 mg/mL with KCl + BHT solution. The lipids were removed from this whole meat extract by adding 2 volumes of butanol/di-isopropyl ether (40:60 v/v) to 1 volume of meat extract. The mixture was stirred for 30 min at 4°C and then centrifuged at 4000g for 15 min at 4°C to separate the aqueous phase from the organic phase. The organic phase was removed by careful suction with a micropipet.

Granulometry measurements were performed in triplicate on 6 mg of proteins in 1.5 mL of this meat extract using a Sysmex flow particle image analyzer (FPIA-3000; Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.) in low-power field mode according to the method of Promeyrat et al.¹⁶ The sample was injected into a sample chamber and homogenized by a mixing rotor. Particle numbers were measured, and particle size and form were evaluated by equivalent circle (EC) diameter, circularity, and Feret aspect ratio.

In Vitro Digestibility. In Vitro Pepsin Digestion. Myofibrillar proteins were suspended in 33 mM glycine buffer, pH 1.8, and the final concentration was adjusted to 0.75 mg/mL. Proteins were hydrolyzed by gastric pepsin (porcine gastric mucosa, EC 3.4.23.1, ref P7012, Sigma) at a concentration of 10 U/mg of myofibrillar proteins for 90 min at 37°C . Digestion was terminated by the addition of 15% (final concentration) trichloroacetic acid at various time points (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, and 90 min). Samples were then placed on ice for 1 h. After centrifugation at 4000g for 15 min at 4°C , hydrolyzed peptide content in the supernatant was measured at 280 nm.

All of the analyses were performed in duplicate.

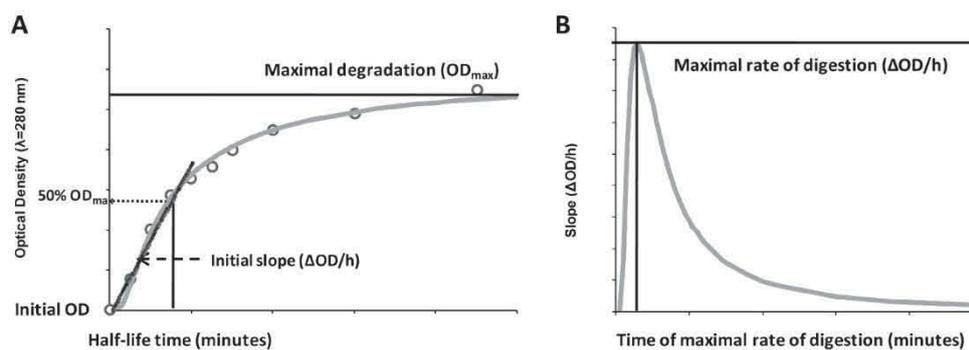


Figure 1. Examples of the digestion curves used to determine digestion parameters: (A) measured values (circles) fitted by eq 1 (curve) (graph shows four parameters: initial slope ($\Delta OD/h$), initial OD, maximal degradation, and half-life time, as determined using the curve equation); (B) digestion rate calculated from eq 2 (graph shows two parameters: maximal rate of digestion and time to reach maximal rate of digestion, as determined using the derivate curve).

Table 1. Effect of Aging on Antioxidant Enzyme Activities, Glycolytic Potential, Biochemical Parameters, Granulometry Parameters, and in Vitro Digestion Parameters

	day 1 ^a	day 4 ^a	ρ_A^b
antioxidant enzyme activities			
superoxide dismutase (U)	1.08 ± 0.06	1.26 ± 0.09	NS
catalase (nmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹)	2081 ± 189	2134 ± 132	NS
glycolytic potential			
glycolytic potential ($\mu\text{mol equiv lactate/g}$)	110.5 ± 2.5	108.6 ± 4.8	NS
residual glycogen ($\mu\text{mol/g}$)	9.3 ± 0.9	8.3 ± 1.1	NS
lactate ($\mu\text{mol/g}$)	91.8 ± 1.9	92.1 ± 3.6	NS
biochemical parameters			
carbonyls (nmol DNPH/mg protein)	1.35 ± 0.06 b	1.92 ± 0.04 a	***
myofibrillar protein hydrophobicity ($\mu\text{g bound BPB}$)	67.7 ± 3.1	61.7 ± 4.3	NS
TBA-RS (mg MDA/kg meat)	0.10 ± 0.03 b	0.26 ± 0.05 a	*
granulometry parameters			
particle number	25294 ± 3323 b	34916 ± 2690 a	*
EC diameter (μm)	13.4 ± 0.3	13.6 ± 0.1	NS
circularity	0.748 ± 0.008 b	0.788 ± 0.004 a	***
Feret aspect ratio	0.730 ± 0.004 b	0.752 ± 0.002 a	***
in vitro pepsin digestion			
initial slope ($\Delta OD/h$)	0.094 ± 0.002 a	0.086 ± 0.002 b	*
half-life time (min)	22.6 ± 0.7 b	24.8 ± 0.4 a	*
maximal degradation (OD_{max})	0.065 ± 0.002	0.065 ± 0.002	NS
maximal rate of digestion ($\Delta OD/h$)	0.138 ± 0.003 a	0.126 ± 0.003 b	*
time to maximal rate of digestion (min)	7.8 ± 0.2 b	8.6 ± 0.2 a	*
in vitro trypsin and α -chymotrypsin digestion			
initial OD	0.087 ± 0.001	0.088 ± 0.001	NS
initial slope ($\Delta OD/h$)	0.206 ± 0.005	0.210 ± 0.006	NS
half-life time (min)	6.4 ± 0.3	6.4 ± 0.3	NS
maximal degradation (OD_{max})	0.088 ± 0.003	0.090 ± 0.003	NS
maximal rate of digestion ($\Delta OD/h$)	0.65 ± 0.02	0.67 ± 0.02	NS
time to maximal rate of digestion (min)	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	NS

^aValues are the mean ± SEM of 12 pigs. Values followed by different letters (a, b) show significant differences between treatments ($p < 0.05$).

^b $\rho_{(A=ageing)}$ value from the ANOVA analysis represents the level of significance between days 1 and 4 and is annotated as $\rho > 0.05$, NS; $\rho < 0.05$, *; and $\rho < 0.001$, ***.

In Vitro Trypsin and α -Chymotrypsin Digestion. Protein hydrolysis by trypsin (E.C. 3.4.21.4, ref T0303, Sigma) and α -chymotrypsin (E.C. 3.4.21.1, ref C4129, Sigma) was preceded by pepsin digestion for 60 min at 37 °C as described above in order to mimic the gastric step. Pepsin activity was stopped by rising the pH with fresh glycine buffer (33 mM, pH 10.3), and cooling the samples on ice for 30 min. The final pH was about 8. Trypsin (6.55 U/mg of protein) and α -chymotrypsin (0.33 U/mg of protein) were then added in the tubes and placed at 37 °C for 4 h. Digestion was terminated by

addition of 15% (final concentration) trichloroacetic acid at various time points (0, 5, 12, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 min). Samples were then placed on ice for 1 h. After centrifugation at 4000 g for 15 min at 4 °C, hydrolyzed peptide content in the supernatant was measured at 280 nm.

All of the analyses were performed in duplicate.

Determination of in Vitro Parameters of Digestion Kinetics. The following mathematical model adapted from Gatellier and Santé-

Table 2. Effect of Mincing and Temperature on Biochemical Parameters, Granulometry Parameters, and in Vitro Digestion Parameters

	70 °C ^a	70 °C minced ^a	140 °C ^a	140 °C minced ^a	ρ_M^b	ρ_T^b	ρ_I^b
cooking loss (%)	21.5 ± 0.8 c	17.8 ± 1.2 d	58.2 ± 0.5 a	54.1 ± 0.3 b	***	***	NS
biochemical parameters							
carbonyls (nmol of DNPH/mg of protein)	1.66 ± 0.06 b	1.98 ± 0.04 b	3.14 ± 0.19 a	2.75 ± 0.13 a	NS	***	NS
myofibrillar protein hydrophobicity (µg bound BPB)	222.3 ± 3.7	225.6 ± 5.9	229.2 ± 5.6	219.1 ± 6.1	NS	NS	NS
TBA-RS (mg MDA/kg of meat)	0.96 ± 0.16 a	1.13 ± 0.15 a	0.30 ± 0.06 b	0.39 ± 0.07 b	NS	***	NS
granulometry parameters							
particle number	16764 ± 4121	20514 ± 4791	8653 ± 1707	11662 ± 1348	NS	NS	NS
EC diameter (µm)	8.8 ± 0.2	9.5 ± 0.3	8.6 ± 0.2	9.4 ± 0.3	NS	**	NS
circularity	0.821 ± 0.008 c	0.855 ± 0.004 ab	0.848 ± 0.005 b	0.874 ± 0.005 a	***	***	NS
feret aspect ratio	0.749 ± 0.005 b	0.767 ± 0.003 a	0.760 ± 0.004 ab	0.775 ± 0.004 a	***	*	NS
in vitro pepsin digestion							
initial slope (ΔOD/h)	0.107 ± 0.003 a	0.094 ± 0.004 b	0.065 ± 0.002 c	0.057 ± 0.003 c	**	***	NS
half-life time (min)	30.6 ± 1.1 b	33.5 ± 1.1 b	45.2 ± 0.8 a	49.3 ± 1.4 a	**	***	NS
maximal degradation (OD _{max})	0.106 ± 0.005 b	0.106 ± 0.005 b	0.122 ± 0.004 a	0.126 ± 0.004 a	NS	***	NS
maximal rate of digestion (ΔOD/h)	0.163 ± 0.004 a	0.148 ± 0.005 a	0.126 ± 0.003 b	0.121 ± 0.004 b	*	***	NS
time to maximal rate of digestion (min)	10.6 ± 0.4 b	11.7 ± 0.4 b	15.7 ± 0.3 a	17.2 ± 0.5 a	**	***	NS
in vitro trypsin and α-chymotrypsin digestion							
initial OD	0.105 ± 0.002 ab	0.099 ± 0.002 ab	0.089 ± 0.003 b	0.080 ± 0.002 c	**	***	NS
initial slope (ΔOD/h)	0.363 ± 0.014	0.374 ± 0.011	0.392 ± 0.009	0.376 ± 0.008	NS	NS	NS
half-life time (min)	9.4 ± 0.6	11.3 ± 1.1	12.8 ± 1.5	14.0 ± 1.3	NS	NS	NS
maximal degradation (OD _{max})	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	NS	NS	NS
maximal rate of digestion (ΔOD/h)	0.88 ± 0.03 a	0.83 ± 0.03 ab	0.82 ± 0.03 ab	0.74 ± 0.03 b	*	*	NS
time to maximal rate of digestion (min)	3.4 ± 0.2	4.0 ± 0.4	4.5 ± 0.5	5.0 ± 0.4	NS	NS	NS

^aValues are the mean ± SEM of 12 pigs. Values with different letters (a–d) show significant differences between treatments ($p < 0.05$).
^b $\rho_{(M=minging; T=temperature; I=interaction)}$ values from the ANOVA analysis represent the level of significance between 70 °C, 70 °C minced, 140 °C, and 140 °C minced and are annotated $\rho > 0.05$, NS; $\rho < 0.05$, *; $\rho < 0.01$, **; and $\rho < 0.001$, ***.

Lhoutellier³⁰ was used to fit the measurements for pepsin or trypsin/ α -chymotrypsin digestions (Figure 1)

$$OD = OD_{max} \times \exp\left(-\frac{B}{time}\right) \quad (1)$$

where $B = (\text{half-life time}) \cdot \ln(2)$.

For each digestion trial, primary parameter pairs (OD_{max} and half-life time) were estimated by minimizing the sum of squares of the differences between the calculated OD values and measured values (Figure 1A). OD_{max} represents the degradation potential, that is, the OD value that would be obtained after an infinite digestion time. The half-life time is the time needed to produce half the amount of hydrolyzed peptides in comparison to OD_{max} .

To better analyze the dynamics of the digestion process, the instantaneous rate of digestion was calculated from the derivative of eq 1

$$\frac{d(OD)}{d(time)} = 60 \times OD_{max} \times B \times \frac{1}{(time)^2} \times \exp\left(-\frac{B}{time}\right) \quad (2)$$

where $B = (\text{half-life time}) \cdot \ln(2)$.

Figure 1B shows an example of the curve of the instantaneous digestion rate ($\Delta OD/h$) versus time; curve shape was the same for all digestion trials. After a short ramp-up period, the digestion rate peaks at a maximal value and then decreases exponentially to become almost nil at the end of the incubation. Three parameters were determined to characterize this curve: maximal rate of digestion; time required to reach the maximal rate of digestion; and initial slope ($\Delta OD/h$), which was calculated as the mean value over the first 15 min for pepsin reactions and over the first 21 min for trypsin/ α -chymotrypsin reactions.

The initial rate of digestion is conventionally calculated by linear regression from the values measured during the fast digestion step (Figure 1A).³⁰ However, as the derivative curve (Figure 1B) shows that there is no linear part, the initial slope was calculated as the mean

value of the first 15 min for pepsin reactions and of the first 21 min for trypsin/ α -chymotrypsin reactions. The initial slope value was found to be similar to the initial rate but was less affected by experimental errors in OD determinations because it is derived from the estimated OD_{max}/B , which integrates all of the measurements rather than just a selected four or five.

Trypsin/ α -chymotrypsin digestion was assessed using another parameter, that is, initial OD. This value was measured when trypsin/ α -chymotrypsin digestion was begun (time 0) and represents the level of hydrolyzed proteins obtained after 1 h of pepsin digestion.

Statistical Methods. Analysis of variance (ANOVA) was performed using the general linear model procedure of the SAS software package (version 8.1, STAT, SAS Institute, Cary, NC, USA). Three linear models were performed: (i) including aging, (ii) including mincing with temperature (at 70 and 140 °C) as fixed effects, and (iii) including temperature. When significant effects were found for aging, mincing, or temperature, least-squares means were compared by computing LSMEANS with the PDIFF option followed by Tukey adjustment. Furthermore, a principal component analysis was performed on the entire data set using STATISTICA software (version 7.1, Stat Soft, Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Aging. Table 1 summarizes the measurements on antioxidant status, glycolytic potential, biochemical parameters, granulometry parameters, and the in vitro pepsin and trypsin/ α -chymotrypsin digestion parameters.

SOD and catalase antioxidant enzyme activities reflected muscle antioxidant status before the technological treatments. Both enzymes help regulate oxidative stress by eliminating the toxic superoxide ions, first by forming hydrogen peroxide and second by forming water and O_2 . SOD activity and catalase activity did not vary during meat aging. Consequently, aging for

Table 3. Effect of Temperature on Biochemical Parameters, Granulometry Parameters, and in Vitro Digestion Parameters

	raw ^a	70 °C ^a	100 °C ^a	140 °C ^a	ρ_T^b
cooking losses (%)		21.5 ± 0.8 c	31.6 ± 0.7 b	58.2 ± 0.5 a	***
biochemical parameters					
carbonyls (nmol DNPH/mg protein)	1.92 ± 0.04 c	1.66 ± 0.06 c	2.29 ± 0.05 b	3.14 ± 0.19 a	***
myofibrillar protein hydrophobicity (μ g bound BPB)	61.7 ± 4.3 c	222.3 ± 3.7 b	236.8 ± 5.1 a	229.2 ± 5.6 ab	***
TBA-RS (mg MDA/kg of meat)	0.26 ± 0.05 c	0.96 ± 0.16 a	0.66 ± 0.09 b	0.30 ± 0.06 c	***
granulometry parameters					
particle number	34916 ± 2690 a	16764 ± 4121 b	10563 ± 2741 b	8653 ± 1707 b	***
EC diameter (μ m)	13.6 ± 0.1 a	8.8 ± 0.2 c	10.1 ± 0.5 b	8.6 ± 0.2 c	***
circularity	0.788 ± 0.004 c	0.821 ± 0.008 b	0.843 ± 0.005 a	0.848 ± 0.005 a	***
feret aspect ratio	0.752 ± 0.002	0.749 ± 0.005	0.761 ± 0.004	0.760 ± 0.004	NS
in vitro pepsin digestion					
initial slope (Δ OD/h)	0.086 ± 0.002 b	0.107 ± 0.003 a	0.064 ± 0.003 c	0.065 ± 0.002 c	***
half-life time (min)	24.8 ± 0.4 c	30.6 ± 1.1 b	46.1 ± 1.4 a	45.2 ± 0.8 a	***
maximal degradation (OD _{max})	0.065 ± 0.002 c	0.106 ± 0.005 b	0.124 ± 0.003 a	0.122 ± 0.004 a	***
maximal rate of digestion (Δ OD/h)	0.126 ± 0.003 b	0.163 ± 0.004 a	0.127 ± 0.002 b	0.126 ± 0.003 b	***
time to maximal rate of digestion (min)	8.6 ± 0.2 c	10.6 ± 0.4 b	16.1 ± 0.5 a	15.7 ± 0.3 a	***
in vitro trypsin and α -chymotrypsin digestion					
initial OD	0.088 ± 0.001 b	0.105 ± 0.002 a	0.086 ± 0.002 b	0.089 ± 0.003 b	***
initial slope (Δ OD/h)	0.210 ± 0.006 c	0.363 ± 0.014 b	0.381 ± 0.008 ab	0.392 ± 0.009 a	***
half-life time (min)	6.4 ± 0.3 b	9.4 ± 0.6 b	13.3 ± 1.3 a	12.8 ± 1.5 a	***
maximal degradation (OD _{max})	0.09 ± 0.003 c	0.17 ± 0.01 b	0.21 ± 0.01 a	0.21 ± 0.01 a	***
maximal rate of digestion (Δ OD/h)	0.67 ± 0.02 c	0.88 ± 0.03 a	0.77 ± 0.03 b	0.82 ± 0.03 ab	***
time to maximal rate of digestion (min)	2.3 ± 0.1 b	3.4 ± 0.2 b	4.7 ± 0.4 a	4.5 ± 0.5 a	***

^aValues are the mean \pm SEM of 12 pigs. Values with different letters (a–c) show significant differences between treatments ($p < 0.05$).

^b $\rho_{(T=temperature)}$ values from the ANOVA analysis represent the level of significance between raw meat and meat cooked at 70, 100, and 140 °C and are annotated $\rho > 0.05$, NS; and $\rho < 0.001$, ***.

a few days did not appear to modify muscle antioxidant status. These values are comparable to those obtained by Renner et al.³¹ on bovine Longissimus muscle during storage.

Glycolytic potential measurements were used to gauge the potential for postslaughter tissue acidification. Residual glycogen content and lactic acid content did not vary during aging. Measured glycolytic potential was similar to the values reported by Talmant et al.³² for commercial pig breeds.

Concerning the biochemical parameters (i.e., lipid and protein oxidation and protein hydrophobicity), aging resulted in at least a 40% increase in carbonyl groups and TBA-RS rose sharply to 260%. Aging had no effect on protein hydrophobicity. Aging had no effect on protein denaturation but promoted both lipid and protein oxidation. In an in vitro study, Santé-Lhoutellier et al.¹⁸ reported that protein hydrophobicity was enhanced in the presence of oxidants such as Fe²⁺/H₂O₂ at concentrations above 0.5 M. However, this level of oxidant concentration is seldom found in meat during aging.

In the myofibril extract, aging had no effect on particle diameter but increased particle numbers, circularity, and Feret aspect ratio, thus revealing that the particles undergo proteolysis.

In vitro pepsin digestion parameters showed a decrease in initial slope and in maximal rate of digestion, whereas there was no change in half-life time or time to maximal rate of digestion with aging. Thus, aging slightly slowed pepsin digestion rate but had no impact on maximal degradation. The endogenous proteolysis occurring within the muscle during aging, as shown above via the increase in particle numbers, did not appear to promote digestion by gastric enzymes. This could be due to the fact that the pork meat was aged for only a short period, and we cannot exclude that longer aging could have led to more

peptides or protein fragments being produced. Aging had no effect on digestion by intestinal enzymes.

To summarize, aging promoted both protein and lipid oxidation and tended to speed protein aggregation. However, the impact on digestion parameters remained low.

Effect of Mincing. Mincing is a common process in the meat industry. Table 2 summarizes the effects of mincing on the parameters studied.

Water losses measured on unminced and minced samples averaged 21.5 and 17.8%, respectively, after cooking at 70 °C and 58.2 and 54.1%, respectively, after cooking at 140 °C. The results show that water losses were significantly lower in minced samples. This can be explained by the fact that the mincing process led to around 4% of water losses occurring during the 24 h in storage prior to cooking. Cooking loss is a result of coshrinkage of connective tissue and muscle fibers occurring during heating, which causes thermal denaturation of meat proteins. This denaturation is visible in the secondary protein structure as an increase in aggregated β -sheet structure and a decrease in α -helices.³³

Mincing alone was expected to significantly amplify protein and lipid oxidation by increasing the meat surface area exposed to contact with oxygen, yet surprisingly no difference was observed between unminced and minced samples. One of several plausible explanations is that the 24 h postmincing storage period could be too short to initiate oxidation reactions.³⁴ Note also that protein hydrophobicity remained unaffected.

Mincing was not found to result in variation in particle numbers or diameter, but circularity and Feret aspect ratio both decreased. This could be explained by mechanical dispersion of the compounds. Concerning the effects of mincing on in vitro digestion parameters, mincing led to a 10% drop in initial slope

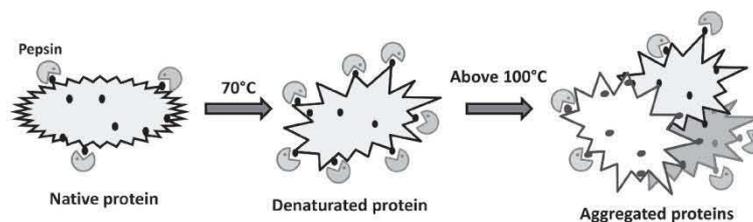


Figure 2. Proposed mechanism of pepsin action on raw (native) protein and proteins heated at different cooking temperatures.

and a maximal rate of pepsin digestion and, consequently, a rise in the half-life time and time to reach maximal rate. These results show a reduction of degradation potential of protein by pepsin, following mincing.

The only mincing-related differences recorded after trypsin/ α -chymotrypsin digestion were a lower initial OD, which is consistent with the pattern previously observed for pepsin digestion, and a decrease in maximal rate of digestion.

Effect of Heating. The effects of heating are presented in Table 3.

Water losses measured on samples after cooking at 70, 100, and 140 °C averaged 21.5, 31.6, and 58.2%, respectively.

Under our experimental conditions, heating above 100 °C led to an increase in carbonyl groups. Gatellier et al.³⁵ also found that carbonyl content remained stable in beef heated to 65 and 96 °C.

Surface hydrophobicity of myofibrillar proteins increased dramatically with heating, without heating temperature-related differences. Chelh et al.²⁸ showed that even after a 30 min heat treatment, most BPB was already bound to the proteins at 60 °C. At 100 °C, Santé-Lhoutellier et al.¹¹ showed that protein denaturation peaked after just 5 min.

These data reflected a low exposure of hydrophobic sites in raw meat that subsequently increased at higher temperatures, which may lead to protein aggregation. The review by Morris et al.³⁶ together with research by Cellmer et al.³⁷ has comprehensively described the aggregation mechanisms through which globular proteins merge into amorphous or fibrillar aggregates.

TBA-RS content increased by around 270% after heat treatment at 70 °C but decreased at higher temperatures. This two-phase pattern has been reported in earlier work.³⁸ The decrease is thought to be due to the breakdown of malondialdehyde (MDA) into volatile compounds or to their reaction with protein chains, leading to the formation of Schiff bases, which are compounds known to play a role in protein aggregation.

Heat treatment had a progressive effect on particle numbers, which decreased around 75% at a treatment temperature of 140 °C, as well as on particle diameter, which decreased 30–40%. The main effect was observed when raw meat was compared to heated meat. These findings further emphasized the occurrence of a heating-induced particle aggregation and compaction effect. Philo and Arakawa³⁹ proposed a mechanism of aggregation that leads to the irreversible formation of oligomers and consequently lower particle numbers. Two main steps were described according to the molecular interactions taking place: the first involves conformational changes or partial protein unfolding leading to probably irreversible oligomers, whereas the second involves chemical reactions such as oxidation or deamidation that also lead to protein aggregation. In the present study, protein denaturation occurred at a temperature

of 70 °C, as shown by the increase in protein surface hydrophobicity. This modification remained the major protein change. At higher temperatures, the proteins were further modified by oxidation, which promotes aggregation. This hypothesis is further supported by increases in circularity and Feret aspect ratio. The more fibrous-shaped particles in the raw sample will tend to respond to heating by folding and agglomerating, mainly through hydrophobic interactions, until they form circular densely packed aggregates.¹⁶ Working at the ultrastructural level, Astruc et al.⁸ demonstrated the presence of granular aggregates within muscle cells close to the sarcolemma and very likely from the myofibrils.

Pepsin digestion parameters showed that heating at 70 °C increased initial slope compared to raw meat. After higher temperature treatments, the initial slope dropped back to the same level as that measured in the original raw meat. Half-life time increased progressively according to temperature and maximum degradation rate. In comparison with raw meat, half-life time increased by around 25 and 85% after cooking at 70 and 100 °C, respectively, and did not increase further at 140 °C. Evenepoel et al.⁴⁰ reported similar results with raw and cooked egg. Heating egg protein doubled almost the duration in gastric emptying compared to raw egg protein. In the present study, we found that the heat treatments result in protein denaturation, characterized by visible protein conformation changes that maximize protein surface exposure to hydrophobic zones and thus promote the bioaccessibility of pepsin to cleavage sites, although only up to a certain limit, as at higher temperatures the aggregation process appears to outpace the thermal denaturation process. To summarize, pepsin cleaves hydrophobic aromatic amino acids such as phenylalanine, tyrosine, and tryptophan. Pepsin activity appears to be temperature-dependent. Santé-Lhoutellier et al.¹¹ found a sharp decrease in the rate of myofibrillar protein proteolysis by gastric pepsin heated at 100 °C and reported that this increase was correlated to the increase in carbonyl content. Studying phaseolins from beans autoclaved at 121 °C, Montoya et al.²⁰ did not find any changes in the degree of in vitro pepsin hydrolysis compared to raw phaseolins. Studying Cantonese sausages, Sun et al.²¹ reported that the rate of pepsin hydrolysis decreased with heating duration, but comparison remains difficult, because the temperature applied was fairly low (under 50 °C) and Cantonese sausage can be considered a meat emulsion that includes both pro-oxidants (21% lipids) and antioxidants such as polyphenol from wine, as well as sodium nitrite.

Figure 2 proposes a mechanism of pepsin action based on our results. In a first step, heating produced protein conformational changes, enhancing the hydrolyzability by pepsin, and in a second step, protein oxidation processes were further added, leading to protein aggregation and a decrease of protein hydrolyzability by pepsin. These findings

were confirmed by the parameters calculated using hydrolysis equations. The maximum rate of digestion and time to reach maximal rate followed the same profile as half-life time and maximum degradation rate. These results suggest that degradation potential is greater in cooked meat but requires a longer digestion time.

Focusing on trypsin and α -chymotrypsin digestion, the first parameter measured was initial OD, which gives the level of degradation achieved during the prior pepsin digestion phase. The only difference found in terms of initial OD was under heat treatments at 70 °C, which led to 19% higher OD than in raw samples or samples heated at temperatures over 70 °C. This means that at a set time interval (in this case a 60 min pepsin digestion), the heat treatment at 70 °C has a greater degradation potential. The initial slope increased by 70% under heat treatment at 70 °C and by >82% at 100 and 140 °C. Half-life time and time to maximal degradation rate increased by 50% after cooking at 70 °C and by >100% after cooking at 100 and 140 °C. After cooking, the degradation potential (OD_{max}) increased by >85% compared to raw samples, which translates to an improved amino acid availability. This digestion profile with trypsin and α -chymotrypsin appears to mirror the pepsin digestion profile. In an *in vivo* study on egg proteins, Evenepoel et al.⁴⁰ reported a 77% increase in true ileal digestibility for cooked eggs together with improved protein assimilation. Montoya et al.²⁰ showed a dramatic increase in *in vitro* pancreatic hydrolysis of phaseolins with heating. Their results suggest the improved degree of hydrolysis is mainly due to structural changes and that pepsin plays a role at the initiation stage. In conclusion, our findings show that heating conditions tend to have effects on trypsin/ α -chymotrypsin digestion similar to those on pepsin digestion: the heat treatment improves the degradation potential of meat, although only at longer digestion times. It is, however, noteworthy that the digestion rate is faster with trypsin/ α -chymotrypsin compared to pepsin. The mathematical model developed here (see Materials and Methods) made it possible to evaluate the time needed to obtain different degrees of protein hydrolysis. For example, with pepsin, it would take 25 min to reach 50% raw meat protein hydrolysis compared to 31 and 45 min for meat cooked at 70 and 140 °C, respectively. For trypsin/ α -chymotrypsin, it would take 6 min to reach 50% raw meat protein hydrolysis compared to 9 and 13 min for meat cooked at 70 and 140 °C, respectively.

Pooling the full set of biochemical, granulometry, and digestion data enabled us to run a principal component analysis, which revealed that data could be distinguished into three separate groups (Figure 3). On the first axis, raw meat was opposed to the cooked meat whatever the temperature (increased circularity was opposed to number of particles and EC diameter). BPB and carbonyls were positively associated with the first axis. On the second axis, the group of meats cooked at 70 °C was opposed to the group of meats cooked at either 100 or 140 °C (initial slope of pepsin and maximal rate both digestive proteases were associated positively to the second axis). The effect of mincing remained negligible compared to heat treatment.

This study elucidated the hypothesis that technological processes can affect meat protein digestion parameters and consequently meat protein nutrition value. The results demonstrate that heating temperature modified the physico-chemical state of myofibrillar proteins. We highlighted two different physical–chemical mechanisms according to heating

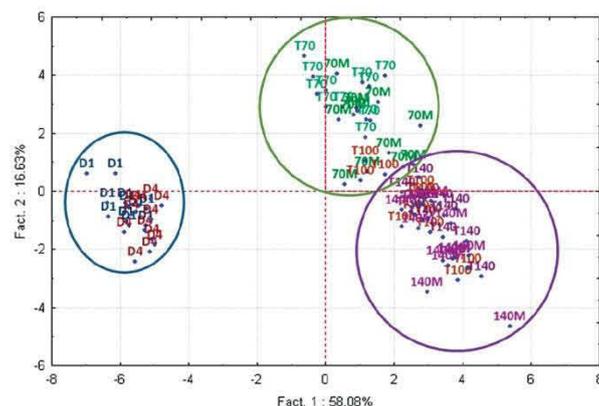


Figure 3. Principal component analysis plot: factor 1 versus factor 2 of all treatments. Abbreviations for raw meat: D1, day 1; D4, day 4 (blue circle). Abbreviations for cooked meat: T70, 70 °C unminced; 70 M, 70 °C minced (green circle); T100, 100 °C unminced; T140, 140 °C unminced; 140 M, 140 °C minced (purple circle).

temperature. The first mechanism occurs at a temperature of 70 °C, when the proteins undergo conformational changes that increase their hydrolyzability by pepsin. The second mechanism is triggered at higher temperatures (i.e., 100 °C), at which the dominant effects are oxidation-related. In general, heat treatment improves meat degradation potential, although only at longer digestion times. The digestion parameters defined (maximal slope, half-life time, and maximal degradation) show that it is possible to grasp a dynamic dimension of the *in vitro* digestion model. Moreover, this *in vitro* approach makes it possible to compare a broad series of processing conditions. However, *in vitro* digestion approaches do have their limitations, especially in terms of intestinal absorption factors. Complementary *in vivo* studies will bridge many of these limitations.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33 473 62 47 08. E-mail: veronique.sante@clermont.inra.fr.

Funding

We are grateful to the French Research National Agency (ANR-09-ALIA-008-01 Program PRONUTRIAL (2010-2013)), the European fund for regional development (FEDER), and the Auvergne regional council for their financial support.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ABBREVIATIONS USED

D1, day 1; D4, day 4; CL, cooking loss; SOD, superoxide dismutase; GP, glycolytic potential; BHT, butyl hydroxytoluene; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; BPB, bromophenol blue; OD, optical density; TBA-RS, thiobarbituric acid-reactive substances; MDA, malondialdehyde; EC, equivalent circle.

REFERENCES

- (1) Cross, A. J.; Leitzmann, M. F.; Gail, M. H.; Hollenbeck, A. R.; Schatzkin, A.; Sinha, R. A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. *PLoS Med.* **2007**, *4* (e325), 1–12.

- (2) McAfee, A. J.; McSorley, E. M.; Cuskelly, G. J.; Moss, B. W.; Wallace, J. M. W.; Bonham, M. P.; Fearon, A. M. Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 1–13.
- (3) Alexander, D. D.; Cushing, C. A. Red meat and colorectal cancer: a critical summary of prospective epidemiologic studies. *Obes. Rev.* **2010**, *12*, e472–e493.
- (4) Tabatabaei, S. M.; Fritschi, L.; Knuiaman, M. W.; Boyle, T.; Iacopetta, B. J.; Platell, C.; Heyworth, J. S. Meat consumption and cooking practices and the risk of colorectal cancer. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2011**, *65*, 668–675.
- (5) Mosoni, L.; Patureau Mirand, P. Type and timing of protein feeding to optimize anabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2003**, *6*, 301–306.
- (6) Silvester, K. R.; Cummings, J. H. Does digestibility of meat protein help explain large-bowel cancer risk. *Nutr. Cancer—Int. J.* **1995**, *24*, 279–288.
- (7) Rémond, D.; Machebeuf, M.; Yven, C.; Buffière, C.; Mioche, L.; Mosoni, L.; Mirand, P. P. Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1286–1292.
- (8) Astruc, T.; Gatellier, P.; Labas, R.; Santé-Lhoutellier, V.; Marinova, P. Microstructural changes in m. *rectus abdominis* bovine muscle after heating. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 743–751.
- (9) Liu, G.; Xiong, Y. L. Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and in vitro digestibility of oxidized myosin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 624–630.
- (10) Liu, G.; Xiong, Y. L. Oxidatively induced chemical changes and interactions of mixed myosin, β -lactoglobulin and soy 7S globulin. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1601–1607.
- (11) Santé-Lhoutellier, V.; Astruc, T.; Marinova, P.; Greve, E.; Gatellier, P. Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1488–1494.
- (12) Davies, K. J. A.; Delsignore, M. E.; Lin, S. W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. 2. Modification of amino-acids. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9902–9907.
- (13) Stadtman, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biol. Med.* **1990**, *9*, 315–325.
- (14) Gatellier, P.; Gomez, S.; Gigaud, V.; Berri, C.; Bihan-Duval, E. L.; Santé-Lhoutellier, V. Use of a fluorescence front face technique for measurement of lipid oxidation during refrigerated storage of chicken meat. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 543–547.
- (15) Yin, D. Z.; Chen, K. J. The essential mechanisms of aging: irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Exp. Gerontol.* **2005**, *40*, 455–465.
- (16) Promeyrat, A.; Bax, M. L.; Traoré, S.; Aubry, L.; Santé-Lhoutellier, V.; Gatellier, P. Changed dynamics in myofibrillar protein aggregation as a consequence of heating time and temperature. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 625–631.
- (17) Kamin-Belsky, N.; Brillon, A. A.; Arav, R.; Shklai, N. Degradation of myosin by enzymes of the digestive system: comparison between native and oxidatively cross-linked protein. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1641–1646.
- (18) Santé-Lhoutellier, V.; Aubry, L.; Gatellier, P. Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5343–5348.
- (19) Evenepoel, P.; Claus, D.; Geypens, B.; Maes, B.; Hiele, M.; Rutgeerts, P.; Ghoo, Y. Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein, related to gastric acid suppression therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1998**, *12*, 1011–1019.
- (20) Montoya, C. A.; Leterme, P.; Victoria, N. F.; Toro, O.; Souffrant, W. B.; Beebe, S.; Lallès, J. P. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2183–2191.
- (21) Sun, W.; Zhou, F.; Zhao, M.; Yang, B.; Cui, C. Physicochemical changes of myofibrillar proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and *in vitro* digestibility. *Food Chem.* **2011**, *129*, 472–478.
- (22) Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 469–474.
- (23) Aebi, H. Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed.; Bergmeyer, H. U., Ed.; Academic Press: New York, 1974; pp 673–677.
- (24) Dalrymple, R. H.; Hamm, R. A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1973**, *8*, 439–444.
- (25) Bergmeyer, H. U. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed.; Academic Press: New York, 1974; Vol. 3, pp 1127, 1196, 1238, 1464.
- (26) Monin, G.; Sellier, P. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: the case of the Hampshire breed. *Meat Sci.* **1985**, *13*, 49–63.
- (27) Oliver, C. N.; Ahn, B. W.; Moerman, E. J.; Goldstein, S.; Stadtman, E. R. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5488–5491.
- (28) Chelh, I.; Gatellier, P.; Sante-Lhoutellier, V. Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 681–683.
- (29) Lynch, S. M.; Frei, B. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 1745–1753.
- (30) Gatellier, P.; Santé-Lhoutellier, V. Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat Sci.* **2009**, *81*, 405–409.
- (31) Renerre, M.; Dumont, F.; Gatellier, P. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Sci.* **1996**, *43*, 111–121.
- (32) Talmant, A.; Fernandez, X.; Sellier, P.; Monin, G. Glycolytic potential in *Longissimus dorsi* muscle of Large White pigs, as measured after *in vivo* sampling. *Proc. 35th Int. Congr. Meat Sci. Technol* **1989**, 1129–1132.
- (33) Wu, Z.; Bertram, H. C.; Kohler, A.; Bocker, U.; Ofstad, R.; Andersen, H. J. Influence of aging and salting on protein secondary structures and water distribution in uncooked and cooked pork. A combined FT-IR microspectroscopy and ¹H NMR relaxometry study. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8589–8597.
- (34) Kanner, J.; Shegalovich, I.; Harel, S.; Hazan, B. Muscle lipid peroxidation dependent on oxygen and free metal ions. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 409–412.
- (35) Gatellier, P.; Kondjoyan, A.; Portanguen, S.; Santé-Lhoutellier, V. Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 645–650.
- (36) Morris, A. M.; Watzky, M. A.; Finke, R. G. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2009**, *1794*, 375–397.
- (37) Cellmer, T.; Douma, R.; Huebner, A.; Prausnitz, J.; Blanch, H. Kinetic studies of protein L aggregation and disaggregation. *Biophys. Chem.* **2007**, *125*, 350–359.
- (38) Gatellier, P.; Santé-Lhoutellier, V.; Portanguen, S.; Kondjoyan, A. Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. *Meat Sci.* **2009**, *83*, 651–656.
- (39) Philo, J. S.; Arakawa, T. Mechanisms of protein aggregation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 348–351.
- (40) Evenepoel, P.; Geypens, B.; Luypaerts, A.; Hiele, M.; Ghoo, Y.; Rutgeerts, P. Digestibility of cooked and raw egg protein in humans as assessed by stable isotope techniques. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1716–1722.

Conclusions de cet article

Les résultats ainsi obtenus ont permis de dégager un mécanisme d'action potentiel des protéases sur les protéines de la viande cuite.

Grâce à notre dispositif de digestion *in vitro*, nous avons pu définir à partir de la cinétique de digestion : la vitesse initiale de digestion, le potentiel de dégradation maximale, le temps de demi-vie correspondant à la durée nécessaire pour dégrader la moitié des protéines, la vitesse maximale et le temps d'obtention de cette vitesse maximale. Différents procédés technologiques ont ainsi été étudiés : la maturation (1 vs 4 jours), le hachage (broyeur à hélice), et la cuisson (70, 100, 140°C). Nous avons ainsi montré que la maturation et le hachage de la viande n'affecte pas significativement les paramètres de digestion *in vitro* des protéines myofibrillaires par la pepsine. Par contre, les vitesses initiales et maximales de digestion augmentent avec une cuisson à 70°C (par rapport à la viande crue), puis diminuent quand la température augmente (100 et 140°C). Le temps de demi-vie et la dégradation maximale augmentent graduellement lorsque la température de chauffage augmente de 0 à 100°C, puis se stabilise entre 100 et 140°C. D'un point de vue nutritionnel, ces paramètres suggèrent qu'une cuisson à basse température (aux environs de 70°C) favorise une digestion stomacale rapide mais incomplète, alors qu'une cuisson à une température plus élevée (aux environs de 100°C) ralentit la digestion mais assure une digestion plus complète.

Au niveau de la digestibilité des protéines carnées dans l'intestin grêle, nous avons étudié celle-ci *in vitro*, en utilisant un dispositif combiné, impliquant une digestion initiale à la pepsine suivie d'une digestion par un mélange trypsine/ α -chymotrypsine. Les paramètres utilisés pour caractériser la digestion par les enzymes pancréatiques étaient les mêmes que ceux utilisés pour la digestion par la pepsine. De même que pour la digestion à la pepsine, les paramètres de la digestion par le couple trypsine/ α -chymotrypsine, ne sont pas affectés par la durée de maturation ou le hachage de la viande. En ce qui concerne la température de cuisson, tous les paramètres mesurés (vitesse initiale de digestion, potentiel de dégradation maximale, temps de demi-vie, et la vitesse maximale) augmentent entre la viande crue et celle cuite à 70°C. Globalement, il est observé sensiblement le même profil que lors de la digestion à la pepsine seule, le traitement thermique à 70°C, sur l'ensemble des critères de digestion *in vitro* définis, se distingue de la viande crue et de la viande cuite au-delà de 100°C (Figure 3 de l'article).

D'un point de vue mécanistique, l'effet de la cuisson sur la digestion des protéines pourrait s'expliquer de la façon suivante. Dans la viande crue, la protéine native internalise en grande partie ses groupements hydrophobes et donc possède une accessibilité limitée pour les protéases digestives notamment la pepsine. Un traitement thermique conduit à une dénaturation de la protéine, ce qui se traduit par une externalisation des acides aminés hydrophobes et par conséquent des sites hydrophobes accessibles aux protéases. Pour une température jusqu'à 70°C, la dénaturation est prépondérante. Pour des traitements thermiques supérieurs à cette température, à cette dénaturation, vient s'ajouter le phénomène d'agrégation vraisemblablement initié par des réactions d'oxydation, d'interactions hydrophobes, de pontage covalent,... Les sites hydrophobes des protéines seront donc toujours extériorisés, mais moins accessibles aux protéases du fait de l'agrégation et de l'encombrement protéique qu'elle induit. Cela est confirmé avec la diminution des vitesses et l'augmentation des temps de demi-vie et d'obtention de la vitesse maximale ainsi que du potentiel de dégradation.

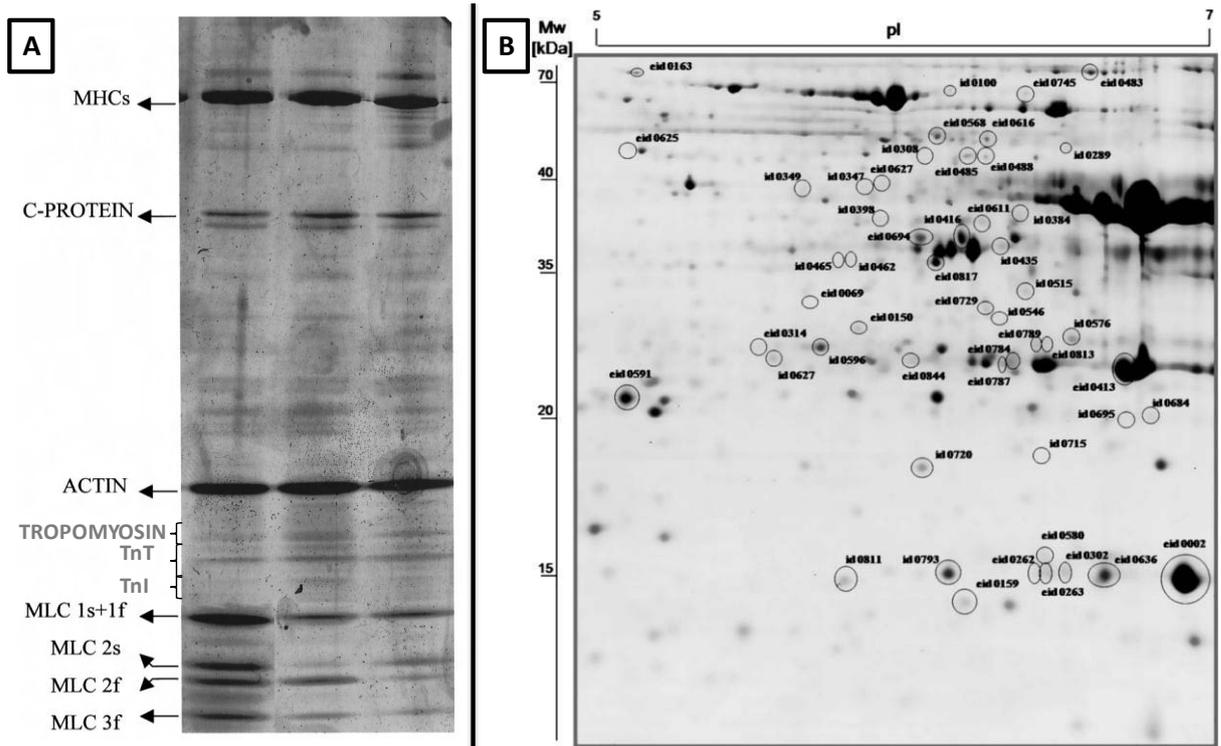


Figure 26 Exemple de séparations électrophorétiques des protéines musculaires. A : Séparation monodimensionnelle d'une fibre musculaire humaine par gel SDS-PAGE 12%. (Bottinelli et Reggiani, 2000) B : Séparation bidimensionnelle des protéines sarcoplasmiques du muscle *Longissimus lumborum* de porc. (Promeyrat et al., 2011)

II. Séparation et analyse des protéines musculaires

II.A. *Méthodes de séparation*

Le muscle est donc un mélange complexe de protéines. Il existe plusieurs méthodes permettant de séparer ces protéines :

- ✓ L'ultrafiltration ou la centrifugation différentielle sont des méthodes de séparation *via* soit une membrane qui va séparer les particules d'un certain diamètre soit à l'aide de centrifugations différentielles aux conditions de temps et d'accélération croissantes.
- ✓ Les techniques chromatographiques sont des méthodes physiques de séparation faisant intervenir soit des colonnes de séparation qui vont permettre de séparer les différents composés, soit à l'aide de combinaisons de solvants, de gaz ou de liquides qui vont « décrocher » les protéines en fonction de spécificités précises. Ces méthodes sont basées sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.
- ✓ L'électrophorèse qui repose sur la capacité des protéines à migrer au travers des pores d'un gel lorsqu'on applique un courant électrique.

Dans le cas du muscle, après séparation des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires par centrifugation différentielle, les techniques d'électrophorèses SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) sont employées pour séparer, en fonction de leur taille, les protéines de chacune des fractions. Pour cela, les protéines sont entièrement dénaturées, puis chargées négativement en présence de SDS, afin de les faire migrer à l'intérieur d'un gel en appliquant un champ électrique. Les petites protéines vont migrer plus rapidement que les grosses, il y aura donc une séparation en fonction de la taille (poids moléculaire) et de la forme. Comme illustré sur la Figure 26A, extraite de la revue de Bottinelli et Reggiani (2000), en utilisant cette technique il est possible de séparer plusieurs protéines de la fraction myofibrillaire : les chaînes lourdes et légères de myosine, et leurs isoformes, l'actine, la protéine C, la tropomyosine et les différentes troponines. Avec cette méthode, il est possible de séparer de l'ordre de 50 protéines environ.

L'électrophorèse bidimensionnelle est utilisée pour obtenir une séparation plus fine des différentes protéines (illustration : Figure 26B). Le principe consiste à séparer les protéines dans une première dimension horizontale en fonction de leur point isoélectrique (pI), et dans une

seconde dimension verticale en fonction de leur poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE comme vu précédemment. Avec cette méthode, il est possible de séparer plus de 1000 protéines. Elle permet généralement d'analyser des protéines ayant un pI de 3 à 8 et un poids moléculaire de 10 à 100 kDa (Hébraud, 2002).

Une fois les protéines séparées, il est possible de comparer différentes conditions et de prélever des "spots" protéiques d'intérêt en vue de leur identification par spectrométrie de masse. Ces méthodes permettent de mettre en évidence des protéines différemment exprimées, en fonction des conditions expérimentales. Ces observations aident à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'établissement des effets observés. En utilisant cette technique, Promeyrat *et al.* (2011) ont par exemple mis en évidence des protéines sarcoplasmiques corrélées à l'oxydation des protéines (taux de carbonyles) durant la maturation et la cuisson chez le porc (cercles sur la Figure 26B). De même, Sayd *et al.* (2006) ont pu mettre en évidence des protéines influençant le développement de la couleur de la viande de porc. A savoir que les viandes plus sombres possèdent un métabolisme oxydatif plus important avec plus d'enzymes mitochondriales, d'hémoglobine et de protéines chaperonnes comme l'HSP 27, l' α -cristalline et à l'inverse les viandes plus claires possèdent un plus grand nombre d'enzymes du métabolisme glycolytique (énolase, glycérol-3-phosphate).

II.B. L'analyse protéomique

L'analyse protéomique a porté sur les échantillons à J1 (24 heures *post mortem*). Les fractions myofibrillaires et sarcoplasmiques ont été séparées et analysées distinctement. L'extraction de ces 2 fractions a demandé des mises au point. En effet, la fraction myofibrillaire a été difficile à séparer de la fraction sarcoplasmique. Il semblerait que les protéines myofibrillaires avaient tendance à se solubiliser ce qui donnait des concentrations très élevées pour la fraction sarcoplasmique et très faibles voire inexistantes pour la fraction myofibrillaire. Des ajustements sur les temps et vitesses de centrifugation ont donc été nécessaires. L'extraction des protéines sarcoplasmiques se fait à l'aide d'un tampon tris-HCL (1,5 M, pH 8), EDTA (100 mM) et un cocktail d'inhibiteurs. Pour la fraction myofibrillaire, le tampon d'extraction est constitué d'urée (7 M), de thiourée (2 M), de CHAPS (4%), d'EDTA (100 mM), de cocktail d'inhibiteur et de DTT (1%). Pour la fraction sarcoplasmique, la gamme de pH utilisée pour l'électrophorèse est de pH 5 à 8 et pour la fraction myofibrillaire la gamme est de 3 à 10. Les gels de séparation sont respectivement de 12% et 11% d'acrylamide. Après la migration, les gels sont colorés au bleu colloïdal (G250), scannés puis analysés avec le logiciel Progenesis SameSpots.

Nous avons essayé de relier les différences au niveau du profil protéomique avec les paramètres de digestion *in vitro* et plus particulièrement les vitesses.

Une première étude avec des mesures de digestion *in vitro* avec une pepsine à 50U/mg de protéines a fait l'objet d'un poster à l'ICOMST 2010 (Cf. Valorisations et Annexes). Mais les recherches ne sont pas allées plus loin sur ce domaine, nous avons préféré nous focaliser sur une quantité de pepsine de 10U/mg de protéines.

Des analyses statistiques, de type "sparse PLS", avaient été prévues afin de voir s'il existait des corrélations entre les matrices protéomiques, biochimiques et de digestion *in vitro* (pepsine 10U/mg de protéines puis couplée à la trypsine (6,55U/mg de protéines) et α -chymotrypsine (0,33U/mg de protéines)). Pour cette analyse nous avons fait appel à une statisticienne Anne de la Foye sur la plateforme PFEM de l'UNH. Mais l'analyse escomptée s'est révélée incompatible avec nos données pour l'heure actuelle, la quantité de données étant d'origine trop variée (biochimique, protéomique), les modèles de "sparse PLS" existants ne sont pas adaptés pour traiter ces dernières mais les statisticiennes sont à ce jour toujours penchées sur ce problème.

Article 2 : La composition musculaire affecte légèrement la digestion *in vitro* de la viande maturée et cuite : Identification des marqueurs protéomiques associés. (Accepté)

Food Chemistry (2013), 136, 1249-1262

L'analyse protéomique est une méthode permettant de caractériser finement la composition tissulaire (isoformes, phosphorylation, fragments,...) et couplée à l'analyse d'image et à la spectrométrie de masse, elle permet d'identifier les protéines d'intérêt.

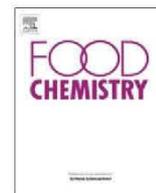
En effet, comme nous l'avons vu précédemment, cet outil s'avère adapté à la mise en évidence de corrélations entre des marqueurs protéomiques et des déterminants de la qualité de la viande (Force de cisaillement, Laville *et al.*, 2007; Dureté-tendreté, Laville *et al.*, 2009; Couleur, Sayd *et al.*, 2006) ou encore sur l'effet de la maturation au niveau des protéines (Lametsch *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2006; Bjarnadottir *et al.*, 2010). Dans le domaine de la qualité nutritionnelle des matrices carnées, ces approches n'ont pas été, à notre connaissance, développées.

Pour cette étude, nous avons établi des cartes protéiques des fractions sarcoplasmiques et myofibrillaires de viandes (groupes A et B) dont la composition était potentiellement différente de par le système de production en élevage. Nous avons ensuite comparé les paramètres de digestion *in vitro* de ces viandes crues et une fois chauffées (70, 100 et 140°C). En parallèle nous avons effectué les caractérisations physicochimiques des protéines (dénaturation, oxydation, agrégation). Cette étude prospective a également pour objectif de mettre en évidence d'éventuels marqueurs protéiques des paramètres de digestion qui pourraient être utilisés en sélection animale s'ils s'avéraient pertinents.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Muscle composition slightly affects *in vitro* digestion of aged and cooked meat: Identification of associated proteomic markers

M.-L. Bax^{a,b,c}, T. Sayd^a, L. Aubry^a, C. Ferreira^a, D. Viala^d, C. Chambon^d, D. Rémond^{b,c}, V. Santé-Lhoutellier^{a,*}

^a INRA, UR 370 QuaPA, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^c INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^d INRA, Plate-forme d'Exploration du Métabolisme, Composante Protéomique, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2012

Received in revised form 4 September 2012

Accepted 11 September 2012

Available online 20 September 2012

Keywords:

Meat protein

in vitro digestion

Processing

Two-dimensional gel electrophoresis

Mass spectrometry

Markers

ABSTRACT

Meat is an appropriate source of proteins and minerals for human nutrition. Technological treatments modify the physical–chemical properties of proteins, making them liable to decrease the nutritional potential of meat. To counteract this damage, antioxidants and chaperone proteins in muscle cells can prevent oxidation, restore the function of denatured proteins, and thus prevent aggregation. This study aimed to explore the impact of indoor vs outdoor-reared meat protein composition on digestion and to associate protein markers to *in vitro* digestion parameters. Indoor-reared meat tended to show less oxidation and denaturation than outdoor-reared meat and was characterised by an overexpression of contractile and chaperone proteins. Outdoor-reared meat showed amplification of antioxidant and detoxification metabolism defending against oxidised compounds. Impacts on digestion remained minor. Several protein markers of *in vitro* digestion parameters were found for aged and cooked meat, linked to the detoxification process and to muscle contraction.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In Europe and most developed countries, animal proteins are part of the daily diet, combined with vegetable proteins, carbohydrates, lipids and fibres. Consumers have become more health-conscious, driving a trend towards lower-fat and lower-cholesterol products. However, meat is a major source of iron, zinc and vitamin B₁₂ and a good source of proteins, particularly those containing amino acids essential to human health. Their high content of well-balanced essential amino acids makes proteins from meat and meat products a critical component of a proper human diet. The nutritional quality of meat has become an increasingly important issue for nutritionists, epidemiologists, meat technologists and animal producers (Biesalski, 2005; Higgs, 2000; Norat, Lukanova, Ferrari, & Riboli, 2002). However, it was recently demonstrated that technological treatments, especially cooking, can alter the *in vitro* meat protein digestion rate (Bax et al., 2012). It has been shown that technological treatments tending to enhance protein denaturation also increased the rate of protein degradation by proteases from the digestive tract, while protein oxidation and further aggregation reduced the rate of protein digestion.

Muscle proteins contain endogenous compounds that could at least partly offset the processing-induced physical–chemical modifications of proteins (Chan & Decker, 1994). Muscle proteins include antioxidant proteins such as catalase and superoxide dismutase along with the family of heat shock proteins (HSPs), or molecular chaperones, that provide the cell with tools for restoring proteins after a variety of physiological stresses such as elevated temperatures, oxidative damage or osmotic imbalance. The amount of antioxidant compounds is influenced by rearing system (Santé-Lhoutellier, Engel, Aubry & Gatellier, 2008; Young et al., 2003) as well as by fibre type conversion and its associated energy metabolism enzyme (Shibata et al., 2009). Descalzo and Sancho (2008) showed that beef cattle reared outdoors (pasture-fed) had higher SOD activity than beef animals reared indoors (grain-fed). The main role of the chaperones is to suppress protein unfolding and restore protein structure and function. Several HSPs are expressed in skeletal and cardiac muscle and their mutations can lead to diseases such as myopathy (Bova et al., 1999; Kaminska et al., 2004). They are known to bind to nascent unfolded polypeptides and ensure correct folding and transport. In skeletal muscle, HSPs help stabilize and regulate myofibrillar proteins after thermal denaturation (actin: Pivovarova et al., 2005) or muscle atrophy (tubulin: Sakurai, Fujita, Ohto, Oguro, & Atomi, 2005). This source of cellular protection could potentially offset processing-related protein denaturation and aggregation. It was shown *in vitro* that

* Corresponding author. Tel.: +33 473 62 47 08.

E-mail address: veronique.sante@clermont.inra.fr (V. Santé-Lhoutellier).

the presence of α B-crystallin led to a 60% lower decrease in chicken myosin ATPase activity after 30-min incubation at 43 °C, while less myosin aggregation occurred (Melkani, Cammarato, & Bernstein, 2006). It appears that α B-crystallin, which contains hydrophobic surfaces that interact with thermally unfolded myosin intermediates under thermal stress conditions, is able to prevent myosin aggregation through transient interactions. These interactions help to protect the enzymatic properties of myosin, keep it folded and prevent molecular aggregation *in vitro* (Melkani et al., 2006). Recently, Markov, Pivovarova, Chernik, Gusev, and Levitsky (2008) showed that HSP 27 effectively prevents the thermally-induced aggregation of isolated myosin head. The authors suggested that phosphorylation leading to dissociation of large HSP 27 oligomers might increase its chaperone activity with certain protein substrates. Likewise, Sayd et al. (2006) used proteomics to demonstrate reduced protein denaturation in chaperone protein-rich muscles. Here, we aimed to explore the impact of indoor vs outdoor-reared meat protein composition on digestion and to associate protein markers to *in vitro* digestion parameters.

2. Materials and methods

2.1. Animals and ageing

The experiment was carried out on 30 male commercial Basque pigs (6 months old) reared in a conventional indoor system (on slatted floor; group A) and in an extensive outdoor production system (group B). The pigs were slaughtered at about 100 kg live weight in a commercial slaughterhouse. After 24 h, the *Longissimus dorsi* muscle was removed from each carcass ($n = 6$ per group). One part of the muscle was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C (Day 1 samples), whereas the other part was kept for 3 days at 4 °C under air-permeable film before being frozen as described above (Day 4 samples).

2.2. Sample preparation and heating procedure

The heating procedure was performed solely on Day 4 samples. Three temperatures were applied: 70 °C, 100 °C and 140 °C. These temperatures were chosen to represent cooked ham, boiled meat and grilled meat. Thawed meat samples (3 g/tube) were placed in polypropylene test tubes (inner diameter = 10 mm, thickness = 1 mm) and heated for 30 min in a digital temperature-controlled dry bath (BT3-heater, Prolabo). The heat treatment was then immediately stopped by placing the samples on ice and freezing them at -80 °C.

2.3. Proteomic analyses

2.3.1. Myofibrillar and sarcoplasmic protein extraction and electrophoresis

The method was adapted from Sayd et al. (2006). Using an MM2 glass bead agitator (Retsch, Haan, Germany), 0.3 g of *Longissimus dorsi* was homogenised in 40 mM Tris HCl (pH 8) at 4 °C at a 1:4 (w/v) ratio for 45 min. The homogenate was centrifuged at 10 °C for 30 min at 10,000g in low-ionic-strength buffer. The supernatant, containing soluble sarcoplasmic proteins, was then collected and stored at -80 °C. The pellet was washed five times. After the final centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was homogenised in 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (w/v) and 1% DTT (dithiothreitol) (w/v) at 4 °C in the same 1:4 (w/v) ratio as was used in the first step. The homogenate was centrifuged at 10 °C for 15 min at 10,000g. The supernatant, forming the myofibrillar protein fraction at high-ionic-strength, was stored at -80 °C. Protein concentration was determined by RC-DC assay (Bio-Rad,

Hercule, CA, USA) for myofibrillar proteins and by Bradford assay (Bio-Rad, Hercule, CA, USA) for sarcoplasmic proteins. The electrophoresis method for both proteins is described below.

First, 1 mg of myofibrillar proteins was incorporated in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS (w/v), 0.4% carrier ampholytes (v/v), 1% DTT (w/v), and bromophenol blue. Samples were loaded onto immobilised pH gradient strips (pH 3–10 NL, 17 cm, Bio-Rad, Hercule, CA, USA), and isoelectric focusing was performed using a Protean IEF cell system (Bio-Rad, Hercule, CA, USA). Gels were rehydrated passively for 16 h. Rapid voltage ramping was then applied to reach a total of 86 kVh. After IPG strip equilibration, proteins were resolved on 11% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels using a Protean II XL system (Bio-Rad, Hercule, CA, USA) for the second dimension. Gels were stained with Coomassie Blue (colloidal blue). Two gels were produced per sample, giving 48 gels in all.

For sarcoplasmic proteins, 0.9 mg was loaded onto immobilised pH gradient strips (pH 5–8, 17 cm, Bio-Rad, Hercule, CA, USA) following the same procedure as for insoluble proteins. For the second dimension, proteins were resolved on 12% SDS-PAGE. Two gels were produced per sample, giving 48 gels in all.

2.3.2. Image analysis and statistical treatment of data

Gels were visualised and analysed using Progenesis SameSpots 2-D electrophoresis (2DE) image analysis software (Nonlinear Dynamics, New-castle, UK). Aligned spots were normalised by expressing the relative quantity of each spot as the ratio of individual spot quantity to the total quantity of valid spots. For one sample and one spot, the mean of double values (corresponding to gels in duplicate) was calculated. The resulting set of average spot quantities and the physical-chemical data was tested by one-way ANOVA using the SAS software package, with group as fixed factor. Statistically significant difference was set at $p < 0.05$ in the ANOVA.

2.3.3. Protein identification by mass spectrometry

Coomassie-stained spots-of-interest were manually excised using pipette tips. These spots were then destained with 100 μ L of 25 mM NH_4HCO_3 with acetonitrile 95/5 (v/v) for 30 min, followed by two washes in 100 μ L of 25 mM NH_4HCO_3 with acetonitrile 50/50 (v/v) and then dehydrated in 100% acetonitrile. Gel spots were completely dried using a Speed Vac before trypsin digestion at 37 °C over 5 h with 15 μ L of trypsin (10 ng/ μ L; V5111, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) in 25 mM NH_4HCO_3 . Peptide extraction was optimised by adding 8 μ L of acetonitrile and then running a 10-min sonication.

For matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis, 1 μ L of supernatant was loaded directly onto the MALDI target. The matrix solution (5 mg/mL of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid) was added immediately and allowed to dry at room temperature.

The peptide mass fingerprint (PMF) of trypsin-digested spots was determined in positive-ion reflector mode using a Voyager DE Pro MALDI-TOF-MS system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). External calibration was performed with a standard peptide solution (Peptide Mix 4, Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Peptide mass fingerprints were compared to NCBI nr Sus scrofa (15012010, 22446 seq) protein sequence databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database>) using the MASCOT 2.2 search engine (<http://www.matrixscience.com>). The initial search parameters allowed a single missed trypsin cleavage site, partial carbamidomethylation of cysteine, partial oxidation of methionine and mass deviation lower than or equal to 25 ppm. The validations are based on the significant score given by the Mascot software, which takes into account number of matched peptides

per protein (at least five peptides) and decoy score. When identification by MALDI-TOF proved unsuccessful, identification was also attempted using nano LC-ion trap MS/MS analysis.

For LC-MS/MS analysis of peptide mixtures, on-line nanoflow liquid chromatography was performed on an Ultimate 3000RSLC system (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) with 15 cm nanocapillary columns of 75 μm internal diameter (Acclaim Pep Map RSLC, Dionex). The solvent gradient from 4% to 50% acetonitrile in 0.5% formic acid was run at a flow rate of 300 $\text{nL}/\text{min}^{-1}$ for 30 min. The eluate was electrosprayed into an LTQ Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) through a nanoelectrospray ion source. The LTQ Velos system was run in a CID top 10 mode (i.e. one full-scan MS from which 10 major peaks are selected for MS/MS). Thermo Proteome Discoverer v1.2 was used for raw data processing. For protein identification, the NCBI nr Sus scrofa protein database (01072010, 23114 seq) was combined with human keratin contaminant sequences. Searches were run with the following parameters: peptides mass tolerance was set to 1.5 Da, fragment mass tolerance was set to 0.8 Da, and a maximum of two missed cleavages was allowed. Protein identification was validated when at least two peptides originating from one protein showed significant Mascot scores ($p < 0.05$). When proteins were identified from only two peptides, the spectra were verified to assess their validity. When several proteins were identified in a spot, the protein with the better score empAI was kept according to the procedure provided by Ishihama et al. (2005).

2.4. Antioxidant status and glycolytic potential of raw meat

2.4.1. Antioxidant enzyme activities

After thawing, muscle samples (1 g) were homogenised with 10 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) in an Ultra-Turrax homogenizer (IKA, T25 Digital, Staufen, Germany), centrifuged at 4000g for 15 min at 4 °C and the supernatant was collected. Supernatant protein concentration was determined according to the Biuret method. Total superoxide dismutase (SOD) activity (Cu-Zn SOD and Mn SOD) was measured in duplicate, according to the method of Marklund and Marklund (1974), using inhibition of pyrogallol autoxidation in a basic medium. One unit (U) was taken as the activity that inhibits pyrogallol autoxidation by 50%. Catalase activity was measured in duplicate by the rate of disappearance of H_2O_2 at 240 nm according to the method of Aebi (1974), and expressed as nmol of decomposed $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}^{-1}$ (mg protein^{-1}).

2.4.2. Muscle glycogen, lactate and glycolytic potential

Glycogen, glucose, glucose-6-phosphate and lactate from muscle homogenate were measured in duplicate by enzymatic procedures according to Dalrymple and Hamm (1973) and Bergmeyer (1974), with slight modifications. Muscle tissue (1 g) was homogenised with 10 mL of 0.5 M perchloric acid. Aliquots of homogenate (0.5 mL) were taken for enzymatic determination of glycogen, glucose and glucose-6-phosphate following glycogen hydrolysis with amyloglucosidase. Lactic acid was determined in the supernatant resulting from homogenate centrifuged at 4000g for 20 min at 4 °C, and expressed in micromoles per gram of fresh tissue. Glycolytic potential (GP, i.e., the amount of compounds transformable into lactic acid) was calculated at Day 1 and Day 4 using the following formula (Monin & Sellier, 1985):

$$\text{GP} = 2x([\text{glycogen}] + [\text{glucose 6-phosphate}] + [\text{glucose}]) + [\text{lactic acid}]$$

GP was expressed as micromoles of equivalent lactate per gram of fresh tissue.

2.5. Biochemical parameters

All biochemical parameters were assessed in duplicate on either fresh or cooked samples.

2.5.1. Determination of carbonyl content

Protein carbonyl groups were evaluated according to the method of Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein, and Stadtman (1987), with slight modifications. One gram of muscle sample was homogenised in 10 mL KCl 0.15 M + BHT 0.1 mM in an Ultra-Turrax system (1 min). Carbonyl groups were detected by reactivity with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) leading to formation of protein hydrazones. Carbonyl content was expressed as nanomoles of DNPH fixed per mg of protein.

2.5.2. The surface hydrophobicity of proteins

Hydrophobicity of myofibrillar proteins was determined using the hydrophobic chromophore bromophenol blue (BPB) as described in Chelh, Gatellier, and Santé-Lhoutellier (2006), with slight modifications. This method is based on fixing BPB with insoluble myofibrillar proteins and quantifying bound BPB. Myofibrillar proteins were suspended at a concentration of 3 mg/mL in 20 mM phosphate buffer at pH 6. One mL of myofibril suspension was added to 300 μL of 1 mg/mL BPB (in distilled water) and mixed well. A myofibril-free control sample was performed by adding 300 μL of 1 mg/mL BPB to 1 mL of 20 mM phosphate buffer at pH 6. Samples and control samples were shaken continually at room temperature for 10 min and then centrifuged at 4000g for 15 min at 4 °C. Supernatant absorbance corresponding to free BPB was measured at 595 nm against a phosphate buffer control. The amount of bound BPB (μg) was calculated as the difference between total and free BPB and used as an index of hydrophobicity. Each determination was performed in duplicate. Bound BPB (μg) = $300 \mu\text{g} * (\text{OD control} - \text{OD sample})/\text{OD control}$.

2.5.3. Lipid oxidation

Lipid oxidation was measured using the thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) method according to Lynch and Frei (1993), with slight modifications. Muscle samples (1 g) were homogenised with 10 mL KCl 0.15 M + butyl hydroxytoluene (BHT) 0.1 mM in an Ultra-Turrax system. Homogenates (0.5 mL) were incubated with 1% (w/v) 2-thiobarbituric acid in 50 mM NaOH (0.25 mL) and 2.8% (w/v) trichloroacetic acid (0.25 mL) for 10 min in a boiling water bath. After cooling at room temperature for 30 min, the pink chromogen was extracted with n-butanol (2 mL) and its absorbance was measured at 535 nm against an n-butanol blank. Concentrations of TBA-RS were calculated using 1,1,3,3-tetraethoxypropane (0–0.8 μM) as standard and expressed as mg of MDA per kg of meat (TBA units).

2.6. Measurements of protein aggregation

Half a gram of meat was homogenised in an Ultra-Turrax system in 5 mL of a 0.15 M ice-cooled KCl solution containing 0.1 mM of butyl hydroxyl toluene (BHT). Homogenisation was performed for a short burst (20 s) at the low speed (1100 rpm) to minimize protein denaturation. The protein concentration of the meat extract was then estimated using the Biuret method and adjusted to 3 mg/mL with the KCl + BHT solution. This whole meat extract was then delipidated by adding 2 volumes of butanol/di-isopropyl ether (40:60 v/v) to 1 volume of meat extract. The mixture was stirred for 30 min at 4 °C, then centrifuged at 4000 g for 15 min at 4 °C to separate the aqueous and organic phases. The organic phase was removed by careful suction with a micropipette.

Granulometry measurements were performed with 6 mg of proteins in 1.5 mL of delipidated meat extract using a Sysmex

FPIA-3000 flow particle image analyzer (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) in Low Power Field mode. The number of particles was measured and particle size and form were evaluated by equivalent circle diameter (EC Diameter), circularity, and Feret aspect ratio.

2.7. In vitro digestibility

2.7.1. In vitro digestion by pepsin

Myofibrillar proteins were suspended in 33 mM glycine buffer pH 1.8 and final concentration was adjusted to 0.75 mg/mL. Proteins were hydrolyzed by gastric pepsin (Porcine gastric mucosa, Sigma) at a concentration of 10 U/mg of myofibrillar proteins for 90 min at 37 °C. Digestion was terminated by addition of 15% (final concentration) trichloroacetic acid at various times (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 and 90 min). Samples were put on ice for 1 h. After centrifugation at 4000 g for 15 min at 4 °C, hydrolyzed peptide content in the supernatant was measured at 280 nm.

2.7.2. In vitro digestion by trypsin and α -chymotrypsin

Protein hydrolysis by trypsin/ α -chymotrypsin was preceded by a 60-min pepsin digestion step as above. Pepsin activity was stopped by adding fresh glycine buffer (33 mM, pH 10.3) and samples were placed on ice for 30 min. Final pH was about 8. Trypsin (6.55 U/mg of protein) and α -chymotrypsin (0.33 U/mg of protein) were then added to 5 mL of the pepsin digestion solution. Digestion was terminated by adding 15% (final concentration) trichloroacetic acid at various times (0, 5, 12, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 180 and 240 min). Samples were placed on ice for 1 h. After centrifugation at 4000 g for 15 min at 4 °C, hydrolyzed peptide content in the supernatant was measured at 280 nm.

2.7.3. Determination of in vitro parameters of digestion kinetics

The following mathematical model was used to fit the measurements for either pepsin or trypsin/ α -chymotrypsin digestions (Bax et al., 2012):

$$OD = OD_{\max} \cdot \exp\left(-\frac{B}{\text{Time}}\right) \quad (1)$$

where $B = (\text{half-life time}) \ln(2)$

For each digestion trial, the pair of primary parameters (OD_{\max} , half-life time) was estimated by minimizing the sum of squares of the differences between calculated OD values and the measurement. OD_{\max} represents degradation potential, i.e., the OD value that would be obtained after an infinite time of digestion. Half-life time is the time needed to produce half the amount of hydrolyzed peptides in comparison to OD_{\max} .

To analyse more completely the dynamics of the digestion process, the instantaneous rate of digestion was calculated from the derivative of Eq. (1):

$$\frac{d(OD)}{d(\text{Time})} = 60 \cdot OD_{\max} \cdot B \cdot \frac{1}{(\text{Time})^2} \cdot \exp\left(-\frac{B}{\text{Time}}\right) \quad (2)$$

where $B = (\text{half-life time}) \ln(2)$

This curve was characterised by determining three parameters: maximal rate of digestion, time required to reach the maximal rate of digestion and initial slope ($\Delta OD/h$).

Digestion by trypsin/ α -chymotrypsin was assessed using another parameter, i.e. initial OD, which was measured when starting trypsin/ α -chymotrypsin digestion (time 0) and which represents the level of hydrolyzed proteins obtained after 1 h of digestion by pepsin.

2.8. Statistical methods

ANOVA was performed using the general linear model procedure of the SAS software package (version 8.1, STAT, SAS Institute, Cary, NC, USA). Two linear models were performed; one for ageing and one for temperature. When significant effects were found for ageing, mincing or temperature, least squares means were compared using LSMEANS with the PDIF option followed by TUKEY adjustment. In addition, a principal component analysis was performed with the full dataset, using STATISTICA software (version 7.1, Stat Soft, Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

3.1. Proteomic analysis

Analysis of the 2DE gels showed 60 spots differentially abundant in the two groups for the myofibrillar proteins and 42 spots also differentially abundant for the sarcoplasmic protein fraction. Among the 60 spots from myofibrillar proteins, 45 spots were identified. Among these 45, five spots contained proteins in equimolar quantity according the empAI score and then were eliminated. Among the 42 spots from sarcoplasmic proteins, 37 proteins were identified. Fig. 1 shows a representative gel of myofibrillar and sarcoplasmic proteins with the position of the 77 spots (40 + 37). The underlined spot number corresponds to a higher abundance of the protein in group A (indoor). Table 1 summarizes the myofibrillar proteins identified and Table 2 summarizes the sarcoplasmic proteins identified.

In the myofibrillar fraction, 22.5% of identified proteins correspond to actin and myosin and 40% are involved in muscle contractile activity (troponin, tropomyosin, etc.). Surprisingly, 32.5% were soluble proteins (including glycolytic enzymes or lactate dehydrogenase), of which 5% were chaperone proteins such as HSP and α -crystallin.

In the sarcoplasmic fraction, a majority (67%) of the 37 identified proteins were muscle metabolism proteins. The remaining third included myoglobin, chaperone proteins and miscellaneous proteins such as albumin, four-and-a-half LIM domain protein and myosin light chain.

Both protein fractions showed changes in protein solubility, which could be explained by the fact that samples were collected in *postmortem rigour* (Bowker, Fahrenholz, Paroczay, & Solomon, 2008).

The groups differed in both myofibrillar and sarcoplasmic protein expression (Tables 1 and 2).

3.1.1. Myofibrillar proteins

Regarding the myofibrillar fraction, muscles from group A (indoor) contained higher amounts of several contractile and structural proteins such actin (834, 938, 1540, 1547 and 1609), myosin light chain (1837, 1962) and tubulin- α (1264) than group B (outdoor). The regulatory proteins, such as fast and slow troponin T, were equally distributed in both groups (1579, 1593, 2054 for group A and 837, 910, 1535, 1625, 2134 for group B), while fast troponin I (2159) and tropomyosin (2114) were overexpressed in group A. Shibata et al. (2009) considered troponin T and I as protein markers of the rearing system for cattle production. They showed that slow troponin T (TnT) was overexpressed in grass-fed animals after 18 months of the experiment. Here, we also found higher slow TnT expression, suggesting that the rearing system enhanced muscle fibre conversion to slow-twitch from fast-twitch, possibly with a change in energy metabolic enzymes. Comparison against the myofibrillar proteins revealed a substantial number of sarcoplasmic proteins that had co-eluted. In other words, these

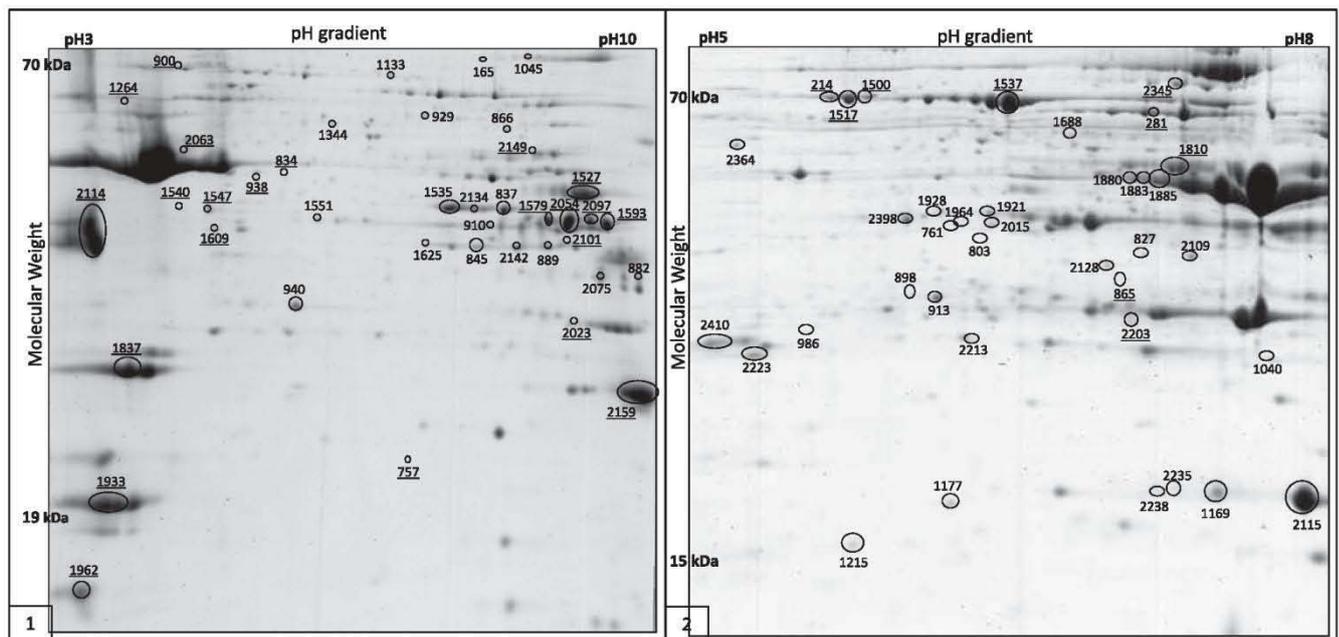


Fig. 1. Two-dimensional electrophoresis gels of myofibrillar proteins (1) and sarcoplasmic proteins (2) from pig *Longissimus dorsi* muscle. Circles indicate the identified proteins that were differentially expressed between groups A and B. Underlined numbers correspond to overexpression in group A.

proteins changed their solubility properties, mainly in group A. Four enzymes involved in glycolysis were overexpressed in group A, including fructose-bisphosphate aldolase A (1527), phosphoglycerate mutase (2023), β -enolase (2149) and lactate dehydrogenase A (2101), while phosphofructokinase, a key enzyme in the regulation of glycolysis, and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (1551) were overexpressed in group B, along with enzymes of carbohydrate metabolism (UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase: 866). Group A also showed an overexpression of chaperone proteins (HSP 70: 900) and α -crystallin (757) involved in maintaining protein secondary and tertiary structure to guarantee their biological functions.

Group B showed overexpression of proteins involved in the structural properties of muscle cells and in motion regulation, i.e. calsarcin2 (889), calcineurin-interacting protein 2 (845, 2142) and PDZ-LIM protein cypher 3s isoform 1 (882, 1045).

3.1.2. Sarcoplasmic proteins

This subfraction of the muscle proteome is widely studied since it concerns the proteins involved in muscle signaling, transcription and regulation pathways. Muscles from group A were characterised by an overexpression of chaperone proteins (HSP 71: 214, 1500, 1517), as was the case with myofibrillar proteins, and higher levels of the glycolytic enzymes phosphoglucosmutase (281), glycogen phosphorylase (865), and serotransferrin (2345), which is involved in iron transport through blood circulation. Interestingly, cell detoxification enzymes (S-formylglutathione hydrolase: 827, 2109; peroxiredoxin: 913; lactoylglutathione lyase: 2223; glutathione S-transferase: 898; SOD: 1040) and stress enzymes (protein DJ-1: 2213; catechol O-methyltransferase: 986; nitrilase1: 2128) were overexpressed in group B. The expression of these proteins could have been enhanced by the outdoor conditions of animal production and activated to prevent oxidative stress in the muscle. Besides the detoxification enzymes, many of the other proteins overexpressed in group B are related to oxidative metabolism, such as the four spots of malate dehydrogenase and myoglobin. Malate dehydrogenase is involved in the TCA cycle. It converts malate to oxaloacetate, producing an equivalent amount of NADH. Myoglo-

bin ensures oxygen transport in the muscle cell for mitochondria. To summarize, the sarcoplasmic fraction differed between group A and B in terms of oxidation potential (group B) and protein denaturation repair (group A).

3.2. Meat characteristics during ageing and cooking

3.2.1. During ageing (Day 1 and Day 4)

SOD activity differed between groups at Day 1, where it showed lower activity in group A than in group B (0.90 ± 0.03 vs 1.26 ± 0.03 U, respectively), but was similar between groups after 4 days (1.23 ± 0.13 vs 1.29 ± 0.12 U, respectively). Catalase activity was lower in group A than in group B (1622 ± 148 vs 2540 ± 225 on Day 1 and 1750 ± 92 vs 2519 ± 108 nmol H_2O_2 /min/mg of proteins on Day 4, respectively). SOD and catalase activities reflected muscle antioxidant status before the technological treatments. Both enzymes help regulate oxidative stress by eliminating toxic superoxide ions, firstly by forming hydrogen peroxide and secondly by forming water and O_2 . SOD scavenges superoxide anion via $\text{O}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. Catalase removes hydrogen peroxide via $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Generally speaking, oxidative muscles have a higher content of antioxidant enzymes than do glycolytic muscles (Renner, Dumont, & Gatellier, 1996). Here, we found that composition was impacted by rearing conditions, as seen with the proteomic analysis. Similarly, Descalzo and Sancho (2008) showed that beef from pasture-fed cattle had higher SOD activity than beef from grain-fed animals. To summarize, group B meat showed higher antioxidant capacity than group A meat.

In this study, glucose and glucose-6-phosphate contents were negligible and are not presented here. Glycolytic potential, residual glycogen and muscle lactate did not differ between groups at any of the *postmortem* timepoints. However, group B tended to show higher amounts of lactate and higher glycolytic potential (data not shown). Glycolytic potential, which is an estimate of the amount of glycogen present in the muscle at time of slaughter, can be a good predictor of *postmortem* muscle acidification. This increase in glycogen directly results in greater production of lactate in the muscle, lower ultimate pH and poorer water-holding

Table 1
Identification of differentially overexpressed proteins in the myofibrillar fraction in pig *Longissimus dorsi* from groups A and B.

Spot ID	Protein name ^a	Accession no. ^a	Mowse score ^b	Sequence coverage ^c (%)	Match peptide ^d	M _w (kDa)/pI theoretical ^e	M _w (kDa)/pI observed ^e	Group A ^f	Group B ^f	p value ^g
834	Cardiac muscle alpha actin 1	gi 281427360	65	19	6	42.0/5.2	42/5.3	5.398	5.256	0.0003
938	Cardiac muscle alpha actin 1	gi 281427360	64	22	7	42.0/5.2	42/5.2	5.396	5.203	0.0031
1540	Cardiac muscle alpha actin 1	gi 281427360	58	12	5	42.0/5.2	40/5.0	5.572	5.324	0.0001
1547	Actin, alpha skeletal muscle	gi 62287931	61	23	7	42.0/5.2	40/5.1	5.964	5.866	0.0018
1609	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	gi 38322751	385	56	13	33.0/5.6	35/5.1	5.592	5.511	0.0194
933	HUMMLC2B	gi 117660856	149	79	16	19.0/4.8	19/4.7	7.537	7.423	0.0015
940	Similar to myosin light chain 1 slow-twitch muscle A isoform	gi 194037529	70	38	10	24.0/5.5	28/5.3	5.810	6.158	0.0016
1837	MLC1f	gi 117660874	74	52	9	20.9/4.9	22/4.8	7.469	7.366	0.0043
1962	MLC1f	gi 117660874	438	66	13	20.9/4.9	18/4.7	7.041	6.918	0.0068
2114	Tropomyosin(s), alpha and beta	gi 1927/ gi 83778524/ gi 3661527	–	–	–	–	35/4.7	7.840	7.752	0.0119
837	Troponin T fast skeletal muscle type	gi 46389779	69	35	12	29.8/7.7	35/7.7	6.304	6.511	0.0016
1535	Troponin T fast skeletal muscle type	gi 46389773	578	35	15	32.1/6.0	35/6.6	6.323	6.537	0.0346
1579	Troponin T fast skeletal muscle type	gi 46389777	64	30	11	30.7/8.7	38/7.7	6.547	6.461	0.0077
1593	Troponin T fast skeletal muscle type	gi 46389779	68	35	11	29.8/7.7	38/8.5	6.804	6.700	0.0033
2054	Troponin T fast skeletal muscle type	gi 46389777	77	35	11	30.7/8.7	38/7.7	7.081	7.005	0.0055
2134	Troponin T fast skeletal muscle type	gi 46389773	290	28	8	32.1/6.0	39/6.9	5.864	6.198	0.0046
910	Troponin T slow type isoform sTnT1	gi 34393190	48	4	2	31.2/5.9	31/7.0	5.627	5.790	0.0099
1625	Troponin T slow type isoform sTnT2	gi 34393192	59	37	9	30.0/6.4	30/6.4	5.392	5.588	0.0052
2159	Troponin I fast-twitch skeletal isoform	gi 189016334	327	31	11	21.3/9.0	21/9.0	7.613	7.562	0.0274
929	SET and MYND domain-containing 1	gi 197692962	269	19	9	56.6/6.9	56/4.9	5.515	5.609	0.0391
882	Similar to PDZ-LIM protein cypher3s isoform 1	gi 194042260	191	11	5	65.7/8.3	29/9.0	5.625	5.779	0.0186
1045	Similar to PDZ-LIM protein cypher3s isoform 1	gi 194042260	77	9	4	65.7/8.3	85/7.7	4.904	5.115	0.0125
1264	Tubulin, alpha 4a	gi 194043859	60	19	6	49.9/5.0	56/4.9	5.963	5.806	0.0092
845	Calcineurin-interacting protein-2	gi 67634031	424	29	7	31.6/7.9	32/7.3	5.979	6.172	0.0069
2142	Calcineurin-interacting protein-2	gi 67634031	113	38	7	31.6/7.9	34/7.7	5.924	6.105	0.0076
889	Calsarcin2	gi 75038631	64	36	7	31.6/7.9	32/7.8	5.942	6.024	0.0231
866	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	gi 6136110	60	15	6	56.9/7.7	55/7.7	5.226	5.384	0.0140
1344	Sarcolumenin precursor	gi 4633812	323	52	10	18.0/8.9	56/5.5	5.477	5.593	0.0164
165	Muscle phosphofructokinase	gi 86371672	85	3	2	85.3/8.5	85/7.0	5.082	5.208	0.0464
1527	Fructose-bisphosphate aldolase A	gi 38230151	226	50	6	12.0/5.5	40/8.0	7.244	7.196	0.0004
2097	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gi 65987	85	39	10	35.7/6.9	38/8.2	6.717	6.606	<.0001
1551	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	gi 2149959	105	26	3	19.9/5.0	39/5.4	5.183	5.413	0.0069
2023	Phosphoglycerate mutase 2	gi 157093850	421	47	11	28.7/8.9	28/8.0	5.910	5.738	0.0410
2101	Lactate dehydrogenase-A	gi 473571	266	30	9	36.6/8.2	35/8.2	5.747	5.635	0.0090
2149	Beta-enolase 3	gi 85720739	369	26	9	47.1/8.1	47/7.7	5.757	5.683	0.0432
1133	ChainA, crystal structure of mitochondrial respiratory complex I bound with 3-nitropropionate and 2-thenoyltrifluoroacetone.	gi 73535960	90	23	10	68.2/6.3	70/6.3	5.315	5.381	0.0240
757	Alpha-crystallin B chain	gi 75063982	63	42	6	20.1/6.8	20/6.5	5.655	5.397	0.0151
900	Heat shock 70kDa protein 1-like	gi 178056512	108	4	2	70.3/6.0	70/5.0	5.700	5.585	0.0024
2063	Eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 2	gi 154147698	60	24	6	46.4/5.3	47/5.0	5.871	5.502	0.0006
2075	Voltage-dependent anion channel 1	gi 8745552	104	37	7	30.7/8.6	29/8.3	5.505	5.598	0.0369

^a Protein name and accession no. were derived from the NCBI database.

^b The MASCOT baseline significant score with $p < 0.05$.

^c % of coverage of the entire amino acid sequence.

^d Number of matched peptides in the database search.

^e M_w and pI, theoretical (recorded in the NCBI database) and observed (estimated from the on-gel spot position).

^f Average of relative log₁₀ (intensity spots) in each group.

^g p value from ANOVA analysis (effect of group). **Protein identification in bold** was performed by MALDI-TOF-MS, while for normal typing, protein identification was performed by MS/MS using LCQ ion-trap MS.

capacity in fresh pork (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). Filgueras et al. (2010) and Traore et al. (2012) have demonstrated the role of glycogen in the oxidative process. Group B showed some similarities, with glycolytic and oxidative potentials both being slightly higher than in group A.

Table 3 presents the time-course evolution of biochemical parameters (oxidation and protein denaturation). Protein oxida-

tion measured by carbonyl content did not differ between groups at Day 1 and Day 4 but increased between Day 1 and Day 4 (34% for group A and 53% for group B). The surface hydrophobicity of myofibrillar proteins did not differ between groups or ageing times. Finally, TBA-RS content was similar in both groups at Day 1 but showed a dramatic increase after ageing only in group B. Lipid oxidation is known to promote protein oxidation. However,

Table 2Identification of differentially overexpressed proteins in the sarcoplasmic fraction in pig *Longissimus dorsi* from groups A and B.

Spot ID	Protein name ^a	Accession no. ^a	Mowse score ^b	Sequence coverage ^c	Match peptide ^d	M _w (kDa)/pI theoretical ^e	M _w (kDa)/pI observed ^e	Group A ^f	Group B ^f	p value ^g
214	Heat shock cognate 71 kDa protein-like, partial	gi311264120	364	24%	9	50.4/5.3	71/5.5	6.431	6.344	0.0446
1500	Heat shock cognate 71 kDa protein-like, partial	gi311264120	316	16%	7–8	50.4/5.3	71/5.5	5.992	5.886	0.0178
1517	Heat shock cognate 71 kDa protein-like, partial	gi311264121	315	22%	9	50.4/5.3	71/5.5	6.780	6.734	0.0114
2213	Protein DJ-1	gi118403904	174	24%	4	19.9/6.8	20/6.1	5.825	5.868	0.0187
281	Phosphoglucosyltransferase-1 isoform 1	gi311259217	449	21%	10	64.8/8.0	65/7.0	6.181	6.064	0.0332
803	L-gulonate 3-dehydrogenase	gi283993079	152	11%	3	35.0/6.2	35/6.2	5.239	5.308	0.0101
865	Glycogen phosphorylase (Fragment)	gi106073338	77	13%	10	84.0/6.1	32/6.8	5.536	5.409	0.0040
1215	Fatty acid binding protein 3	gi50262041	283	58%	5	13.2/7.3	13/5.5	6.227	6.450	0.0014
2109	S-formylglutathione hydrolase	gi62900112	340	30%	5	31.5/7.0	31/7.1	6.187	6.278	0.0028
827	S-formylglutathione hydrolase	sp Q9GJT2 ESTD_PIG	99	51%	12	31.5/6.5	34/6.8	5.920	5.985	0.0408
2223	Lactoylglutathione lyase isoform 1	gi194040450	113	24%	3	20.7/5.4	20/5.3	6.484	6.549	0.0479
2345	Serotransferrin	gi1361192	647	26%	15	76.9/7.1	76/7.1	6.270	6.171	0.0038
2364	Mitochondrial ATP synthase, H ⁺ transporting F1 complex, β-subunit	gi89574051	425	25%	8	47.1/5.1	47/5.1	6.124	6.364	0.0005
761	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	sp P11708 MDHC_PIG	88	25%	9	36.4/6.2	37/5.9	5.233	5.374	0.0029
1921	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	gi 47523114	64	24%	7	36.4/6.2	37/6.1	6.101	6.188	0.0386
1964	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	sp P11708 MDHC_PIG	65	25%	7	36.4/6.2	36/6.0	5.264	5.338	0.0336
2015	Malate dehydrogenase	gi 164543	88	34%	9	31.7/6.2	36/6.1	5.654	5.789	0.0142
2398	L-lactate dehydrogenase B chain	gi164518958	592	27%	23	36.6/5.9	36/5.8	6.510	6.614	0.0103
898	Glutathione S-transferase Mu 2	Q000H9_PIG	–	–	–	25.8/6.5	25/5.8	5.429	5.612	0.0157
913	Peroxiredoxin-6	sp Q9TSX9 PRDX6_PIG	218	78%	19	25.0/5.7	25/5.9	6.406	6.489	0.0099
986	Catechol O-methyltransferase	sp Q99028 COMT_PIG	69	46%	5	20.6/6.1	24/5.2	5.514	5.663	0.0002
1040	Superoxide dismutase mitochondrial	sp P28768 SODM_PIG	73	59%	7	15.6/6.4	23/7.7	5.998	6.093	0.0074
2128	Nitrite reductase 1 isoform 1	gi 194036900	77	23%	5	31.9/6.2	31/6.6	5.930	5.976	0.0327
1177	14 kDa phosphohistidine phosphatase	sp Q32PA4 PHP14_BOVIN	63	38%	6	13.9/5.5	16/5.8	6.090	6.184	0.0302
1537	Albumin	gi 833798	186	46%	26	69.0/5.9	69/6.2	7.210	7.161	0.0250
1688	Cytosol aminopeptidase	sp P00727 AMPL_BOVIN	94	20%	9	56.3/6.1	54/6.5	5.686	5.824	0.0230
1810	Creatine kinase	sp Q5XLD3 KCRM	72	16%	6	43.0/6.6	40/7.0	7.089	7.030	0.0320
1880	Creatine kinase	sp Q5XLD3 KCRM	72	16%	6	43.0/6.6	40/6.5	6.213	6.300	0.0139
1883	Creatine kinase	sp Q5XLD3 KCRM	72	16%	6	43.0/6.6	40/6.8	6.198	6.230	0.0145
1885	Creatine kinase	sp Q5XLD3 KCRM	72	16%	6	43.0/6.6	40/7.0	6.884	6.932	0.0038
2203	Creatine kinase M-type (Fragment)	gi 194018722	61	15%	6	43.0/6.6	22/6.8	5.926	5.809	0.0142
1928	Four and half LIM domain protein 3	gi 27716129	119	39%	11	31.7/5.7	37/5.9	5.366	5.439	0.0418
1169	Myoglobin	sp P02189 MYG_PIG	77	59%	7	17.1/6.8	17/7.3	6.921	7.115	<0.0001
2115	Myoglobin	sp P02189 MYG_PIG	77	61%	7	17.1/6.8	17/7.8	7.493	7.564	0.0112
2235	Myoglobin	sp P02189 MYG_PIG	64	44%	6	17.1/6.8	17/7.0	6.108	6.279	0.0002
2238	Myoglobin	sp P02189 MYG_PIG	70	38%	6	17.1/6.8	17/7.0	6.077	6.281	0.0003
2410	Myosin light chain 1	sp A0JNJ5 MLE1_BOVIN	84	46%	7	20.9/5.0	21/5.0	6.761	6.934	0.0171

^a Protein name and accession no. were derived from the NCBI database.^b The MASCOT baseline significant score with $p < 0.05$.^c % of coverage of the entire amino acid sequence.^d Number of matched peptides in the database search.^e M_w and pI, theoretical (recorded in the NCBI database) and observed (estimated from the on-gel spot position).^f Average of relative log₁₀ (intensity spots) in each group.^g p value from ANOVA analysis (effect of group). Protein identification in normal typing was performed by MS/MS using a LCQ ion-trap MS.

TBA-RS levels during ageing remained quite low and were not sufficiently high to affect protein oxidation. Granulometry parameters (circularity and Feret aspect ratio) were affected by ageing. The increase of circularity and Feret aspect ratio highlighted slight structural modifications, with particles adopting a less fibrillar form.

3.2.2. After heating treatments

Raw meat at Day 4 was considered as the control meat (Table 3). Temperature had a major impact on all the biochemical parameters, and protein oxidation increased at cooking temperatures above 100 °C. There were between-group differences: group B

showed a higher increase in protein oxidation between Day 4 and 140 °C (+73%) than group A (+53%). Furthermore, lipid oxidation increased sharply in group B compared to that in group A until 70 °C. However, in response to cooking, TBA-RS showed a biphasic phenomenon due to the breakdown of malondialdehyde into volatile compounds or to their reaction with protein chains leading to the formation of Schiff bases. This phenomenon was previously described by Gatellier, Santé-Lhoutellier, Portanguen, and Kondjoyan (2009). Heating promoted protein denaturation, as observed via the increase in hydrophobicity. Indeed, hydrophobicity had already peaked at 70 °C with an increase of over 220%, and remained stable

Table 3
Effect of ageing (Day 1 and Day 4) and temperature (Day 4, heating at 70 °C, 100 °C and 140 °C) on enzyme activities, glycolytic potential, biochemical parameters, and granulometry parameters in groups A and B.

	Day 1 †		Day 4 †		70 °C ‡		100 °C ‡		140 °C ‡		Ageing		Temperature			
	Group A	Group B	Group A	Group B	Group A	Group B	Group A	Group B	Group A	Group B	Group A	Group B	P _g †	P _t †	P _g †	P _t †
Biochemical parameters																
Carboxyls (nmol of DNPH/mg of protein)	1.39 ± 0.09 ^y	1.30 ± 0.07 ^y	1.86 ± 0.03 ^{zcd}	1.99 ± 0.06 ^{zcd}	1.56 ± 0.07 ^d	1.77 ± 0.07 ^{cd}	2.21 ± 0.07 ^{bc}	2.37 ± 0.07 ^{bc}	2.84 ± 0.25 ^{ab}	3.44 ± 0.21 ^a	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Myofibrillar protein hydrophobicity (µg bound BPB)	69.3 ± 3.9	66.0 ± 4.7	55.2 ± 5.1 ^b	68.1 ± 5.8 ^b	224.8 ± 5.5 ^a	219.9 ± 4.6 ^a	240.2 ± 8.0 ^a	233.4 ± 6.1 ^a	238.5 ± 9.5 ^a	219.9 ± 3.0 ^a	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TBA-RS (mg MDA/kg of meat)	0.05 ± 0.02 ^y	0.15 ± 0.04 ^y	0.11 ± 0.03 ^{vd}	0.41 ± 0.05 ^{zabcd}	0.77 ± 0.20 ^{abc}	1.16 ± 0.22 ^a	0.42 ± 0.04 ^{abcd}	0.90 ± 0.10 ^{ab}	0.36 ± 0.10 ^{bcd}	0.23 ± 0.04 ^{cd}	***	***	*	**	***	NS
Granulometry parameters																
Particle numbers	26193 ± 3521	24395 ± 5612	40189 ± 3390 ^a	29642 ± 2861 ^a	21034 ± 7271 ^b	12494 ± 2994 ^b	8050 ± 2391 ^b	13075 ± 4716 ^b	6426 ± 2177 ^b	10880 ± 2295 ^b	NS	NS	NS	NS	NS	NS
EC diameter (µm)	13.4 ± 0.3	13.5 ± 0.5	13.4 ± 0.2 ^a	13.8 ± 0.2 ^a	9.1 ± 0.3 ^c	8.5 ± 0.3 ^c	10.2 ± 0.9 ^b	10.0 ± 0.4 ^b	8.4 ± 0.2 ^c	8.8 ± 0.4 ^c	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Circularity	0.747 ± 0.011 ^y	0.749 ± 0.013 ^y	0.786 ± 0.005 ^z	0.790 ± 0.006 ^z	0.813 ± 0.011 ^b	0.828 ± 0.012 ^b	0.845 ± 0.005 ^{ab}	0.842 ± 0.009 ^{ab}	0.854 ± 0.007 ^a	0.843 ± 0.006 ^a	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Feret aspect ratio	0.731 ± 0.005 ^{xy}	0.730 ± 0.007 ^x	0.755 ± 0.002 ^z	0.750 ± 0.003 ^{yz}	0.740 ± 0.008	0.759 ± 0.004	0.765 ± 0.005	0.757 ± 0.006	0.763 ± 0.007	0.757 ± 0.004	NS	NS	NS	NS	NS	NS

† Values are means ± SEM of 6 pigs. Values with different superscript letters show significant differences ($p < 0.05$) between ageing (z, y, x) and between temperatures (a, b, c, d).
‡ P_g-group, a-ageing, b-temperature, c-temperature, d-temperature, e-temperature, f-temperature, g-temperature, h-temperature, i-temperature, j-temperature, k-temperature, l-temperature, m-temperature, n-temperature, o-temperature, p-temperature, q-temperature, r-temperature, s-temperature, t-temperature, u-temperature, v-temperature, w-temperature, x-temperature, y-temperature, z-temperature, aa-temperature, ab-temperature, ac-temperature, ad-temperature, ae-temperature, af-temperature, ag-temperature, ah-temperature, ai-temperature, aj-temperature, ak-temperature, al-temperature, am-temperature, an-temperature, ao-temperature, ap-temperature, aq-temperature, ar-temperature, as-temperature, at-temperature, au-temperature, av-temperature, aw-temperature, ax-temperature, ay-temperature, az-temperature, ba-temperature, bb-temperature, bc-temperature, bd-temperature, be-temperature, bf-temperature, bg-temperature, bh-temperature, bi-temperature, bj-temperature, bk-temperature, bl-temperature, bm-temperature, bn-temperature, bo-temperature, bp-temperature, bq-temperature, br-temperature, bs-temperature, bt-temperature, bu-temperature, bv-temperature, bw-temperature, bx-temperature, by-temperature, bz-temperature, ca-temperature, cb-temperature, cc-temperature, cd-temperature, ce-temperature, cf-temperature, cg-temperature, ch-temperature, ci-temperature, cj-temperature, ck-temperature, cl-temperature, cm-temperature, cn-temperature, co-temperature, cp-temperature, cq-temperature, cr-temperature, cs-temperature, ct-temperature, cu-temperature, cv-temperature, cw-temperature, cx-temperature, cy-temperature, cz-temperature, da-temperature, db-temperature, dc-temperature, dd-temperature, de-temperature, df-temperature, dg-temperature, dh-temperature, di-temperature, dj-temperature, dk-temperature, dl-temperature, dm-temperature, dn-temperature, do-temperature, dp-temperature, dq-temperature, dr-temperature, ds-temperature, dt-temperature, du-temperature, dv-temperature, dw-temperature, dx-temperature, dy-temperature, dz-temperature, ea-temperature, eb-temperature, ec-temperature, ed-temperature, ee-temperature, ef-temperature, eg-temperature, eh-temperature, ei-temperature, ej-temperature, ek-temperature, el-temperature, em-temperature, en-temperature, eo-temperature, ep-temperature, eq-temperature, er-temperature, es-temperature, et-temperature, eu-temperature, ev-temperature, ew-temperature, ex-temperature, ey-temperature, ez-temperature, fa-temperature, fb-temperature, fc-temperature, fd-temperature, fe-temperature, ff-temperature, fg-temperature, fh-temperature, fi-temperature, fj-temperature, fk-temperature, fl-temperature, fm-temperature, fn-temperature, fo-temperature, fp-temperature, fq-temperature, fr-temperature, fs-temperature, ft-temperature, fu-temperature, fv-temperature, fw-temperature, fx-temperature, fy-temperature, fz-temperature, ga-temperature, gb-temperature, gc-temperature, gd-temperature, ge-temperature, gf-temperature, gg-temperature, gh-temperature, gi-temperature, gj-temperature, gk-temperature, gl-temperature, gm-temperature, gn-temperature, go-temperature, gp-temperature, gq-temperature, gr-temperature, gs-temperature, gt-temperature, gu-temperature, gv-temperature, gw-temperature, gx-temperature, gy-temperature, gz-temperature, ha-temperature, hb-temperature, hc-temperature, hd-temperature, he-temperature, hf-temperature, hg-temperature, hh-temperature, hi-temperature, hj-temperature, hk-temperature, hl-temperature, hm-temperature, hn-temperature, ho-temperature, hp-temperature, hq-temperature, hr-temperature, hs-temperature, ht-temperature, hu-temperature, hv-temperature, hw-temperature, hx-temperature, hy-temperature, hz-temperature, ia-temperature, ib-temperature, ic-temperature, id-temperature, ie-temperature, if-temperature, ig-temperature, ih-temperature, ii-temperature, ij-temperature, ik-temperature, il-temperature, im-temperature, in-temperature, io-temperature, ip-temperature, iq-temperature, ir-temperature, is-temperature, it-temperature, iu-temperature, iv-temperature, iw-temperature, ix-temperature, iy-temperature, iz-temperature, ja-temperature, jb-temperature, jc-temperature, jd-temperature, je-temperature, jf-temperature, jg-temperature, jh-temperature, ji-temperature, jj-temperature, jk-temperature, jl-temperature, jm-temperature, jn-temperature, jo-temperature, jp-temperature, jq-temperature, jr-temperature, js-temperature, jt-temperature, ju-temperature, jv-temperature, jw-temperature, jx-temperature, jy-temperature, jz-temperature, ka-temperature, kb-temperature, kc-temperature, kd-temperature, ke-temperature, kf-temperature, kg-temperature, kh-temperature, ki-temperature, kj-temperature, kl-temperature, km-temperature, kn-temperature, ko-temperature, kp-temperature, kq-temperature, kr-temperature, ks-temperature, kt-temperature, ku-temperature, kv-temperature, kw-temperature, kx-temperature, ky-temperature, kz-temperature, la-temperature, lb-temperature, lc-temperature, ld-temperature, le-temperature, lf-temperature, lg-temperature, lh-temperature, li-temperature, lj-temperature, lk-temperature, ll-temperature, lm-temperature, ln-temperature, lo-temperature, lp-temperature, lq-temperature, lr-temperature, ls-temperature, lt-temperature, lu-temperature, lv-temperature, lw-temperature, lx-temperature, ly-temperature, lz-temperature, ma-temperature, mb-temperature, mc-temperature, md-temperature, me-temperature, mf-temperature, mg-temperature, mh-temperature, mi-temperature, mj-temperature, mk-temperature, ml-temperature, mm-temperature, mn-temperature, mo-temperature, mp-temperature, mq-temperature, mr-temperature, ms-temperature, mt-temperature, mu-temperature, mv-temperature, mw-temperature, mx-temperature, my-temperature, mz-temperature, na-temperature, nb-temperature, nc-temperature, nd-temperature, ne-temperature, nf-temperature, ng-temperature, nh-temperature, ni-temperature, nj-temperature, nk-temperature, nl-temperature, nm-temperature, no-temperature, np-temperature, nq-temperature, nr-temperature, ns-temperature, nt-temperature, nu-temperature, nv-temperature, nw-temperature, nx-temperature, ny-temperature, nz-temperature, oa-temperature, ob-temperature, oc-temperature, od-temperature, oe-temperature, of-temperature, og-temperature, oh-temperature, oi-temperature, oj-temperature, ok-temperature, ol-temperature, om-temperature, on-temperature, oo-temperature, op-temperature, oq-temperature, or-temperature, os-temperature, ot-temperature, ou-temperature, ov-temperature, ow-temperature, ox-temperature, oy-temperature, oz-temperature, pa-temperature, pb-temperature, pc-temperature, pd-temperature, pe-temperature, pf-temperature, pg-temperature, ph-temperature, pi-temperature, pj-temperature, pk-temperature, pl-temperature, pm-temperature, pn-temperature, po-temperature, pp-temperature, pq-temperature, pr-temperature, ps-temperature, pt-temperature, pu-temperature, pv-temperature, pw-temperature, px-temperature, py-temperature, pz-temperature, qa-temperature, qb-temperature, qc-temperature, qd-temperature, qe-temperature, qf-temperature, qg-temperature, qh-temperature, qi-temperature, qj-temperature, qk-temperature, ql-temperature, qm-temperature, qn-temperature, qo-temperature, qp-temperature, qq-temperature, qr-temperature, qs-temperature, qt-temperature, qu-temperature, qv-temperature, qw-temperature, qx-temperature, qy-temperature, qz-temperature, ra-temperature, rb-temperature, rc-temperature, rd-temperature, re-temperature, rf-temperature, rg-temperature, rh-temperature, ri-temperature, rj-temperature, rk-temperature, rl-temperature, rm-temperature, rn-temperature, ro-temperature, rp-temperature, rq-temperature, rr-temperature, rs-temperature, rt-temperature, ru-temperature, rv-temperature, rw-temperature, rx-temperature, ry-temperature, rz-temperature, sa-temperature, sb-temperature, sc-temperature, sd-temperature, se-temperature, sf-temperature, sg-temperature, sh-temperature, si-temperature, sj-temperature, sk-temperature, sl-temperature, sm-temperature, sn-temperature, so-temperature, sp-temperature, sq-temperature, sr-temperature, ss-temperature, st-temperature, su-temperature, sv-temperature, sw-temperature, sx-temperature, sy-temperature, sz-temperature, ta-temperature, tb-temperature, tc-temperature, td-temperature, te-temperature, tf-temperature, tg-temperature, th-temperature, ti-temperature, tj-temperature, tk-temperature, tl-temperature, tm-temperature, tn-temperature, to-temperature, tp-temperature, tq-temperature, tr-temperature, ts-temperature, tu-temperature, tv-temperature, tw-temperature, tx-temperature, ty-temperature, tz-temperature, ua-temperature, ub-temperature, uc-temperature, ud-temperature, ue-temperature, uf-temperature, ug-temperature, uh-temperature, ui-temperature, uj-temperature, uk-temperature, ul-temperature, um-temperature, un-temperature, uo-temperature, up-temperature, uq-temperature, ur-temperature, us-temperature, ut-temperature, uu-temperature, uv-temperature, uw-temperature, ux-temperature, uy-temperature, uz-temperature, va-temperature, vb-temperature, vc-temperature, vd-temperature, ve-temperature, vf-temperature, vg-temperature, vh-temperature, vi-temperature, vj-temperature, vk-temperature, vl-temperature, vm-temperature, vn-temperature, vo-temperature, vp-temperature, vq-temperature, vr-temperature, vs-temperature, vt-temperature, vu-temperature, vv-temperature, vw-temperature, vx-temperature, vy-temperature, vz-temperature, wa-temperature, wb-temperature, wc-temperature, wd-temperature, we-temperature, wf-temperature, wg-temperature, wh-temperature, wi-temperature, wj-temperature, wk-temperature, wl-temperature, wm-temperature, wn-temperature, wo-temperature, wp-temperature, wq-temperature, wr-temperature, ws-temperature, wt-temperature, wu-temperature, wv-temperature, ww-temperature, wx-temperature, wy-temperature, wz-temperature, xa-temperature, xb-temperature, xc-temperature, xd-temperature, xe-temperature, xf-temperature, xg-temperature, xh-temperature, xi-temperature, xj-temperature, xk-temperature, xl-temperature, xm-temperature, xn-temperature, xo-temperature, xp-temperature, xq-temperature, xr-temperature, xs-temperature, xt-temperature, xu-temperature, xv-temperature, xw-temperature, xx-temperature, xy-temperature, xz-temperature, ya-temperature, yb-temperature, yc-temperature, yd-temperature, ye-temperature, yf-temperature, yg-temperature, yh-temperature, yi-temperature, yj-temperature, yk-temperature, yl-temperature, ym-temperature, yn-temperature, yo-temperature, yp-temperature, yq-temperature, yr-temperature, ys-temperature, yt-temperature, yu-temperature, yv-temperature, yw-temperature, yx-temperature, yy-temperature, yz-temperature, za-temperature, zb-temperature, zc-temperature, zd-temperature, ze-temperature, zf-temperature, zg-temperature, zh-temperature, zi-temperature, zj-temperature, zk-temperature, zl-temperature, zm-temperature, zn-temperature, zo-temperature, zp-temperature, zq-temperature, zr-temperature, zs-temperature, zt-temperature, zu-temperature, zv-temperature, zw-temperature, zx-temperature, zy-temperature, zz-temperature.

for higher cooking temperatures. Chelh et al. (2006) showed that even after a 30-min heating treatment, most BPB was already bound to proteins at 60 °C. Santé-Lhoutellier, Astruc, Marinova, Greve, and Gatellier (2008) showed that when cooking at 100 °C, protein denaturation peaked after just 5 min. In other words, protein denaturation occurred rapidly and seemed an irreversible phenomenon.

Concerning the granulometry parameters, we observed a decrease in particle numbers (−84% for group A and −63% for group B) and EC diameter (around −5% in both groups) coupled with a 6–9% increase in circularity at 140 °C compared to raw meat, which suggests new particle interactions and aggregation. This could be due to either hydrophobic and/or electrical interactions.

3.3. Effects of ageing and cooking temperatures on *in vitro* digestion parameters

Data on *in vitro* digestion parameters after digestion with pepsin alone or coupled with trypsin and α -chymotrypsin are summarized in Table 4.

3.3.1. Effect of ageing

Ageing slightly affected *in vitro* pepsin digestion parameters and had no effect on *in vitro* trypsin and α -chymotrypsin digestion parameters. Interestingly, the effect was more pronounced in group B meat. Concerning digestion by pepsin, the initial slope and the maximal rate tended to decrease with ageing and were higher for group B. Furthermore, half-life time and time to maximal rate both increased. After 1 h of digestion by pepsin, initial OD was higher in group B at Day 4. Thus, overall digestion seemed to be improved in group B compared to that in group A.

Ageing *per se*, with the action of endogenous enzymes such as calpains and cathepsins, did not improve the *in vitro* digestion parameters measured. However, this assertion does not take into account the structural organisation of the muscle cell and the extracellular matrix.

3.3.2. Effect of cooking

After cooking, there were no more group effects on *in vitro* digestion parameters. Only heating treatment continued to reveal group effects. *In vitro* digestion by pepsin showed increased rates (initial slope and maximal rate) at the 70 °C cooking temperature meat compared to raw meat (32% and 36% for group A and 19% and 23% for group B, respectively), but 40% decreased rates at the 100 °C and 140 °C cooking temperatures. The other parameters (half-life time, maximal degradation and time of maximal rate of digestion) steadily increased.

In vitro digestion with trypsin and α -chymotrypsin preceded by pepsin only showed between-group differences for initial OD, which was higher in group B than in group A. This reflected the higher maximum degradation observed in group B after pepsin hydrolysis. Cooking had an effect on all *in vitro* trypsin and α -chymotrypsin digestion parameters, but was a "simple black and white effect", i.e. there were no between-temperature differences.

3.4. Correlation between proteomic data and *in vitro* digestion parameters

Muscle composition through the sarcoplasmic and myofibrillar proteomes was subjected to correlation analysis with the *in vitro* digestion parameters for pepsin and trypsin/ α -chymotrypsin (Table 5). Numerous proteins were significantly correlated to one or several parameters. In order to facilitate the reading of the results, correlations are presented by type of processing (ageing and cooking).

Table 4
Effect of ageing (Day 1 and Day 4) and temperature (Day 4, heating at 70 °C, 100 °C and 140 °C) on *in vitro* digestion parameters in groups A and B.

	Day 1 [†]		Day 4 [†]		70 °C [†]		100 °C [†]		140 °C [†]		Aging		Temperature		
	Group A	Group B	Group A	Group B	Group A	Group B	Group A	Group B	Group A	Group B	P _g [†]	P _a [†]	P _t [†]	P _g [†]	P _t [†]
<i>In vitro</i> pepsin digestion															
Initial slope (ΔOD/h)	0.090 ± 0.002 ^{yz}	0.099 ± 0.003 ^z	0.081 ± 0.003 ^{zb}	0.091 ± 0.002 ^{yzb}	0.107 ± 0.005 ^a	0.108 ± 0.003 ^a	0.065 ± 0.003 ^a	0.064 ± 0.003 ^c	0.065 ± 0.003 ^c	0.064 ± 0.001 ^c	**	*	NS	NS	NS
Half-life time (minutes)	23.8 ± 1.1 ^{yz}	21.5 ± 0.5 ^y	24.2 ± 0.7 ^{yzc}	25.4 ± 0.3 ^{zc}	30.3 ± 1.7 ^b	30.9 ± 1.3 ^b	45.1 ± 2.3 ^a	47.1 ± 1.4 ^a	44.4 ± 1.1 ^a	46.0 ± 1.1 ^a	NS	*	NS	NS	NS
Maximal degradation (OD _{max})	0.065 ± 0.003 ^{yz}	0.064 ± 0.002 ^{yz}	0.060 ± 0.002 ^{yz}	0.070 ± 0.001 ^{zc}	0.104 ± 0.006 ^b	0.107 ± 0.006 ^b	0.120 ± 0.006 ^a	0.128 ± 0.002 ^a	0.118 ± 0.005 ^a	0.126 ± 0.007 ^a	*	NS	*	0.07	NS
Maximal rate of digestion (ΔOD/h)	0.131 ± 0.003 ^{yz}	0.144 ± 0.005 ^z	0.119 ± 0.005 ^{zb}	0.132 ± 0.003 ^{yzb}	0.162 ± 0.007 ^a	0.163 ± 0.005 ^a	0.126 ± 0.004 ^a	0.129 ± 0.003 ^b	0.125 ± 0.004 ^b	0.128 ± 0.004 ^b	**	*	NS	NS	NS
Time to maximal rate of digestion (minutes)	8.2 ± 0.4 ^{yz}	7.5 ± 0.2 ^y	8.4 ± 0.3 ^{yzc}	8.9 ± 0.1 ^{zc}	10.4 ± 0.6 ^b	10.8 ± 0.5 ^b	15.8 ± 0.8 ^a	16.4 ± 0.5 ^a	15.4 ± 0.4 ^a	15.9 ± 0.4 ^a	NS	**	*	NS	NS
<i>In vitro</i> trypsin and α-chymotrypsin digestion															
Initial OD	0.085 ± 0.001 ^y	0.089 ± 0.002 ^{yz}	0.085 ± 0.001 ^{yc}	0.092 ± 0.001 ^{zbc}	0.102 ± 0.003 ^{ab}	0.109 ± 0.003 ^{ab}	0.082 ± 0.003 ^a	0.089 ± 0.002 ^{bc}	0.087 ± 0.005 ^c	0.092 ± 0.002 ^{bc}	**	NS	NS	**	NS
Initial slope (ΔOD/h)	0.204 ± 0.008	0.208 ± 0.005	0.199 ± 0.006 ^b	0.221 ± 0.007 ^b	0.380 ± 0.014 ^a	0.346 ± 0.023 ^a	0.372 ± 0.012 ^a	0.390 ± 0.011 ^a	0.386 ± 0.011 ^a	0.399 ± 0.013 ^a	NS	NS	NS	NS	NS
Half-life time (minutes)	6.2 ± 0.4	6.6 ± 0.4	6.1 ± 0.2 ^b	6.7 ± 0.5 ^b	9.4 ± 0.8 ^{ab}	9.4 ± 1.0 ^{ab}	14.4 ± 2.4 ^c	12.3 ± 0.8 ^a	13.5 ± 2.7 ^a	12.1 ± 1.4 ^a	NS	NS	NS	NS	NS
Maximal degradation (OD _{max})	0.087 ± 0.005	0.090 ± 0.003	0.084 ± 0.003 ^b	0.096 ± 0.004 ^b	0.182 ± 0.011 ^a	0.166 ± 0.016 ^a	0.212 ± 0.017 ^a	0.204 ± 0.010 ^a	0.214 ± 0.022 ^a	0.209 ± 0.015 ^a	NS	NS	NS	NS	NS
Maximal rate of digestion (ΔOD/h)	0.658 ± 0.017	0.650 ± 0.028	0.656 ± 0.025 ^b	0.678 ± 0.029 ^b	0.928 ± 0.043 ^a	0.828 ± 0.02 ^a	0.751 ± 0.06 ^{ab}	0.785 ± 0.017 ^{ab}	0.804 ± 0.055 ^a	0.844 ± 0.037 ^a	NS	NS	NS	NS	NS
Time to maximal rate of digestion (minutes)	2.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1 ^b	2.5 ± 0.2 ^b	3.3 ± 0.3 ^{ab}	3.4 ± 0.3 ^{ab}	5.1 ± 0.8 ^a	4.3 ± 0.3 ^a	4.7 ± 0.9 ^a	4.3 ± 0.5 ^a	NS	NS	NS	NS	NS

† Values are means ± SEM of 6 pigs. Values with different superscript letters show significant differences ($p < 0.05$) between ageing (z, y) and between temperatures (a, b, c).

‡ P (g=group, a=ageing, t=temperature, l=interaction) value from the ANOVA analysis indicates the level of significance in raw meat during ageing (Day 1 and Day 4) and in cooked meat at 70 °C, 100 °C, 140 °C and Day 4, and is annotated as: $p > 0.05$, NS; $p < 0.05$, *; $p < 0.01$, ** and $p < 0.001$, ***.

3.4.1. Aging

The initial pepsin slope for Days 1 and 4 was positively correlated to 4 spots of myoglobin, 3 spots of malate dehydrogenase, and proteins mainly involved in oxido-reduction reactions (glutathione S-transferase, peroxiredoxin). Half-life time (Day 1) was negatively correlated to myoglobin (2115) and SOD. No spots were correlated with maximal degradation at Day 1, while 11 sarcoplasmic proteins were positively or negatively correlated with maximal degradation at Day 4, including some that characterise oxidative fibre type (fatty acid-binding protein) and cell detoxification. Interestingly, inverse relationships were found in the myofibrillar fraction. This proteome map identified several soluble proteins, some negatively correlated to *in vitro* pepsin digestion. Alpha-crystallin, lactate dehydrogenase and fructose biphosphate aldolase were negatively correlated with initial slope. The presence of such proteins first reveals changes in solubility due to *postmortem* muscle conversion, but suggested limited bioaccessibility of digestive proteases to myofibrillar proteins. Moreover, among the myofibrillar proteins associated with maximal degradation (OD_{max}), slow troponin T was positively correlated to both initial slope and OD_{max}, while the 3 spots of fast troponin T were negatively correlated to OD_{max}. The troponin complex is pivotal to Ca²⁺ regulation of muscle contraction. Troponin consists in three subunits: the Ca²⁺ binding protein, Troponin C or TnC, the inhibitory subunit, Troponin I or TnI, and the tropomyosin binding subunit, Troponin T or TnT. TnI and TnT are striated specific proteins and both have diverged into three homologous isoforms corresponding to the cardiac slow and fast skeletal muscle fibre types. Broto, Biesiadecki, Broto, Nosek, and Jin (2006) demonstrated the presence of a coordinated regulatory mechanism for TnI and TnT and also showed how slow TnT was associated with slow-twitch myosin. Moreover, slow TnT had higher Ca²⁺ sensitivity than fast TnT. In terms of muscle contraction power, fibres with myosin I and slow troponin T produced less maximum force *in vivo*. This result suggested that the actomyosin complex would become looser *postmortem*, thus favouring protease action and accessibility to their substrates.

Trypsin and α-chymotrypsin digestion showed similar results, but with fewer protein markers. S-formylglutathione hydrolase, myoglobin, malate dehydrogenase and nitrilase were positively correlated to initial slope and maximal degradation.

3.4.2. Cooking

Unlike in ageing, few proteins were correlated with *in vitro* digestion parameters. Maximal degradation after cooking at 70 °C was correlated to cal sarcin2. This protein belongs to the family of striated muscle-specific proteins of the sarcomeric Z-disc. The activation of cal sarcin2 specifically induces a muscle fibre type switch toward a slow-twitch oxidative phenotype, with an increase in expression of a subset of genes associated with type-I myofibers, such as *myoglobin*, allowing sustained and fatigue-resistant muscle activity.

Concerning trypsin and α-chymotrypsin digestion parameters, initial OD was negatively correlated with fructose biphosphate aldolase, a soluble protein which was present with the myofibrillar proteins. This result added further evidence to the negative impact of soluble protein denaturation on pepsin activity on myofibrillar protein. Malate dehydrogenase was negatively correlated with initial slope and with maximal degradation at 70 °C. Malate dehydrogenase is an enzyme in the citric acid cycle that catalyses the conversion of malate into oxaloacetate in the mitochondria using NAD⁺. This enzyme reflects oxidative metabolism. S-formylglutathione hydrolase was negatively correlated to half-life time (140 °C), but positively correlated to maximal degradation. This enzyme catalyses the hydrolysis of S-formylglutathione to formate and glutathione and acts as a detoxifying compound, and it could be accepted as a marker of this process.

Table 5
Correlations between *in vitro* parameters of digestion by pepsin alone or pepsin coupled with trypsin and α -chymotrypsin and the myofibrillar and sarcoplasmic proteins.

	Myofibrillar proteins			Sarcoplasmic proteins		
	Protein name	Spot ID	Correlation	Protein name	Spot ID	Correlation
<i>In vitro</i> digestion by pepsin Initial slope D1	Cardiac muscle alpha actin 1	834/938	-0.577/-0.633	Heat shock cognate 71 kDa protein	1517	-0.602
	MLC1f/HUMMLC2B	1837/1933	-0.685/-0.585	Fatty acid-binding protein 3	1215	0.655
	Troponin T slow type isoform sTnT2	1625	0.659	Mitochondrial ATP synthase, H ⁺ transporting F1 complex, β -subunit	2364	0.640
	Calcineurin-interacting protein-2	2142	0.655	Malate DH, cytoplasmic	761/1921/1964/ 2015	-0.618/0.595/0.628/ 0.701
Half-life time D1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1551	0.605	Glutathione S-transferase Mu 2	898	0.599
	Alpha-crystallin	757	-0.618	Peroxisome oxidin-6	913	0.590
Maximal rate D1	Troponin T fast skeletal muscle type	1579/2134	0.634/-0.593	14 kDa phosphohistidine phosphatase	1177	0.687
	Similar to PDZ-LIM protein cypher3s isoform 1	1045	-0.641	Myoglobin	1169/2115/2235/ 2238	0.597/0.654/0.666/ 0.591
	Alpha-crystallin	757	0.665	Heat shock cognate 71 kDa protein	1517	0.708
	Cardiac muscle alpha actin 1	938	-0.625	Superoxide dismutase mito	1040	-0.694
Time maximal rate D1	MLC1f	1837	-0.650	Myoglobin	2115	-0.664
	Troponin T slow type isoform sTnT2	1625	0.654	Heat shock cognate 71 kDa protein	1517	-0.644
	Calcineurin-interacting protein-2	2142	0.618	Fatty acid-binding protein 3	1215	0.608
	Alpha-crystallin	757	-0.594	Mitochondrial ATP synthase, H ⁺ transporting F1 complex, β -subunit	2364	0.608
Initial slope D4	Troponin T fast skeletal muscle type	1579	0.650	14 kDa phosphohistidine phosphatase	761/1964/2015	0.516/0.586/0.660
	Similar to PDZ-LIM protein cypher3s isoform 1	1045	-0.630	Myoglobin	1177	0.665
	Alpha-crystallin	757	0.629	Heat shock cognate 71 kDa protein	2115/2235	0.637/0.619
	Cardiac muscle alpha actin 1	938/1540	-0.685/-0.628	Superoxide dismutase mito	1040	-0.680
Half-life time D4 OD _{max} D4	Troponin I	2159	-0.684	Myoglobin	2115	-0.648
	SET and MYND domain-containing 1	929	0.723	Protein DJ-1	2213	0.584
	Calcineurin-interacting protein-2	845	0.587	l-gulonate 3-dehydrogenase	803	0.675
	Calsarcin2	889	0.647	Mitochondrial ATP synthase, H ⁺ transporting F1 complex, β -subunit	2364	0.645
Time maximal rate D4	Fructose-bisphosphate aldolase A	1527	-0.612	Catechol O-methyltransferase	986	0.693
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2097	-0.676	Creatine kinase	1883/1885	0.648/0.607
	Lactate dehydrogenase-A	2101	-0.691	Myoglobin	1169	0.590
	Alpha-crystallin	757	-0.736	Protein DJ-1	2213	0.760
Initial slope D4	MLC1sa	940	0.582	l-gulonate 3-dehydrogenase	803	0.917
	Cardiac muscle alpha actin 1	834/938/1540	-0.702/-0.776/ -0.854	Fatty acid-binding protein 3	1215	0.630
	HUMMLC2B/MLC1f	1933/1962	-0.599/-0.632	S-formylglutathione hydrolase	2109	0.777
	Troponin T slow type isoform sTnT1	910	0.629	Serotransferrin	2345	-0.617
Half-life time D4 OD _{max} D4	Troponin T fast skeletal muscle type	1579/1593/ 2054	-0.639/-0.776/ -0.655	Mitochondrial ATP synthase, H ⁺ transporting F1 complex, β -subunit	2364	0.638
	SET and MYND domain-containing 1	929	0.647	Catechol O-methyltransferase	986	0.838
	Tubulin, alpha 4a	1264	-0.748	Nitric oxide synthase	2128	0.695
	Calcineurin-interacting protein-2	845	0.643	Creatine kinase	1810/1883/1885	-0.666/0.716/0.690
Time maximal rate D4	Calsarcin2	889	0.619	Creatine kinase M-type (Fgm)	2203	-0.723
	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	866	0.871	Myoglobin	1169/2235/2238	0.728/0.707/0.658
	Sarcolumenin precursor	1344	0.871			
	Fructose-bisphosphate aldolase A	1527	-0.812			

Maximal rate D4	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2097	-0.770	2213	0.629
	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1551	0.640	803	0.709
	Lactate dehydrogenase-A	2101	-0.747	2364	0.611
	Alpha-crystallin	757	-0.581		
	Heat shock 70 kDa protein 1	900	-0.810		
	Eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 2	2063	-0.658		
	Cardiac muscle alpha actin 1	938/1540	-0.742/-0.618		
	Troponin I	2159	-0.674		
	SET and MYND domain-containing 1	929	0.734		
	Calcineurin-interacting protein-2	845	0.605	986	0.675
	Calsarcin2	889	0.598	1883/1885	0.701/0.616
	Sarcolumenin precursor	1344	0.636		
	Fructose-bisphosphate aldolase A	1527	-0.581		
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2097	-0.651		
	Lactate dehydrogenase-A	2101	-0.720		
	Alpha-crystallin	757	-0.689		
	MLC1sa	940	0.625		
Time maximal rate D4	Calsarcin2	889	-0.578		
OD _{max} 70	Tropomyosin	2114	-0.626		
OD _{max} 100	SET and MYND domain-containing 1	929	0.857		
	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	866	0.688		
Maximal rate 100	SET and MYND domain-containing 1	929	0.763	2203	-0.601
Time maximal rate 100					
Initial slope 140	Tubulin, alpha 4a	1264	-0.629	827	-0.582
Half-life time 140	Calcineurin-interacting protein-2	845	0.643	2223	0.692
				761/1921/2015	0.632/0.679/0.668
OD _{max} 140				1921/2015	0.609/0.696
Time maximal rate 140				2223	0.705
				761/1921/2015	0.582/0.651/0.609
In vitro digestion by pepsin coupled with trypsin and α-chymotrypsin					
Initial OD D1	MLC1f	1837	-0.613	1810	-0.772
	Tubulin, alpha 4a	1264	-0.645		
	Sarcolumenin precursor	1344	0.605		
Time maximal rate D1	Cardiac muscle alpha actin 1	834/938/1540	-0.698/-0.713/	2345	-0.612
Initial OD D4			-0.821	2213	0.727
	MLC1f/HUMMLC2B	1837/1933	-0.745/-0.683	281	-0.716
	Tropomyosin	2114	-0.626	803	0.745
	Troponin T fast skeletal muscle type	837/1579/	0.657/-0.773/	865	-0.714
		1593/	-0.858/		
	Troponin T slow type isoform sTnT1/T2	2054/2134	-0.823/0.613	1215	0.827
		910/1625	0.696/0.579		
	Troponin I	2159	-0.633	2109	0.822
	SET and MYND domain-containing 1	929	0.695	2364	0.793
	Similar to PDZ-LIM protein cypher3s isoform 1	882	0.636	1921/1964/2015	0.633/0.706/0.788
	Tubulin, alpha 4a	1264	-0.874	761	0.803
	Calcineurin-interacting protein-2	845	0.643	2398	0.604
	Calsarcin2	889	0.826	898	0.619
	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	866	0.735	913	0.639
	Sarcolumenin precursor	1344	0.648	986	0.883

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Myofibrillar proteins				Sarcoplasmic proteins			
	Protein name	Spot ID	Correlation	Protein name	Spot ID	Correlation	
Initial slope D4	Fructose-bisphosphate aldolase A	1527	-0.642	Creatine kinase	1810/1880/1883/ 1885	-0.585/0.621/0.744/ 0.693	
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2097	-0.794	Creatine kinase M-type (Fgm)	2203	-0.813	
	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1551	0.757	Myoglobin	1169/2115/2235/ 2238	0.843/0.647/0.847/ 0.808	
	Lactate dehydrogenase-A	2101	-0.598				
	Alpha-crystallin	757	-0.714				
	Heat shock 70 kDa protein 1	900	-0.778				
	Eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 2	2063	-0.680				
	Cardiac muscle alpha actin 1	938	-0.616	Glycogen phosphorylase (Fgm)	865	-0.600	
	Troponin T fast skeletal muscle type	1593/2054	-0.606/-0.680	S-formylglutathione hydrolase	827	0.734	
	Troponin I	2159	-0.822	Serotransferrin	2345	-0.596	
Half-life time D4 OD _{max} D4				Malate DH	1964	0.602	
				Nitrate 1 isoform 1	2128	0.664	
				Creatine kinase	1880/1885	0.610/0.634	
				Myoglobin	1169	0.648	
				Superoxide dismutase mito.	1040	0.717	
				Glycogen phosphorylase (Fgm)	865	-0.638	
				S-formylglutathione hydrolase	827	0.675	
				Serotransferrin	2345	-0.647	
				Superoxide dismutase mito.	1040	0.661	
				Nitrate 1 isoform 1	2128	0.640	
Maximal rate D4	Troponin I	2159	-0.740	Myoglobin	1169	0.622	
				Protein DJ-1	2213	0.604	
				Lactoylglutathione lyase isoform 1	2223	0.606	
				Creatine kinase	1880/1883	0.586/0.643	
				Glycogen phosphorylase (Fgm)	865	-0.671	
				Serotransferrin	2345	-0.712	
				Superoxide dismutase mito.	1040	0.652	
				Glycogen phosphorylase (Fgm)	865	0.635	
				Malate DH, cytoplasmic	761/1964	-0.658/-0.617	
				Malate DH, cytoplasmic	761/1964	-0.606/-0.600	
Time maximal rate D4	Fructose-bisphosphate aldolase A	1527	-0.602				
	Troponin T slow type isoform sTnT1	910	-0.706				
	Troponin T fast skeletal muscle type	1593/2054	0.708/0.659				
	Tubulin, alpha 4a	1264	0.590				
	Calsarcin2	889	-0.639				
	Calsarcin2	889	-0.576				
	Troponin T fast skeletal muscle type	1593/2054	0.611/0.599				
	Troponin T slow type isoform sTnT1	910	-0.635				
	Calsarcin2	889	-0.630				
	Alpha-actin-1	1547	0.587				
Initial OD 70 Initial slope 70	MLC1sa	940	-0.597				
	Cardiac muscle alpha actin 1	834/938	-0.657/-0.639	Fatty acid-binding protein 3	1215	0.712	
	Troponin T fast skeletal muscle type	837/2134	0.612/0.673	Lactoylglutathione lyase isoform 1	2223	0.752	
	Tubulin, alpha 4a	1264	-0.583	Malate DH	1921/2015	0.788/0.592	
	Calcineurin-interacting protein-2	845	0.731				
	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1551	0.599				
	phosphoglycerate mutase 2	2023	-0.637				
	Lactate dehydrogenase-A	2101	-0.701				
	Beta-enolase 3	2149	-0.768				
	Alpha-crystallin	757	-0.637				
Half-life time 70 OD _{max} 70	Heat shock 70 kDa protein 1	900	-0.623				
	Voltage-dependent anion channel 1	2075	0.583				
	Cardiac muscle alpha actin 1	938	-0.603				
Maximal rate 70	Cardiac muscle alpha actin 1	938	-0.603	S-formylglutathione hydrolase	827	0.842	

Initial slope 140	Troponin T fast skeletal muscle type	1579/2054	-0.616/	-0.623	Nitrite 1 isoform 1	2128	0.593		
	Troponin I	2159	-0.606		Creatine kinase	1880/1885	0.706/0.618		
	Calcineurin-interacting protein-2	845	0.585		Phosphoglucosmutase-1 isoform 1	281	-0.686		
	Phosphoglycerate mutase 2	2023	-0.641		Malate DH	1921	0.699		
	Lactate dehydrogenase-A	2101	-0.646						
	Beta-enolase 3	2149	-0.753						
	Alpha-crystallin	757	-0.660						
	Voltage-dependent anion channel 1	2075	0.595						
Half-life time 140					S-formylglutathione hydrolase	827	-0.759		
OD _{max} 140	Cardiac muscle alpha actin 1	938	-0.603		S-formylglutathione hydrolase	827	-0.730		
Maximal rate 140					S-formylglutathione hydrolase	827	0.672		
Time maximal rate 140					S-formylglutathione hydrolase	827	-0.749		

Abbreviations: D1: Day 1; D4: Day 4; 70: 100 and 140: cooking temperatures at 70 °C, 100 °C and 140 °C; OD: Optical Density; OD_{max}: Maximal degradation. Correlation numbers **in bold** corresponds to proteins overexpressed in group A.

This study identified several proteins as potential markers of *in vitro* digestion parameters, including detoxification enzymes and regulatory muscle contraction proteins (slow TnT, calstabin2). Interestingly, the study on both sarcoplasmic and myofibrillar proteomes highlighted important changes in protein solubility in raw meat which could determine the bioaccessibility of digestive proteases to their cleaving site and partly explains the modulation of *in vitro* digestion parameters.

4. Conclusion

Proteome analysis highlighted that muscle composition promoted the expression of either chaperone proteins (under an indoor rearing system) or cell detoxification enzymes (under an outdoor rearing system), as further confirmed by biochemical assessments. Nevertheless, only pepsin digestion parameters were affected by muscle composition in terms of peak and maximal digestion. However, after heating treatment, the differences disappeared, highlighting the strong impact of technological treatment on the nutritional potential of meat. A few proteins were identified as potential markers of peak or rate of *in vitro* digestion. These included enzymes from the Krebs cycle (malate dehydrogenase), detoxification enzymes (S-formylglutathione) and regulatory muscle contraction proteins (slow TnT, calstabin2). Moreover, we found evidence of important changes in protein solubility in raw meat that could determine the bioaccessibility of digestive proteases to their cleaving site and partly explain the modulation of *in vitro* digestion parameters. Finally, the results suggested that the force binding actin to myosin in the *postmortem* actomyosin complex may play a role in the bioaccessibility of the digestive proteases to their substrates. In general terms, any potential protein interaction with either other proteins or muscle compounds such as aldehyde or carbohydrate may impact digestion, thus warranting further investigation.

Acknowledgements

The authors are grateful for financial support provided by the French Research National Agency (ANR-09-ALIA-008-01 Program PRONUTRIAL (2010-2013)), European regional development funds (FEDER), and Auvergne regional council.

References

- Aebi, H. (1974). Catalase. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (2nd ed., pp. 673–677). New-York: Academic Press.
- Bax, M. L., Aubry, L., Ferreira, C., Daudin, J. D., Gatellier, P., Rémond, D., et al. (2012). Cooking temperature is a key determinant of *in vitro* meat protein digestion rate: Investigation of underlying mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2569–2576.
- Bergmeyer, H. U. (1974). *Methods of enzymatic analysis* (2nd ed., Vol. 3, pp1127, 1196, 1238, 1464). New-York: Academic Press.
- Biesalski, H. K. (2005). Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70, 509–524.
- Bova, M. P., Yaron, O., Huang, Q., Ding, L., Haley, D. A., Stewart, P. L., et al. (1999). Mutation R120G in αB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 6137–6142.
- Bowker, B. C., Fahrenholz, T. M., Paroczay, E. W., & Solomon, M. B. (2008). Effect of hydrodynamic pressure processing and aging on sarcoplasmic proteins of beef strip loins. *Journal of Muscle Foods*, 19, 175–193.
- Brotto, M. A., Biesiadecki, B. J., Brotto, L. S., Nosek, T. M., & Jin, J. P. (2006). Coupled expression of troponin T and troponin I isoforms in single skeletal muscle fibers correlates with contractility. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 290, C567–C576.
- Chan, K. M., & Decker, E. A. (1994). Endogenous skeletal-muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 403–426.
- Chelch, I., Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2006). Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Science*, 74, 681–683.

- Dalrymple, R. H., & Hamm, R. (1973). A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *International Journal of Food Science & Technology*, 8, 439–444.
- Descalzo, A. M., & Sancho, A. M. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 423–436.
- Filgueras, R. S., Gatellier, P., Aubry, L., Thomas, A., Bauchart, D., Durand, D., et al. (2010). Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air- and vacuum-packaged storage: Influence of muscle on oxidative processes. *Meat Science*, 86, 665–673.
- Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., Portanguen, S., & Kondjoyan, A. (2009). Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. *Meat Science*, 83, 651–656.
- Higgs, J. D. (2000). The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 85–95.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of *postmortem* biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194–204.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., et al. (2005). Exponentially modified Protein Abundance Index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, 1265–1272.
- Kaminska, A., Strelkov, S., Goudeau, B., Olivé, M., Dagvadorj, A., Fidzianska, A., et al. (2004). Small deletions disturb desmin architecture leading to breakdown of muscle cells and development of skeletal or cardioskeletal myopathy. *Human Genetics*, 114, 306–313.
- Lynch, S. M., & Frei, B. (1993). Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 34, 1745–1753.
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47, 469–474.
- Markov, D. I., Pivovarova, A. V., Chernik, I. S., Gusev, N. B., & Levitsky, D. I. (2008). Small heat shock protein Hsp27 protects myosin S1 from heat-induced aggregation, but not from thermal denaturation and ATPase inactivation. *FEBS Letters*, 582, 1407–1412.
- Melkani, G. C., Cammarato, A., & Bernstein, S. I. (2006). Alpha B-crystallin maintains skeletal muscle myosin enzymatic activity and prevents its aggregation under heat-shock stress. *Journal of Molecular Biology*, 358, 635–645.
- Monin, G., & Sellier, P. (1985). Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Science*, 13, 49–63.
- Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., & Riboli, E. (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: Dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *International Journal of Cancer*, 98, 241–256.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., & Stadtman, E. R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488–5491.
- Pivovarova, A. V., Mikhailova, V. V., Chernik, I. S., Chebotareva, N. A., Levitsky, D. I., & Gusev, N. B. (2005). Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, 1548–1553.
- Renerre, M., Dumont, F., & Gatellier, P. (1996). Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Science*, 43, 111–121.
- Sakurai, T., Fujita, Y., Ohto, E., Oguro, A., & Atomi, Y. (2005). The decrease of the cytoskeleton tubulin follows the decrease of the associating molecular chaperone α B-crystallin in unloaded soleus muscle atrophy without stretch. *The FASEB Journal*, 19, 1199–1201.
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Greve, E., & Gatellier, P. (2008). Effect of meat cooking on physicochemical state and *in vitro* digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1488–1494.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Aubry, L., & Gatellier, P. (2008). I. Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and *in vitro* digestibility. *Meat Science*, 79, 777–783.
- Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., et al. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: Implications on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2732–2737.
- Shibata, M., Matsumoto, K., Oe, M., Ohnishi-Kameyama, M., Ojima, K., Nakajima, I., et al. (2009). Differential expression of the skeletal muscle proteome in grazed cattle. *Journal of Animal Science*, 87, 2700–2708.
- Traore, S., Aubry, L., Gatellier, P., Przybylski, W., Jaworska, D., Kajak-Siemaszko, K., et al. (2012). Higher drip loss is associated with protein oxidation. *Meat Science*, 90, 917–924.
- Young, J. F., Rosenfold, K., Stagsted, J., Steffensen, C. L., Nielsen, J. H., & Andersen, H. J. (2003). Significance of preslaughter stress and different tissue PUFA levels on the oxidative status and stability of porcine muscle and meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6877–6881.

Conclusion de l'article

La caractérisation des muscles en termes d'analyse du protéome est généralement réalisée sur la fraction sarcoplasmique des protéines de la viande. Or, les protéines myofibrillaires représentent plus de la moitié du total des protéines de la cellule musculaire. Dans cette étude, ont été étudiées la fraction sarcoplasmique et la fraction myofibrillaire, ce qui lui confère exhaustivité et originalité. Ces travaux nous ont ainsi permis de comparer finement la composition de muscles issus de deux modes d'élevages différents, intérieur et plein air. Le mode d'élevage constitue pour nos travaux un levier intéressant pour moduler la composition du tissu musculaire. En effet, les cartes protéomiques établies, aussi bien pour la fraction sarcoplasmique que myofibrillaire, soulignent des différences que nous allons expliciter par la suite. En effet, les muscles provenant des animaux produits en élevage intérieur (groupe A) se caractérisent par une surexpression des protéines contractiles et celles impliquées dans la régulation de la contraction ainsi qu'une surexpression des protéines chaperonnes. Les muscles provenant des animaux produits en plein air (groupe B) surexpriment les enzymes impliquées dans la détoxification cellulaire, celles synthétisées en réponse au stress ainsi que les protéines impliquées dans le mouvement. Ces différences de composition impactent le potentiel d'oxydation des viandes. Globalement les viandes du groupe B présentent des valeurs d'oxydation protéique et lipidique plus importantes, aussi bien sur le produit cru que cuit, par rapport aux viandes du groupe A. Pour lutter contre ces oxydations, le muscle dispose d'un arsenal d'enzymes, de peptides,... et en effet, il est retrouvé dans ce groupe une surexpression des protéines impliquées dans la réponse antioxydante (SOD, glutathion S-transferase) et dans la réponse au stress (protéine DJ-1). Cette concentration supérieure en antioxydants est aussi mise en évidence par les dosages de la catalase et la SOD qui sont plus élevés chez le groupe B. Les caractéristiques du muscle *Longissimus dorsi* des deux groupes diffèrent et nous allons étudier l'impact de ces différences notamment en termes de vitesse de digestion et de maximum de digestion.

Les paramètres de digestion sont impactés par la composition (ou effet groupe) et cela, uniquement durant la maturation. La viande maturée pendant 4 jours se caractérise par une diminution des vitesses de digestion avec cependant une augmentation du potentiel de dégradation. Or, la vitesse de dégradation est un des éléments importants à prendre en compte d'un point de vue physiologique. En effet, il a été montré que chez les personnes âgées, une augmentation rapide de l'aminoacidémie dans le sang favorisait la synthèse protéique dans les

muscles et en ce sens limitait la sarcopénie. Après le traitement thermique, l'impact de la composition sur les paramètres de digestion disparaît. Les enzymes antioxydantes sont sensibles à la température et leurs activités en sont fortement impactées.

La recherche des marqueurs protéiques associés soit au maximum de dégradation, soit à la vitesse de digestion a été réalisée à partir des corrélations entre les spots protéiques et les paramètres de digestion *in vitro* à la maturation sur viande crue, après traitement thermiques à 70, 100 et 140°C. Avec la maturation, certaines enzymes glycolytiques, du cycle de Krebs (malate déshydrogénase) ou de détoxification (glutathion S-transférase) sont corrélées négativement à la vitesse de digestion, mettant en évidence une probable limitation d'accessibilité. Parmi les marqueurs potentiels figurent les troponines T, lentes et rapides, et la troponine I impliquées dans la régulation de l'activité contractile du muscle. La troponine T lente est positivement corrélée à la vitesse initiale et au potentiel de dégradation des protéines. Au niveau de la cuisson, il est aussi retrouvé des protéines principalement corrélées aux paramètres de digestion à 70°C et 140°C. Par exemple, la malate déshydrogénase est négativement corrélée avec la vitesse initiale, soulignant ainsi que, potentiellement, le tissu musculaire à métabolisme oxydatif est plus rapidement dégradé par la pepsine. A 140°C, la S-formylglutathione est corrélée négativement au temps de demi-vie et positivement au maximum de dégradation à 140°C. Cela signifie donc que plus cette enzyme de détoxification est présente et plus le potentiel de dégradation augmente et cela dans un temps court. Elle pourrait être un bon marqueur du potentiel de digestion du tissu musculaire.

Même si l'influence des traitements est majeure et qu'elle atténue les différences de composition, nous avons pu mettre en évidence des interactions entre protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires et leurs rôles sur la bioaccessibilité des protéases digestives. Le tissu musculaire renferme de nombreux composés susceptibles d'interagir avec les protéines notamment en augmentant la température. Ainsi, de nombreuses corrélations et interactions peuvent exister, d'autres investigations sont nécessaires, pour déterminer, entre autres, d'autres marqueurs protéiques.

Conclusion de cette partie *in vitro*

Dans cette partie, nous avons développé un modèle de digestion *in vitro* sur des extraits de protéines myofibrillaires avec la pepsine seule pour mimer la phase gastrique ou couplée avec la trypsine et l' α -chymotrypsine pour la phase intestinale. Du fait de travailler dans des conditions standardisées, ce modèle de digestion permet d'obtenir des résultats fiables et robustes. Afin de pouvoir comparer les différentes conditions d'études, nous avons défini différents paramètres de digestion à savoir la vitesse initiale, le temps de demi-vie, la dégradation maximale, la vitesse maximale et le temps d'obtention de la vitesse maximale. Ainsi, il nous a été possible de caractériser finement les différences au niveau des cinétiques de digestion.

Nous avons suivi trois types de procédés de transformation: la maturation, le hachage et la cuisson. Pour la maturation, il est observé une augmentation des oxydations lipidiques et protéiques. Au niveau de la digestion *in vitro* à la pepsine, les paramètres diminuent avec la maturation. Les mesures montrent donc que les modifications *post mortem* sont principalement des oxydations ou des dégradations dues à la protéolyse et que ces dernières doivent modifier les sites actifs des protéines, réduisant ainsi les vitesses de digestion et augmentant les temps de digestion. Le hachage ne montre pas de différences au niveau biochimique. Cependant, il est observé des différences au niveau de la circularité des particules et du ratio Feret qui augmentent avec le hachage, cela étant dues au procédé lui-même qui est destructif et donc produit des fragments pouvant éventuellement s'agréger d'où l'augmentation des paramètres d'agrégation. Ces modifications entraînent donc une diminution de l'efficacité de la digestion *in vitro* notamment au niveau des vitesses de digestion.

En ce qui concerne l'effet des températures de cuisson, ce dernier est prédominant. Les oxydations et la dénaturation thermique sont exacerbées. Les mesures granulométriques mettent en évidence la mise en place des phénomènes d'agrégation. Au niveau des paramètres de digestion, un profil se dégage qu'il s'agisse de la digestion à la pepsine ou couplée à la trypsine/ α -chymotrypsine : les vitesses et les temps de digestion sont optimisés pour un traitement thermique à 70°C comparés à ceux à 100 et 140°C. Suite à l'ensemble de ces données, le mécanisme d'action des protéases suivant a été proposé en fonction des 3 températures de cuisson (Article 1).

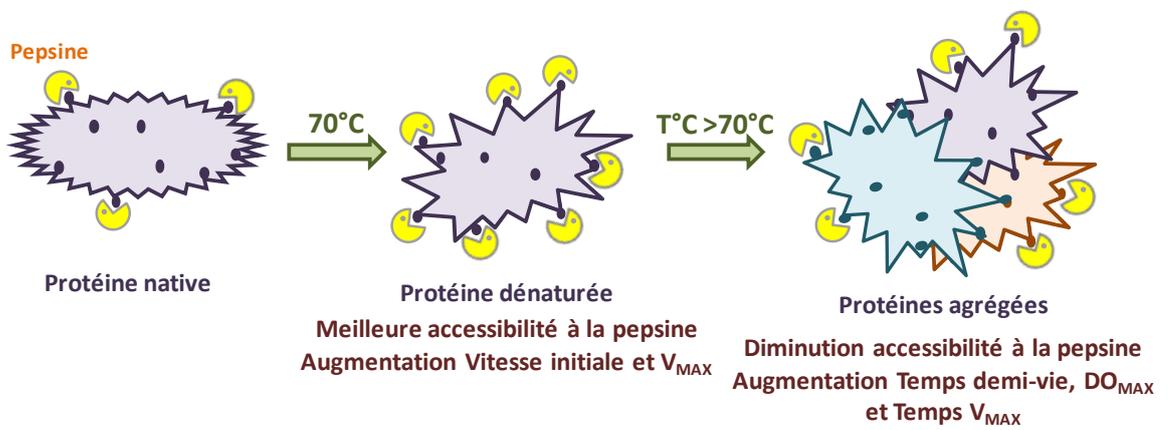


Figure 27 Mécanisme d'action possible de la pepsine en fonction des traitements thermiques et les conséquences sur les paramètres de digestion in vitro

Ce mécanisme, présenté en Figure 27, propose que dans le cas d'une température de cuisson à 70°C, le phénomène de dénaturation prédomine, cela se caractérisant par une augmentation des vitesses de digestion, dénotant une amélioration de l'accessibilité des protéases à leur site de coupure. Pour des températures de cuisson supérieures (100 et 140°C), la dénaturation est toujours présente mais l'oxydation va venir se greffer à cette dernière. La combinaison de ces deux effets va générer l'agrégation des protéines. Cela se caractérise, au niveau de la digestion, par une diminution des vitesses de digestion. Cependant, il est observé une augmentation des temps de demi-vie et d'obtention de la vitesse maximale ainsi que de la dégradation maximale, suggérant donc qu'il subsiste toutefois un gain du potentiel digestif. Autrement dit, la viande sera bien digérée, mais dans un temps plus long.

Par la suite, nous avons voulu mettre en évidence des différences de composition d'un même muscle (*Longissimus dorsi*) entre deux groupes porcs issus de modes d'élevage différents (A : intérieur et B : extérieur). Des mesures protéomiques ont été faites, à la fois sur la fraction sarcoplasmique mais aussi sur la fraction myofibrillaire. Cette analyse exhaustive a permis de montrer que le groupe de porcs élevés en intérieur, possède notamment plus de protéines chaperonnes, de protéines impliquées dans la régulation de la contraction et la structure des myofibrilles. Les muscles de porcs élevés en plein air, quant à eux, surexpriment des protéines impliquées dans le métabolisme antioxydant et de réponse au stress qui se retrouve, au niveau biochimique, avec un potentiel d'oxydation élevé et des concentrations en antioxydants supérieures. Au niveau des paramètres de digestion *in vitro*, seules des différences au niveau de la digestion à la pepsine sont observées et uniquement durant la phase de maturation. Il est observé une légère diminution de la vitesse initiale, ainsi qu'une faible augmentation du temps de demi-vie. Une fois les traitements thermiques appliqués, l'effet du groupe disparaît. Les corrélations établies entre les données de protéomiques et de digestion *in vitro* ont permis de dégager des marqueurs potentiels de la digestion à savoir notamment des enzymes impliquées dans la détoxification, la régulation de la contraction,...

Les données obtenues dans cette partie sont purement réalisées *in vitro*. Le modèle de digestion utilisé est un modèle basique, aussi il paraît difficile de ramener cela à ce qu'il pourrait se passer réellement chez l'homme. En effet, cela ne garantit pas que les mêmes mécanismes se produisent dans des conditions physiologiques. D'où la nécessité de passer à l'expérimentation *in vivo*, afin de vérifier si les hypothèses peuvent être confirmées et s'il existe une concordance entre les 2 modèles (*in vitro vs in vivo*). C'est ce à quoi va s'attacher l'autre partie de ma thèse.

Partie 2:

*Étude et Validation in vivo
sur le modèle miniporc*

Introduction de la Partie 2 : *In vivo*

Dans la partie précédente, nous avons mis en évidence, par une approche *in vitro*, les effets potentiels des procédés de transformation, sur la digestion des protéines de la viande par les enzymes gastro-intestinales. Ces études *in vitro* permettent de mesurer un nombre important de conditions de traitement des aliments, afin de pouvoir dégager des tendances, de proposer des mécanismes d'action possibles et ensuite d'affiner les conditions qui semblent les plus intéressantes. Cependant, n'intégrant pas les régulations physiologiques, les modèles de digestion *in vitro*, même les plus sophistiqués, ne suffisent pas pour affirmer que les variations observées se traduiront par des effets chez l'Homme. Les validations *in vivo* sont donc indispensables. Ces dernières sont cependant plus contraignantes au niveau de leur mise en œuvre, et ne sont envisageables que pour un nombre de conditions à tester plus restreint.

L'utilisation des modèles animaux constitue une étape intermédiaire entre les études *in vitro* et les études chez l'Homme. Pour notre étude, nous avons choisi le miniporc comme animal modèle, d'une part parce que sa physiologie digestive est très proche de celle de l'Homme, d'autre part parce que sa taille moyenne permet l'implantation de canules dans le tube digestif, par lesquelles il est possible d'effectuer des prélèvements de contenu, en cinétique après l'ingestion d'un repas. Grâce à ces mesures dynamiques et quantitatives, il est ainsi possible de suivre le devenir de l'aliment et de mesurer sa digestibilité. Après un rappel sur les mesures réalisables *in vivo* (digestibilité et biodisponibilité) et la pertinence des modèles animaux, la démarche expérimentale sera présentée.

I. Mesures de digestion *in vivo*

La biodisponibilité d'un nutriment peut être définie comme la proportion de ce nutriment qui, après ingestion de l'aliment, est absorbée, et est disponible au niveau du tissu cible pour y exercer une fonction physiologique ou participer à son métabolisme. A ce critère de biodisponibilité peut correspondre la notion de besoin de l'organisme pour le nutriment étudié (Stein *et al.*, 2007). Cependant, il n'existe pas de mesure directe et simple de la biodisponibilité (Stein *et al.*, 2007; Deglaire, 2008). Un des moyens possibles pour estimer au mieux cette biodisponibilité, est de disséquer les différentes étapes de digestion et d'absorption des aliments

complexes, en suivant leur devenir dans le compartiment digestif. Dans ce cadre, une des mesures clés dans l'évaluation de la qualité nutritionnelle d'un aliment, et *in fine* la biodisponibilité des nutriments qui en sont issus, est la mesure de la digestibilité des aliments dans les différents compartiments du tube digestif (Stein *et al.*, 2007). Ainsi, la notion même de digestibilité est complexe en partie à cause de l'intrication des processus digestifs, mais aussi des méthodes et modèles variés utilisés pour l'étudier (Fuller et Tomé 2005; Deglaire, 2008).

I.A. Utilisation des modèles animaux : Considérations pratiques et particularités physiologiques

En raison des difficultés rencontrées pour accéder aux différents compartiments du tractus digestif, les estimations de la biodisponibilité chez l'Homme sont généralement déterminées à partir de la cinétique d'apparition du produit d'intérêt dans le sang périphérique, et la mesure de la digestibilité des aliments se limite souvent à la digestibilité dans l'ensemble du tractus digestif (digestibilité totale). Dans de rares cas, la digestibilité des aliments dans l'intestin grêle (digestibilité iléale) a été mesurée chez des patients porteurs d'une iléostomie, permettant de collecter la totalité du contenu digestif à la fin de l'intestin grêle. Chez le volontaire sain, des sondes naso-intestinales peuvent être posées avant l'ingestion de repas test de façon à collecter le contenu digestif à différents endroits du tube digestif (estomac, duodénum, jéjunum, iléon). La pose d'une sonde nasale dont l'apex est situé au niveau de l'iléon permet ainsi la détermination de la digestibilité iléale des nutriments (Deglaire *et al.*, 2009). Les sondes naso-intestinales présentent l'avantage de permettre la collecte de contenus digestifs dans un tube digestif sain et intact, cependant, il demeure encore quelques incertitudes sur leur effet sur le transit digestif (Medhus *et al.*, 1999), et sur la représentativité des échantillons collectés, surtout lorsque les volontaires reçoivent une alimentation solide.

En raison de leur complexité, les techniques mises en œuvre chez l'Homme pour étudier la digestion ne permettent pas une utilisation en routine, sur une grande diversité d'aliments (Deglaire *et al.*, 2009). Pour déterminer une digestibilité la plus précise possible, sur des aliments très variés, il est donc nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux. Les deux modèles animaux utilisés les plus fréquemment dans la littérature pour les mesures de digestibilité des macronutriments, seuls ou combinés en régimes complexes, sont le rat et le porc.

Le rat, par sa petite taille et son utilisation très répandue en recherche, est très utilisé dans le domaine de la nutrition pour la mesure de digestibilité totale. Le rat est un monogastrique qui

	RAT	HOMME
ESTOMAC (Structure intérieure)		
SYSTEME DIGESTIF COMPLET		

Figure 28 Comparaison de la physiologie digestive du rat et de l'Homme. (DeSesso et Jacobson, 2001)

partage avec l'Homme une organisation générale similaire de son tube digestif (pourcentage de chaque partie de l'intestin relativement à l'intestin total : *homme* : intestin grêle : 81%, gros intestin : 19%; *rat* : intestin grêle : 83%, gros intestin 17%) (Kararli, 1995; DeSesso et Jacobson 2001) mais avec des différences physiologiques notables (Figure 28) comme : un estomac avec 2 régions distinctes (un pré-estomac site d'une digestion bactérienne et un estomac glandulaire pour les sécrétions d'acide et de proenzymes), un caecum très développé, un jéjunum représentant la quasi-totalité de l'intestin grêle et pas de vésicule biliaire (un flux dilué de bile arrive constamment dans le tube digestif) (Kararli, 1995; Wisker *et al.*, 1996; DeSesso et Jacobson, 2001). Les habitudes alimentaires du rat diffèrent de l'Homme car c'est un animal qui grignote et a donc une prise alimentaire relativement étalée sur la journée. Bien qu'il soit omnivore, il a également des préférences alimentaires différentes de l'Homme et peut refuser d'ingérer certains aliments (en particulier des aliments mous). Enfin, le rat peut avoir un comportement coprophage, ce qui a indéniablement des répercussions sur la mesure de la digestibilité fécale et la mesure des recyclages d'azote (Coles *et al.*, 2010). D'un point de vue pratique, le rat présente l'avantage d'être peu onéreux et un prélèvement de contenu dans divers endroits du tube digestif est possible après euthanasie, notamment au niveau de l'iléon pour les mesures de digestibilité des macronutriments dans l'intestin grêle. Cependant, le prélèvement d'un échantillon de contenu digestif nécessite l'euthanasie de l'animal et la description d'une cinétique de digestibilité d'un aliment en période postprandiale requiert donc un nombre important d'animaux.

Le deuxième modèle animal le plus fréquemment utilisé est le cochon, qui présente également une organisation générale du tube digestif comparable à l'Homme (pourcentage de chaque partie de l'intestin relativement à l'intestin total : *cochon* : intestin grêle : 78%, gros intestin : 22%) (Kararli, 1995). Omnivore, il a, contrairement au rat, des habitudes alimentaires similaires à celles de l'Homme (mange par repas), il absorbe une grande variété d'aliments ingérés par l'Homme (Darragh et Hodgkinson, 2000) et n'est pas coprophage. La taille de ce modèle animal permet la pose de canules à différents niveaux du tube digestif (estomac, duodénum, jéjunum, iléon, côlon) permettant de récupérer la totalité (stomies) ou une partie (canules en T) des digestas (Darragh et Hodgkinson, 2000; Deglaire, 2008; Deglaire *et al.*, 2009). Ainsi, la collecte d'échantillons est possible à intervalles réguliers au cours de la journée (description de l'état postprandial par exemple) en divers points du tube digestif et de tester divers régimes sur le même animal sans avoir recours à l'euthanasie.

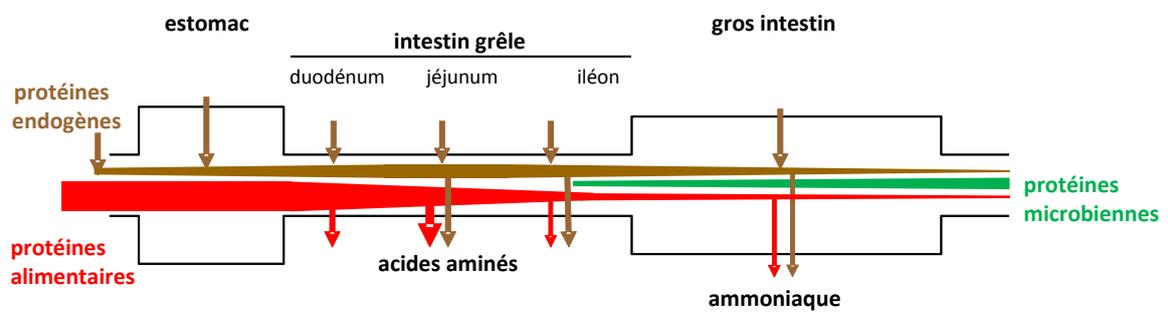


Figure 29 Représentation des flux d'azote dans le tractus digestif.

En raison de sa taille limitée, le cochon miniature, ou miniporc, permet de travailler sur des animaux adultes, stables pondéralement. Ceci permet de réaliser des études de longue durée, sans avoir à modifier les niveaux d'ingestion. Ces animaux sont très faciles à manipuler. De même que sur des porcs conventionnels, on peut réaliser différentes préparations chirurgicales avec l'implantation de canules digestives et/ou cathéters (Ehrlein *et al.*, 1998; De Vrese *et al.*, 2000; Hennig *et al.*, 2004; Rémond *et al.*, 2011). Que ce soit pour le porc conventionnel ou le miniporc, la préparation chirurgicale des animaux (pose de canules ou de cathéters permanents) et l'entretien de ces animaux est onéreuse et nécessite une technicité importante.

Ainsi, chaque modèle animal présente des avantages et inconvénients, liés à la fois à leurs particularités physiologiques et comportementales, mais aussi aux méthodologies de mesures de la digestibilité, spécifiques du modèle employé. Quelques études (encore rares, Rowan *et al.*, 1994; Deglaire *et al.*, 2009) se sont donc intéressées à la comparaison entre l'Homme et ces espèces modèles pour la mesure de la digestibilité des macronutriments dans divers sites du tube digestif, avec des régimes similaires, afin de préciser dans quelle mesure les données obtenues chez les animaux sont transposables à l'Homme. Car *in fine*, malgré des physiologies digestives différentes, si les digestibilités mesurées sur un animal sont similaires à celles constatées chez l'Homme, l'animal peut s'avérer être un modèle pertinent.

I.B. Mesures de digestibilité

La digestibilité d'une protéine alimentaire peut être mesurée à différents niveaux du tractus digestif. Elle représente la quantité de protéine qui disparaît lors de la digestion, par rapport au flux d'entrée dans le segment digestif étudié. Dès leur entrée dans le tractus digestif les aliments se retrouvent en mélange avec les sécrétions endogènes (salives, mucus, enzymes digestives, desquamations...) et les micro-organismes résidents, ceux-ci étant particulièrement abondants de l'iléon au rectum. Ainsi, le contenu digestif contient majoritairement des protéines alimentaires à la sortie de l'estomac, des protéines endogènes dans l'iléon, et des protéines microbiennes dans les fèces (Figure 29).

Selon qu'il est possible, ou non, de différencier la fraction alimentaire des autres fractions on parle de digestibilité réelle, ou de digestibilité apparente.

La digestibilité apparente est la différence entre la quantité ingérée et la quantité excrétée divisée par la quantité ingérée.

$$\text{Digestibilité apparente (\%)} = \frac{\text{Quantité alim.} - \text{Quantité excr.}}{\text{Quantité alim.}} \times 100$$

La digestibilité réelle est calculée de manière similaire sauf qu'elle ne prend en compte que la fraction alimentaire de l'excrété.

$$\text{Digestibilité réelle (\%)} = \frac{\text{Quantité alim.} - \text{Quantité excr. alim.}}{\text{Quantité alim.}} \times 100$$

La digestibilité apparente est ainsi plus faible que la digestibilité réelle.

1.B.1) Digestibilité totale - Digestibilité iléale

L'absorption des acides aminés (AA) est réalisée essentiellement dans l'intestin grêle. Celle dans le gros intestin semble faible quantitativement chez les individus adultes (Fuller et Reeds, 1998; Darragh et Hodgkinson, 2000; Metges, 2000). Les AA libres et peptides, qui sont libérés par la protéolyse dans ce compartiment digestif, sont rapidement utilisés par les micro-organismes au détriment d'une éventuelle absorption (Fuller et Reeds, 1998). Les protéines alimentaires et les protéines des sécrétions endogènes, non digérées dans l'intestin grêle, sont en grande partie dégradées dans le gros intestin sous l'action des micro-organismes. Cette dégradation peut aller jusqu'à la déamination des AA et la production d'ammoniaque. Inversement, d'autres AA sont néosynthétisés par les micro-organismes. Ainsi, les protéines retrouvées au niveau fécal sont essentiellement bactériennes et le profil en AA présent dans les fèces est très différent de celui trouvé dans l'iléon (Fuller et Tomé, 2005). L'action des micro-organismes dans le gros intestin (côlon et caecum) rend ainsi difficile l'interprétation des données de digestibilité sur l'ensemble du tube digestif, en terme de biodisponibilité des acides aminés alimentaires. Les mesures de digestibilité à la fin de l'intestin grêle sont donc préférables.

1.B.2) Digestibilité iléale réelle

Puisqu'elle ne tient compte que de la fraction alimentaire des protéines présentes à la fin de l'intestin grêle, la mesure de digestibilité iléale réelle est la meilleure estimation de la biodisponibilité des acides aminés alimentaires. Elle nécessite cependant de pouvoir discriminer la part alimentaire de la part endogène dans les contenus iléaux.

Différentes techniques ont été développées pour estimer la contribution des sécrétions endogènes dans le contenu protéique des digestas prélevés dans l'iléon. Celle-ci peut être estimée en utilisant un régime protéi-privé (sans protéines), ou un régime à concentrations croissantes en protéines (Delange *et al.*, 1990; Mariscallandin *et al.*, 1995; Fuller et Reeds, 1998).

Tableau 3 Données comparatives de digestibilités iléales apparentes et réelles de l'azote chez différentes espèces animales et chez l'Homme.

Modèle	Régime	Digestibilité apparente	Digestibilité réelle	Références
Rat	AA libres	86	97	Moughan <i>et al.</i> 1992
	Caséine hydrolysée	77	91	
Cochon	Pois	72	89	Leterme <i>et al.</i> , 1996
Cochon	Protéines de soja (26%)	85	91	Mariscallandin <i>et al.</i> , 1995
Cochon	Caséine	90	98	Deglaire <i>et al.</i> , 2009
	Caséine hydrolysée	88	95	
	Isolat protéique de colza	81	91	
Homme	Caséine	76	94	Deglaire <i>et al.</i> , 2009
	Caséine hydrolysée	76	92	
	Isolat protéique de colza	70	87	
Homme	Régime mixte	87	98	Rowan <i>et al.</i> , 1994

Cependant, la nature et la quantité des sécrétions digestives dépendent de l'apport et de la nature de l'alimentation (protéines, fibres,...), et ces estimations sont entachées d'erreurs. Pour estimer plus précisément la sécrétion des protéines alimentaires, des méthodes alternatives ont été développées, utilisant un marquage sélectif des protéines alimentaires ou des protéines endogènes, le plus souvent avec des isotopes stables. Pour les aliments, il s'agit généralement d'un enrichissement en ^{15}N (Leterme *et al.*, 1996; Bos *et al.*, 1999, 2003; Mariotti *et al.*, 1999a,b) mais il peut également être en ^{13}C (Boirie *et al.*, 1997). L'inconvénient d'un marquage des protéines alimentaires est essentiellement lié à l'incorporation des AA marqués absorbés dans les protéines endogènes nouvellement synthétisées. Aussi, en raison du recyclage très rapide des AA dans les sécrétions digestives, les mesures de digestibilité doivent être limitées dans le temps (quelques heures maximum) pour ne pas surestimer la fraction des protéines alimentaires (Leterme *et al.*, 1996). Une alternative intéressante au marquage isotopique des aliments est la guanidination des résidus lysine des protéines pour former de l'homoarginine (Schmitz *et al.*, 1991). L'intérêt de ce marquage est l'absence de recyclage de l'homoarginine dans les contenus digestifs. Les limites résident dans le traitement chimique de l'aliment, et le fait de ne pouvoir utiliser qu'un seul acide aminé pour prédire le flux des protéines endogènes. La dernière méthode utilisée, pour différencier les protéines endogènes des protéines alimentaires, est le marquage des sécrétions endogènes, *via* une perfusion prolongée de l'animal, ou de l'individu, avec un acide aminé marqué (Delange *et al.*, 1990; Gaudichon *et al.*, 1994, 1996; Lien *et al.*, 1997; Fuller et Reeds, 1998; Hess *et al.*, 2000). En général, un seul AA marqué est perfusé, fréquemment la ^{15}N -leucine. Bien que la leucine puisse transmettre le ^{15}N à d'autres acides aminés par transamination, et repartir ainsi le marquage, celui-ci demeure hétérogène et ne touche pas les acides aminés qui ne sont pas transaminés. De plus, la principale limite à cette technique est le choix arbitraire d'un pool protéique de référence pour déterminer un enrichissement moyen des protéines endogènes sécrétées.

Les digestibilités iléales réelles des protéines alimentaires ont été mesurées chez l'Homme, le cochon et le rat. Quel que soit le modèle animal, les valeurs absolues observées sont très élevées et proches de 90-100% pour une grande variété de régimes et de protéines testées, montrant la très grande digestibilité des protéines alimentaires (Donkoh et Moughan, 1994; Bodwell *et al.*, 1980; Forsum *et al.*, 1982; Rutherford et Moughan, 2003; Moughan *et al.*, 1992; Rowan *et al.*, 1994; Mariscallandin *et al.*, 1995; Leterme *et al.*, 1996). Les valeurs de digestibilités apparentes mesurées au niveau iléal sont généralement inférieures de 5 à 15% des valeurs de digestibilités réelles mesurées au même niveau (Tableau 3).

La valeur absolue de digestibilité réelle dépend cependant fortement de la méthode de mesure employée (Fuller et Reeds, 1998; Fuller et Tomé, 2005). Les données de digestibilité réelle de l'azote total mais aussi des AA obtenues chez le cochon et l'Homme sont très proches, validant ainsi le modèle porc comme un modèle pertinent pour les mesures de digestibilité iléale réelle pour l'Homme (Darragh et Hodgkinson, 2000; Fuller et Tomé, 2005; Deglaire, 2008; Deglaire *et al.*, 2009) et confirmant l'importance de la prise en compte des sécrétions digestives et des protéines endogènes dans l'estimation de la digestibilité des protéines alimentaires.

Bien que le rat ne permette pas des mesures répétées de digestibilité, la digestibilité iléale réelle est mesurable après un prélèvement de digesta iléal *post mortem*. Des études comparatives entre le rat et l'Homme ou le rat et le cochon montrent des valeurs numériques très proches (inférieure à 3% pour une grande majorité des données) pour la digestibilité iléale réelle de l'azote ou des AA, suite à l'ingestion d'une grande variété de régimes (Rutherford et Moughan, 2003; Bodwell *et al.*, 1980; Forsum *et al.*, 1982). Seule la digestibilité vraie de la cystéine est différente de plus de 10 points sur une majorité des régimes testés, entre le rat et le cochon (Rutherford et Moughan, 2003).

En conclusion, bien que l'utilisation de sondes naso-intestinales permettent d'accéder à l'intérieurs des différents compartiments du tube digestif de l'Homme, leur utilisation pour les études de nutrition reste limitée en raison des contraintes techniques qu'elles imposent. Le recours à des modèles animaux pour étudier la digestion des aliments est donc indispensable. Parmi ces modèles, le cochon présente de nombreux avantages (physiologie, taille). Chez ces animaux, l'implantation de canules digestives permet de suivre en continu l'évolution postprandiale des flux digestifs. Les résultats rapportés dans la littérature montrent une bonne cohérence entre les mesures de digestibilité réalisées sur ce modèle et celles réalisées chez l'Homme. Le cochon miniature offre, en plus, la possibilité de travailler sur des animaux adultes de faible encombrement. Toutes ces raisons nous ont conduits à choisir le miniporc comme modèle animal pour notre étude. La mesure de la digestibilité iléale réelle est la plus représentative de la biodisponibilité des acides aminés. Sa mise en œuvre nécessite une différenciation des protéines alimentaires et endogènes dans les contenus iléaux. Ceci est possible par marquage soit de l'animal, soit de l'aliment. Les deux approches ont des avantages et des inconvénients.

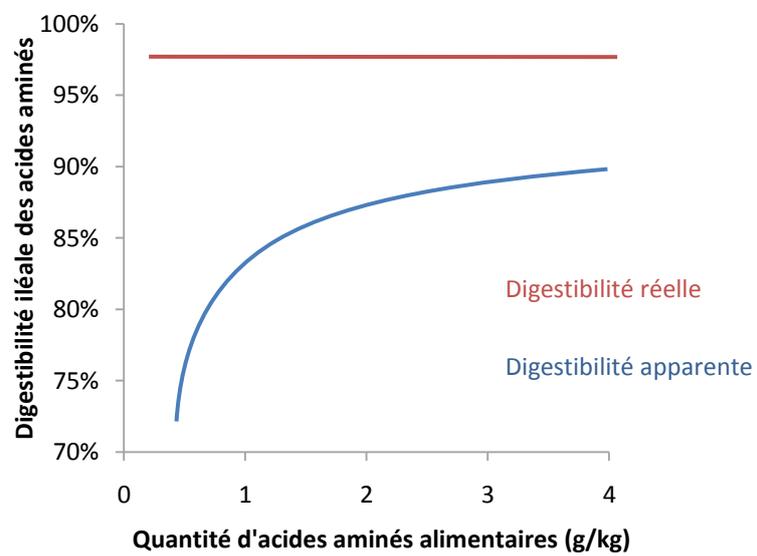


Figure 30 Influence de la quantité d'acides aminés alimentaires sur les mesures de digestibilités iléales apparente et réelle. (Stein et al., 2007)

Pour notre étude nous avons choisi d'utiliser un marquage uniforme des acides aminés de la viande avec un isotope stable (^{15}N).

II. Démarche expérimentale

Suite aux travaux de la partie *in vitro*, au cours de cette étude nous avons décidé d'une part, d'étudier l'effet de la température de cuisson sur la vitesse de digestion et la digestibilité des protéines, et d'autre part, d'étudier l'effet de la quantité ingérée sur la digestibilité. En effet, bien qu'il semble que contrairement à la digestibilité iléale apparente, la digestibilité iléale réelle est relativement constante (Stein *et al.*, 2007; Figure 30), il nous a semblé intéressant de le vérifier sur une des modalités de cuisson testées.

L'approche expérimentale retenue a été celle des repas tests, avec une collecte totale des effluents iléaux pour les mesures de digestibilité, et la mesure de cinétique d'apparition des acides aminés dans le compartiment sanguin pour évaluer la vitesse de digestion. Pour réaliser ces mesures, les miniporcs étaient équipés d'une canule 15 cm en amont de la valvule iléo-caecale, et d'un cathéter dans l'aorte abdominale.

II.A. Préparation des repas tests

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la mesure de la digestibilité la plus proche de la biodisponibilité des acides aminés alimentaires est la digestibilité iléale réelle. Pour obtenir cette mesure, deux conditions sont nécessaires : 1) l'accès au niveau iléal, *via* l'implantation de canules et 2) la capacité de distinguer les fractions protéiques endogènes et alimentaires. Pour ce dernier point, nous avons opté pour un marquage de l'aliment.

Pour cela, nous avons réalisé le marquage sur une vèle (Montbéliard-Charolais) de 86 kg âgée d'un mois. Un cathéter jugulaire a été implanté pour permettre la perfusion de la solution de marquage. Afin d'obtenir un marquage homogène des protéines musculaires, cette solution était composée d'un mélange d'acides aminés issus d'algues enrichies à l'azote 15 (^{15}N). Le débit d'infusion était fixé à 2,4 g d'acides aminés/j durant 14 jours. Chez un animal de cet âge le gain pondéral journalier (environ 1 kg/j), et le taux de synthèse de protéines musculaires (4,5%/j) sont très élevés. Les acides aminés marqués sont ainsi rapidement incorporés dans les protéines musculaires. L'animal a été abattu 24 h après l'arrêt de la perfusion, de façon à laisser décroître l'enrichissement des acides aminés libres musculaires. Suite à cette procédure, nous avons obtenu un enrichissement de la viande de 0,44% en ^{15}N . Les muscles de cet animal ont ensuite été utilisés pour la préparation des viandes.

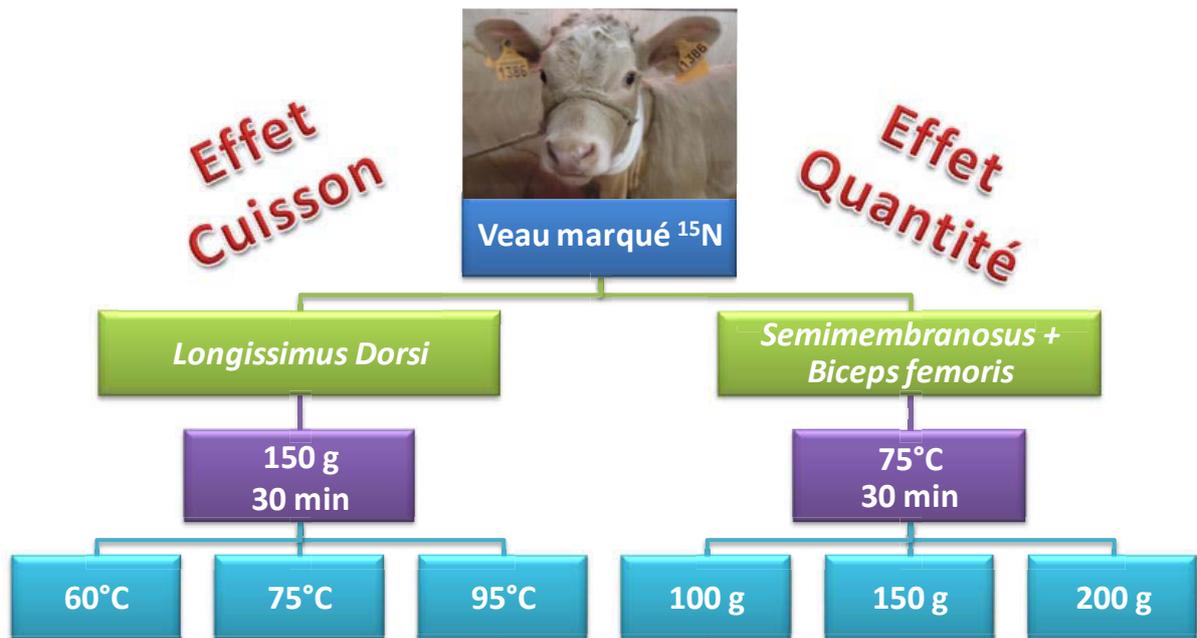


Figure 31 Schéma du protocole expérimental de l'étude.

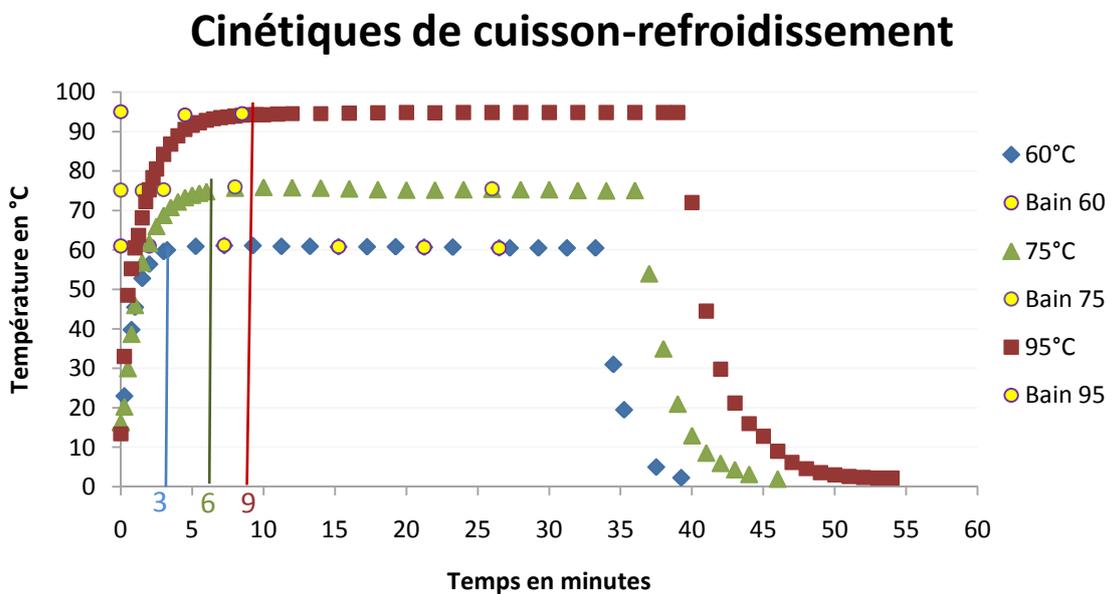


Figure 32 Cinétiques de montée et de descente en températures à 60, 75 et 95°C des morceaux de viande et suivis des températures du bain-marie.

Les modalités de préparation des repas distribués aux miniporc sont schématisées sur la Figure 31.

L'effet cuisson a été testé sur 3 températures de cuisson "à cœur" de 60, 75 et 95°C, pendant 30 min. La température de 60°C correspond à une cuisson plutôt saignante-rosée, 75°C est la température de cuisson moyenne de la viande de veau, et 95°C correspond à une cuisson de type « pot-au-feu ». La portion de viande est basée sur une fraction de 150 g de crue. Pour cette partie, seul le muscle *Longissimus dorsi* est utilisé. L'effet quantité ingérée a été testé sur 3 quantités de viande équivalentes à des portions de 100, 150 et 200 g de viande crue. La condition de cuisson choisie est une cuisson "à cœur" de 75°C pendant 30 minutes. Pour cette partie, nous comptons utiliser uniquement le *Semimembranosus*, mais la quantité s'est avérée insuffisante, nous avons donc décidé de rajouter le *Biceps femoris* qui est de composition semblable.

II.A.1) Cuissons et Préparation des repas

Afin de pouvoir étudier les modifications des protéines à la suite des traitements thermiques, il a fallu standardiser les conditions de cuisson. Une cuisson d'une durée fixe de 30 minutes, une fois la température "à cœur" obtenue, a été retenue afin de comparer uniquement l'effet de la température. Des essais ont donc été réalisés au préalable pour vérifier le délai d'obtention des températures "à cœur" (Figure 32) pour des tranches de viandes d'environ 1 cm d'épaisseur, pesées, mises en sac et à une température avoisinant les 10-15°C avant cuisson.

D'après les cinétiques obtenues, des délais de cuisson de 3 minutes pour la cuisson à 60°C, de 6 min pour celle à 75°C et de 9 min pour 95°C ont été fixés. Une fois les 30 minutes de cuisson écoulées, les poches contenant les morceaux de viande étaient immédiatement placées et maintenues dans la glace fondante pendant au moins 15 minutes, pour stopper au plus vite la cuisson. Les tranches cuites étaient ensuite pesées pour évaluer la perte en eau. Cette valeur a servi pour ajuster la quantité de viande cuite dans les repas test sur la quantité de protéine distribuée.

Les morceaux de viandes cuites ont ensuite été hachés (diamètre de la grille du hachoir : 8 mm comme pour le steak haché) afin de s'affranchir de l'effet de la mastication et normaliser la taille des particules de viande. Les repas étaient composés suivant le Tableau 4 (ci après) de lipides, d'amidon et de cellulose afin de constituer un repas complet. De l'oxyde de chrome a été ajouté au repas comme marqueur indigestible. Son taux de récupération à l'iléon a été utilisé pour

Tableau 4 Composition des repas tests.

Composition des repas	Effet Cuisson			Effet Quantité		
	60°C	75°C	95°C	Portion de 100 g *	Portion de 150 g *	Portion de 200 g *
Viande cuite (g)	120	90,6	82	67,2	100,8	134,4
Lipides (g)	25	25	25	25	25	25
Amidon (g)	100	100	100	100	100	100
Cellulose (g)	7	7	7	7	7	7
Chromium (III) oxide (g)	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07
Eau (mL)	70	70	70	70	70	70
Pertes en eau à la cuisson (%)	16,33	37,91	44,32	32,77	32,77	32,77

* équivalent à la viande crue.

Tableau 5 Résultats de la caractérisation biochimique et des paramètres de digestion in vitro par la pepsine seule ou couplée à la trypsine et l' α -chymotrypsine sur la viande de veau marquée.

	Cru	60°C	75°C	95°C
Paramètres biochimiques				
Hydrophobie de surface des protéines myofibrillaires (μ g BBP lié)	70,3	195,0	243,4	252,1
TBA-RS (mg MDA/kg de viande)	0,719	1,190	0,919	0,589
Carbonyles (nmol DNPH/mg prot)	2,33	2,43	2,83	3,93
Paramètres de digestion in vitro à la pepsine				
Vitesse initiale (Δ DO/h)	0,072	0,078	0,097	0,067
Dégradation maximale (DO à 280 nm)	0,088	0,121	0,152	0,156
Temps de demi-vie (minutes)	42,6	44,3	64,2	75,3
Paramètres de digestion in vitro à la pepsine couplée à la trypsine et l'α-chymotrypsine				
DO initiale (DO à 280 nm)	0,062	0,085	0,067	0,070
Vitesse initiale (Δ DO/h)	0,269	0,327	0,420	0,302
Dégradation maximale (DO à 280 nm)	0,137	0,174	0,244	0,247
Temps de demi-vie (minutes)	8,0	9,1	15,5	23,9

NB: Les analyses ont été réalisées en simple ou en double sur un seul morceau de muscle et un seul animal. Aucune analyse statistique n'est donc possible. Les résultats sont donc purement informatifs.

corriger les quantités de matière sèche collectées après le repas, pour le contenu digestif qui, soit n'est pas sorti par la canule au moment de son passage à l'iléon, soit est encore dans l'intestin grêle en amont du site de prélèvement à la fin des prélèvements.

Des prélèvements sur une période plus longue auraient permis de minimiser ce dernier point, mais il aurait entraîné une plus grande sous-estimation de la fraction protéique endogène, en raison du rapide recyclage des protéines alimentaires dans les sécrétions (Leterme *et al.*, 1996). Les repas étaient présentés sous formes de boulettes de 1-2 cm pour faciliter leur ingestion par les miniporcs. Ils étaient ensuite congelés à -20°C en barquettes, en attente des journées de prélèvements.

II.A.2) Caractérisation de la viande de veau et digestions in vitro

En parallèle de l'expérimentation sur les miniporcs, des mesures biochimiques et les paramètres de digestion *in vitro* par la pepsine seule ou couplée à la trypsine et l' α -chymotrypsine sur la viande de veau marquée sont mesurés avant et après les cuissons à 60°C, 75°C et 95°C durant 30 minutes. Les résultats sont présentés sur le Tableau 5 et sont réalisés pour vérifier la validité des données obtenues dans la partie précédente sur la viande de porc. Ces mesures ont été faites sur un seul muscle, le *Longissimus dorsi* et sur l'unique animal utilisé pour l'étude, le veau marqué. Aucune analyse statistique ne peut donc être réalisée et les résultats sont donnés à titre purement informatif.

A la vue des résultats sur la viande de veau, il est observé les mêmes effets que ceux vus sur la viande de porc. A savoir, il y a une augmentation de l'hydrophobie de surface des protéines ainsi que de l'oxydation des protéines avec la température de chauffage. A l'inverse, l'oxydation des lipides diminue pour une température de cuisson de 95°C, cela étant due à la formation de produits secondaires (bases de Schiff), étape initiatrice de l'agrégation. La caractérisation biochimique est donc bien en accord avec les effets vus sur la viande de porc.

Concernant la digestion *in vitro* à la pepsine seule, il est observé une augmentation de la vitesse initiale jusqu'à 75°C suivie d'une diminution pour la température de cuisson de 95°C. La dégradation maximale et le temps de demi-vie, quand à eux, augmentent avec les températures de cuisson.

Concernant la digestion *in vitro* à la pepsine couplée à la trypsine et l' α -chymotrypsine, il est retrouvé le même profil : 1) une vitesse initiale supérieure pour une température de cuisson de 75°C et 2) une augmentation de la dégradation maximale et du temps de demi-vie avec les

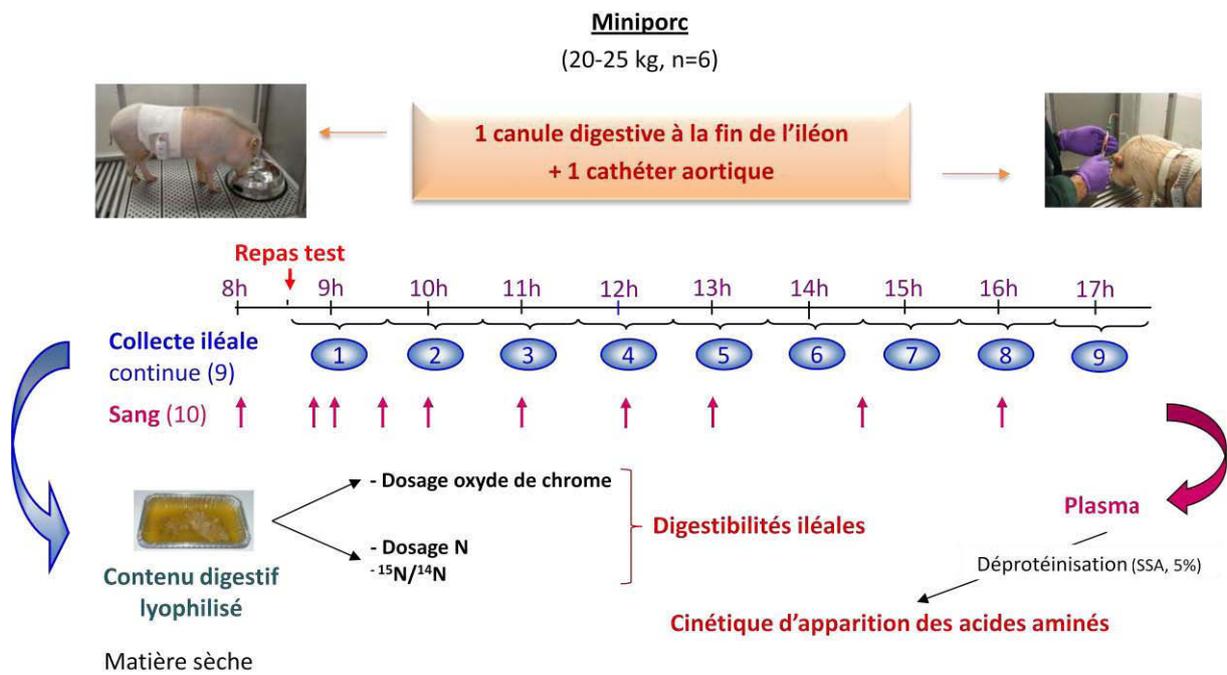


Figure 33 Schéma du déroulement d'une journée de prélèvements et les mesures réalisées.

températures de cuisson. La densité optique initiale (DO initiale), qui représente la digestion à la pepsine durant une heure, est plus élevée à 75°C ce qui confirme une meilleure efficacité de la digestion à la pepsine à cette température de cuisson.

Ces résultats montrent non seulement que les résultats obtenus précédemment sont valides mais aussi que le modèle de digestion *in vitro* est applicable à d'autres espèces (ici, le veau).

II.A.3) Présentation d'une journée de prélèvements

L'effet cuisson et l'effet quantité ont été testés sur 2 périodes différentes, avec pour chacune d'elle, un dispositif en double carré latin 3x3 inversé.

La veille au soir les repas étaient sortis du congélateur et placés à 4°C pour permettre une décongélation lente. Le jour de prélèvement, le repas était donné à 8 h 30, les animaux ayant reçu leur dernier repas 24 h avant.

La cinétique de prélèvement est présentée dans la Figure 33.

Article 3 : La température de cuisson permet de moduler la vitesse de digestion des protéines de la viande, sans affecter leur digestibilité dans l'intestin grêle. (En préparation)

L'étude de digestion *in vitro* (Article 1), nous a permis de mettre en évidence qu'une température de cuisson de 70°C augmente la vitesse de digestion des protéines de la viande et que des températures au-delà de 100°C la ralentisse. Le potentiel de dégradation, quant à lui, augmente avec la température de cuisson, mais tend à atteindre un plateau entre 100 et 140°C. *In vivo*, la vitesse de digestion et la digestibilité dans l'intestin grêle peuvent être modulées par le temps de séjour dans l'estomac et l'intestin grêle, l'acidité gastrique, l'importance des sécrétions d'enzymes digestives... Il peut aussi exister des systèmes de compensation entre la digestion dans l'estomac et l'intestin grêle, faisant qu'au final, les différences observées *in vitro* ne seront pas transposables *in vivo*. Il était donc nécessaire de valider *in vivo* nos observations *in vitro*. Dans l'optique de pouvoir comparer un nombre relativement important de modalités, nous avons opté pour l'utilisation du miniporc, comme modèle animal pour la digestion chez l'Homme.

Suite au marquage des muscles d'un veau, par perfusion i.v. d'acides aminés marqués (¹⁵N), nous avons appliqué à la viande 3 températures de cuisson : 60, 75 et 95°C. Cette fois les températures sont inférieures à 100°C pour rester dans des conditions de cuisson couramment utilisées. La température de 60°C correspond à une cuisson plutôt saignante-rosée, 75°C est la température de cuisson moyenne de la viande de veau, et 95°C correspond à une cuisson de type « pot-au-feu ». Les miniporcs auxquels nous avons distribués ces viandes étaient munis d'un cathéter artériel pour réaliser des mesures de cinétiques d'apparition des acides aminés plasmatiques donnant ainsi la vitesse de digestion, et d'une canule au niveau iléal pour permettre la collecte de digestas à la fin de l'intestin grêle et mesurer ainsi la digestibilité des protéines avant le côlon.

Les rares études *in vivo* présentes de la littérature tendent à montrer que les protéines de la viande sont à la fois rapidement et efficacement digérées dans l'intestin grêle. Aucune ne s'est cependant intéressée à l'impact de la température de cuisson sur ces paramètres.

The speed, but not the efficiency, of protein digestion in the small intestine is modulated by meat cooking temperature¹⁻³

Marie-Laure Bax^{4,5,6}, Caroline Buffière^{4,5}, Noureddine Hafnaoui^{4,5}, Claire Gaudichon⁷,
Véronique Santé-Lhoutellier⁶ and Didier Rémond^{4,5 *}

⁴ INRA, UMR1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

⁵ Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

⁶ INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

⁷ INRA-AgroParisTech, UMR 914 PNCA, F-75005 Paris, France

Word Count : 7500 max

Number of figures : 1

Number of tables : 3

Supplemental on line material : Fig 1-3

Running title : Cooking effect on meat protein digestion

Footnotes :

¹Supported by the French Research National Agency (ANR-09-ALIA-008-01 Program PRONUTRIAL (2010-2013)), the European fund for regional development (FEDER), and the Auvergne regional council.

² Author disclosures : M.-L. Bax, C. Buffière, N. Hafnaoui, C. Gaudichon, V. Santé-Lhoutellier and D. Rémond, no conflicts of interest.

³ Supplemental Figures 1-3 are available from the "Online Supporting Material" link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <http://jn.nutrition.org>.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail address : didier.remond@clermont.inra.fr; Tel : +33 473 62 40 74.

1 **Abstract**

2 The speed of protein digestion impacts on the postprandial protein anabolism. After exercise
3 or in the elderly, fast proteins stimulate more efficiently protein synthesis than slow proteins.
4 Meat is potentially a source of fast proteins. However, *in vitro* studies suggest that the speed,
5 and efficiency, of meat protein digestion can be affected by cooking temperature (CT°). The
6 objective of this study was to validate these observations *in vivo*. Six minipigs fitted with an
7 ileal cannula, and an arterial catheter, were used. In order to measure the true ileal
8 digestibility (TID), tested meat was obtained from a calf, of which muscle proteins have been
9 intrinsically labeled with ¹⁵N-amino acids. Three CT° (60, 75 and 95°C; core temperature for
10 30 min), and 3 levels of intake (1, 1.45, and 1.90 g protein/kg body weight) were tested.
11 Following meat ingestion, ileal digesta and arterial blood were collected over a 9-h period.
12 The speed of digestion, evaluated from the kinetics of amino acid appearance in blood within
13 the first 3 h, was greater for the CT° of 75°C, compared to that of 60 and 95°C. The TID,
14 which averaged 95%, was not affected by CT°, and by the level of meat intake. The amino
15 acid composition of the digesta flowing at the ileum was not affected by CT°. These results
16 show that CT° can be an interesting lever to modulate the speed of meat protein digestion,
17 without affecting the efficiency of the small intestinal digestion, and consequently the entry of
18 meat protein residues into the colon.

19 Introduction

20 The classic criteria for evaluating the quality of a protein source are based on the amino acids
21 composition and the digestibility of the protein fraction across the whole digestive tract. It is
22 now known that these basic criteria are not sufficient to fully describe the nutritional potential
23 of a protein. For instance, it has been shown that the speed of protein digestion regulates the
24 postprandial protein retention (1). Also, total digestibility is not relevant to predict the amino
25 acid bioavailability, indeed only the small intestinal digestion is supposed to supply amino
26 acids to the body. Measurements of true ileal digestibility (TID) are therefore more
27 appropriated, but they are very difficult to obtain in healthy humans. Some has been carried
28 out with isolated proteins, by collection of ileal chyme with naso-intestinal tube (2-6), but
29 there is no data on the TID of proteins entrapped in their natural matrix.

30 Meat proteins have a favorable balance in indispensable amino acids, and a high digestibility
31 in the whole digestive tract (7,8). It is very efficient to stimulate muscle protein synthesis in
32 young and elderly subjects (9), and can be a significant source of bioactive peptides, such as
33 carnosine (10,11) and antihypertensive peptides (12). On the opposite side, epidemiological
34 studies reported a possible link between excessive red meat intake and colorectal cancer risk
35 (13,14). This relationship is however regularly questioned (15,16) and moderate lean red meat
36 consumption as part of a balanced diet is unlikely to increase cancer risk.

37 Regarding digestion, meat seems to be a source of fast-digested proteins (17), having a high
38 TID in human (18). However, data on meat protein digestion are scarce, and do not allow to
39 take into account the effect of the different processes involved in meat preparation on these
40 parameters. Yet, *in vitro* data suggested that, for instance, cooking temperature may affect the
41 speed and the efficiency of protein digestion (19). As meat protein degradation in the colon
42 has been suspected as a potential cause of cancer development, a better knowledge of meat
43 protein digestibility in the small intestine is required.

44 In this context, the present study aimed to investigate, *in vivo*, the effect of meat cooking
45 temperature on the parameters of protein digestion in the small intestine, using the minipig as
46 a model animal. Veal was used as meat model, with 3 cooking temperatures, and 3 levels of
47 intake. The determination of TID coefficient requiring the measurement of ileal dietary
48 protein flow (*vs* endogenous protein flow), an original approach was used, involving ¹⁵N-
49 amino acid incorporation in muscles, before calf slaughter and meat preparation.

50

51 **Materials and Methods**

52 All procedures were conducted in accordance with the guidelines formulated by the European
53 Community for the use of experimental animals (L358-86/609/EEC), and the study was approved by
54 the Local Committee for Ethics in Animal Experimentation (N°CE9-11; CEMEA Auvergne, Aubière,
55 France).

56 *Animals.* The study involved 6 female Göttingen minipigs (Ellegaard, Denmark) (12-16 mo old; 20–
57 25 kg body weight). At least 3 weeks before initiating the experiment, minipigs were surgically fitted
58 with a permanent catheter (polyvinyl chloride; 1.1-mm i.d., 1.9-mm o.d.) in the aorta, and a T-shaped
59 cannula (silicone rubber; 12-mm i.d., 17-mm o.d.) in the distal ileum. Surgical procedures, as well as
60 post-surgical cares have been previously described in detail by Rémond *et al.* (20). Minipigs were
61 housed in individual pens (1 x 1.5 m), separated by Plexiglass walls, in a ventilated room with
62 controlled temperature (20–23°C). They were fed once daily, at 0800, with 400 g of a commercial diet
63 [18% protein (N x 6.25), 2% fat, 5% cellulose, 6% ash] (Porcyprima, SANDERS), and had free access
64 to water.

65 *Meat.* A calf (Montbelliard X Charolais) (86 kg body weight) was fitted with a catheter in the jugular
66 vein. This catheter was used to infuse continuously, during 14 d, a solution containing a mixture of
67 ¹⁵N-amino acids (algal amino acids, 98% ¹⁵N, Cambridge Isotope Labs. Inc., MA). The solution was
68 made up with of the ¹⁵N-amino acid mixture, diluted in 1L of sterile apyrogenic water (pH 7.4; 330
69 mosmole/L), and autoclaved.

70 It was infused at a rate of 4 mL/h, using a syringe pump (Vial medical, SE 400, Becton Dickinson,
71 Germany). The calf was slaughtered 1 d after the end of the infusion in order to ensure a decrease in
72 ¹⁵N-enrichment of muscle free amino acids. The carcass was kept for 5 days at 4°C. *Longissimus dorsi*
73 was then sampled for experiment 1 and *Semimembranosus* and *Biceps femoris* for experiment 2.
74 *Test meals*. Muscles were cut into slices (1 cm thick). Each slice was weighed, bagged, and cooked in
75 a water bath for 30 minutes at the selected core temperature (Exp 1 : 60, 75, 95°C; Exp 2 : 75°C).
76 Slices were then rapidly cooled in ice and reweighed to calculate juice losses during cooking. The
77 cooked meat was minced (8-mm grid) in order to limit the interaction with the individual chewing
78 efficiency of the minipigs. After mincing, meals were prepared by adding to the labeled-meat : 100 g
79 of wheat starch, 7 g of cellulose, 70 ml of water, and 25 g of fat. Furthermore, 1 g of the undigestible
80 marker chromic oxide (Cr₂O₃) was added, to correct for losses of chyme not exported through the
81 cannula (21). After mixing of the ingredients, the meal was presented as balls of 1.5-2 cm diameter, in
82 order to facilitate ingestion by minipigs. Meals were placed under partial vacuum and stored at -20°C
83 until use.
84 *Experimental protocol*. The study included 2 experiments. Exp.1 investigated the effect of cooking
85 temperature (60, 75, 95°C) on the small intestinal digestibility and the kinetics of amino acid
86 absorption. In this experiment, the amount of meat in the different test meals was adjusted in order to
87 take into account the juice losses during cooking, and to provide the same level of proteins in each test
88 meal. Exp.2 investigated the effect of the amount of ingested meat (65, 100, 135 g of 75°C-cooked
89 meat) on small intestinal digestibility. In each experiment, all test-meals were tested on each 6
90 minipigs, according to a duplicate 3x3 latin square design. For a given minipig, two days of sampling
91 were separated by at least 1 wk. On the day of sampling, minipigs did not receive the commercial diet.
92 They were exclusively offered the test-meals (at 0815), and kept the continuous access to water.
93 Digesta were continuously collected from 30 min before, to 9 h after the test-meal delivery. Plastic
94 bottles, attached to the cannula, were regularly replaced, according to digestive burst. The collected
95 digesta were weighed, immediately frozen at -20°C, and accumulated over 1-h intervals.

96 During Exp.1, blood samples (5.5 mL) were collected in cold syringes with lithium-heparin as
 97 anticoagulant (S-Monovettes, Starstedt), at 0745, 0830, 0845, 0915, 0945, 1045, 1145, 1245, 1415 and
 98 1545. They were immediately centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was
 99 frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

100 *Analytical methods.* Digesta were lyophilized, and homogenized using a ball mill. For chromium
 101 determination, freeze-dried samples were mineralized at 550°C for 6 h. Ashes were dissolved in a
 102 mixture of nitric acid and chromium concentration was determined using atomic absorption
 103 spectrometry (AAAnalyst 400, Perkin-Elmer). Total nitrogen in the gastrointestinal effluents and meat
 104 were determined using an elemental analyzer (Vario Isotope cube, Elementar). For amino acids
 105 analysis, a representative sample of the whole postprandial period was constituted from a fixed
 106 percentage of each hourly collected digesta. Prior to acid-hydrolysis (HCl 6N, 24 h, 110°C), sulfur
 107 amino were oxidized with H₂O₂. This pre-treatment allows sulfur amino acids determination but lead
 108 to an underestimation of threonine and tyrosine, which are particularly sensitive to oxidation. Amino
 109 acids were determined by ion exchange chromatography, with ninhydrine post-column reaction (Bio-
 110 Tek Instruments ARL). Determination of ¹⁵N enrichment were performed using an isotope ratio mass
 111 spectrometer (Optima; Fisons Instruments) coupled with an elemental analyzer (NA 1500 Serie 2;
 112 Fisons). Calibrated N₂ gas was used as the ¹⁵N/¹⁴N reference. Enrichments were expressed as atom
 113 percent ($AP = \frac{^{15}N}{^{14}N + ^{15}N}$) and atom percent excess ($APE = AP - \text{baseline } ^{15}N \text{ abundance of the}$
 114 sample) as described by Gausserès *et al.* (22).

115 Plasma concentrations of amino acids were measured by ion-exchange chromatography, after
 116 deproteinization with sulfosalicylic acid.

117 *Calculations.* The amount of dietary nitrogen present in each ileal sample (N_{meal}) was determined
 118 from the dilution of the isotopic marker (¹⁵N), as follows :

$$119 \quad N_{\text{meal}} = N_{\text{tot}} \times (APE_s / APE_{\text{meal}})$$

120 where N_{tot} is the amount of total N in the sample, and APE_s and APE_{meal} are ¹⁵N enrichment of the
 121 sample and the meal, respectively.

122 The level of endogenous nitrogen in samples was derived from the difference between N_{tot} and N_{meal} .

123 Apparent ileal digestibility (AID) was calculated from the cumulated amounts of total N recovered at
 124 the ileal level, corrected by the percentage of chromium recovery, using the following equation :

$$125 \text{ AID (\%)} = 1 - [(N_{\text{total}} \times Cr_{\text{intake}}) / (N_{\text{intake}} \times Cr_s)]$$

126 True ileal digestibility (TID) was calculated from the cumulated amounts of ^{15}N recovered at the ileal
 127 level, corrected by the percentage of chromium recovery, using the following equation :

$$128 \text{ TID (\%)} = 1 - [(N_{\text{meal}} \times Cr_{\text{intake}}) / (N_{\text{intake}} \times Cr_s)]$$

129 where N_{intake} is the amount of nitrogen ingested and Cr_{intake} and Cr_s are the amount of chromium in the
 130 diet and the digesta, respectively.

131 *Statistical analysis.* Kinetics were analyzed using the repeated option of the PROC MIXED
 132 procedure of SAS (SAS/STAT Users Guide®, Release 8.1; SAS Institute Inc, Cary, NC, 2000), with
 133 minipigs as random effect and time, test meal, time x test meal as factors. When significant time x test
 134 meal interaction was found, the LSMEANS procedure was used to test differences at specific times,
 135 between and within test meals. Postprandial curve of indispensable amino acids (IAA) was
 136 characterized by baseline value (Cbase), zenith (Cmax), time at which Cmax was observed (tCmax),
 137 and postprandial area under the curve (AUC; calculated by integrating the difference between Cbase
 138 and observed concentration, trapezoidal method). For cumulative fluxes at the ileum, AID, TID, as
 139 well as for the descriptive parameters of plasma amino acid curves data were analyzed by ANOVA
 140 with the GLM procedure of SAS, using a model with animal and test meal as independent variables.
 141 Duncan's test was used to compare means. Means are considered significantly different at $P < 0.05$.
 142 All results are presented as means \pm SEM.

143 **Results**

144 ^{15}N labeling of calf muscles at slaughter was 0.44%. In Exp. 1, losses of juices during cooking
 145 were 16, 38, and 44%, at 60, 75, and 95°C, respectively. They were of 33% in Exp. 2, for a
 146 temperature of 75°C. Protein content (N x 6.25) of meat was 26, 32, and 35%, after cooking at
 147 60, 75, and 95°C.

148 The effect of cooking temperature on the kinetics of the plasma concentrations in
149 indispensable amino acids (IAA) is presented in **Fig. 1**. The evolution of these concentrations
150 during the first 3 h following the meal is mainly driven by the absorption of amino acids. The
151 kinetics of plasma IAA concentrations within this interval of time is thus a good index of the
152 speed of digestion. Both, the shape of the curve (**Fig. 1**), and the AUC (**Tab. 1**) indicated an
153 increase in the speed of digestion when meat cooking temperature was increased from 60 to
154 75°C, and a decrease when it increased from 75 to 95°C. However, neither the maximal
155 plasma IAA concentration, nor the AUC over the overall 6-h postprandial period were
156 affected by cooking temperatures.

157 The cumulative curves of total, endogenous and dietary N, collected at the ileum after
158 correction by chromium recovery are presented in **Suppl. Fig. 1 and Fig. 2**. First appearance
159 of labeled meat at the ileum was observed within the 3rd hour following the meal. These
160 curves were not significantly affected by the meat cooking temperature, however the
161 cumulative dietary N between 7 and 9 h after the meal were greater when meat ingestion was
162 of 135 g compared to 65 and 100 g. Total N flow to the ileum tended to be lower with the
163 meat cooking temperature of 75°C ($P < 0.10$), and consequently total N AID tended to be
164 slightly greater for this cooking temperature ($P < 0.10$) (**Tab. 2**). Nevertheless, dietary N flow
165 to the ileum, and TID, were not affected by the meat cooking temperature ($P > 0.10$).
166 Similarly, the pattern of amino acid flowing at the ileum was not affected by meat cooking
167 temperature ($P > 0.10$) (**Suppl. Fig. 3A**). The increase in meat intake from 65 to 135 g did not
168 affect the total N flow to the ileum ($P > 0.10$), consequently total N AID was largely
169 increased (from 50 to 80%) ($P < 0.001$) (**Tab. 3**). However, as dietary N flow increased ($P <$
170 0.05), the TID was not affected ($P > 0.10$) by the level of meat intake. This slight increase in
171 dietary N flow did not affect the pattern of the amino acids flowing at the ileum (**Suppl. Fig.**
172 **3B**). On average, over Exp. 1 and Exp. 2, endogenous N amounted 1.25 g/ 9 h, accounting for

173 83% of the total N flowing at the ileum, and meat protein TID was $95.3 \pm 0.2\%$.

174 **Discussion**

175 The concept of slow and fast proteins has been established by Boirie *et al.* (23). According to
176 the speed of the protein digestion, and the physiology of the consumer, the postprandial
177 utilization of dietary amino acids by the body can be different. In young adults, it seems that
178 slow proteins are more beneficial, avoiding the important oxidation of amino acids observed
179 with the fast proteins (24). But in elderly, in order to fight against the establishment of
180 sarcopenia, fast proteins are more efficient than slow proteins to improve postprandial protein
181 anabolism (1). In sportsman, ingestion of fast proteins, after exercise, seems also more
182 efficient than slow proteins to sustain muscle protein synthesis (25). The ranking of proteins
183 according to their digestion rate is thus interesting. A previous study, showed that meat can be
184 considered as a source of fast proteins for the elderly (17), but that the speed of digestion can
185 be affected by their chewing efficiency. Even if the observed differences remained tenuous,
186 by comparison with the differences observed with dairy proteins (caseins and whey proteins),
187 the present study showed that the speed of digestion can also be affected by meat cooking
188 temperature. Although this relation is regularly questioned (15), meat consumption has been
189 often incriminated in colorectal cancer development (26). One of the hypotheses evoked to
190 explain this link lies on meat protein degradation in the colon, leading to the production
191 deleterious products such as sulfides or nitrosamines (27,28). The present study evidenced a
192 very high digestibility (about 95%) of meat proteins in the small intestine. This digestibility is
193 not affected by meat preparation, and although the amount of meat protein entering the colon
194 seemed to increase with the level of meat intake, it remains very limited.

195 In the framework of human nutrition, the relevance of the pig as model animal for protein
196 digestion studies has been clearly established (29). In the present study veal was used as meat
197 model, because the medium size of calf offered a good compromise between the amount of

198 produced meat and the cost of labeled amino acids. The chosen cooking temperatures
199 represented a pink meat for the cooking temperature at 60°C. The temperature of 75°C was
200 the current cooking temperature for veal meat and for 95°C, it represented boiled meat. The
201 meat servings given to the minipigs would correspond to servings from 180 to 380 g of
202 cooked meat for a man of 70 kg (1, 1.45, and 1.90 g protein/kg body weight), which
203 corresponds to amounts moderate, to high.

204 Coming back to the speed of digestion, an *in vitro* approach brought out the cooking
205 temperature as one of its key determinant (19). Relative to raw meat, the speed of digestion
206 was increased with a cooking temperature of 70°C, and decreased for a cooking temperature
207 above 100°C. This effect was explained by a progressive denaturation of proteins with low
208 temperature, followed by an oxidation, leading to protein aggregation, with high
209 temperatures. The first phenomenon exposes the cleavage sites to the digestive enzymes; the
210 second one hides these sites within the aggregates. Although, the increase in the plasma
211 concentration of indispensable amino acids observed in the present study integrates the *in vivo*
212 regulations (interactions with the other ingredients, enzyme secretions, gastric emptying,
213 small intestinal tonus...), very similar variations to those recorded *in vitro* were observed,
214 with the highest speed of digestion observed with a cooking temperature of 75°C. For the
215 cooking temperatures of 60 and 75°C, the increase in plasma IAA was very rapid (within 15
216 min), and reached the maximal values about 2.5 h after the beginning of the meal. These
217 observations in minipigs with the one previously reported in humans with a meat cooking
218 temperature of 65°C (17).

219 The determination of true ileal digestibility allows the *in vivo* investigation of the effect of
220 food processing on the dietary protein degradation by the gastrointestinal enzymes. In order to
221 distinguish dietary residues from endogenous materials in ileal chyme, isotope dilution
222 methods have been developed labeling either the diet, or the animal.

223 Both techniques have drawbacks (30). The rapid recycling of ^{15}N -labeled dietary proteins into
224 endogenous secretions leads to underestimated true ileal digestibility values (31). However,
225 with animal labeling, interrogations remain on the representativeness of the amino acid used
226 for labeling (generally ^{15}N -leucine), and of the endogenous proteins used as a reference pool.
227 The present study is the first one that used labeled meat for determining the true ileal
228 digestibility of its proteins. Meat was uniformly labeled by incorporation of a mixture of ^{15}N -
229 amino acids in order to avoid the uncertainties linked to the use of single amino acid labeling.
230 The observed true ileal digestibility of meat proteins was high (95%), in agreement with that
231 observed in human for meat (18), and milk (4). Although *in vitro* data suggested an increase
232 in the digestibility of meat proteins with increased cooking temperatures (19), no
233 improvement in true ileal digestibility was observed in the present study. Heat treatments
234 generally increase the Maillard reactions, and the amino acid racemization, which may
235 potentially decrease the digestibility (21,32). It was not the case in the present study, where no
236 effect was observed, even on individual amino acids such as lysine, arginine, and sulphur
237 amino acids. The meat proteins that escape the small intestinal digestion seemed to increase
238 with the amount of ingested meat. As this increase was accompanied by a decrease in
239 endogenous protein flow, a progressive overestimation of dietary N was likely to occur with
240 the increase in the amount of ingested ^{15}N , *via* the rapid recycling of N. Consequently, the
241 true ileal digestibility has probably slightly increased with the amount of ingested meat.
242 Nevertheless, in agreement with these results, a study in humans with ileostomies showed that
243 an increase of 60 g of ingested meat does not modify the true ileal digestibility (18). Thus,
244 even with high amount of meat intake, very few meat proteins reached the colon. The main
245 contributors of protein flow at this level of the gastrointestinal tract are of endogenous origin,
246 and the profile of amino acids is not affected by the amount of ingested meat.

247 Proline content at this level is high, but variable, probably in relation to individual variations
248 in secretions of endogenous molecules, such as protein-rich peptides and mucines. In
249 conclusion, the digestibility in the small intestine of meat proteins is high, and whatever the
250 cooking temperature and the level of intake, meat protein residues entering the colon are low.
251 This study showed that the speed of protein digestion, a parameter of increasing interest in
252 nutrition, can be modulated by meat preparation, a slower digestion being observed with high
253 cooking temperature. Supplier of bioactive compounds, such as carnosine and coenzyme Q₁₀,
254 and of well-balanced amino acids that are rapidly and highly bioavailable, meat is an
255 interesting source of proteins for subjects in whom muscle metabolism is targeted, such as
256 elderly and sportsmen.

257

258 **Acknowledgments**

259 The authors are grateful to the French Research National Agency (ANR-09-ALIA-008-01
260 Program PRONUTRIAL (2010-2013)), the European fund for regional development
261 (FEDER), and the Auvergne regional council for their financial supports.

262

263 **Abbreviations**

264 N, Nitrogen; IAA, Indispensable Amino Acids; C_{base}, basal concentration in IAA; IC_{max},
265 maximal increase in IAA concentration; tIC_{max}, time at which IC_{max} is observed; AUC,
266 area under the curve; AID, Apparent Ileal Digestibility; TID, True Ileal Digestibility; CT°,
267 Cooking Temperature.

Literature Cited

1. Dangin M, Guillet C, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Bouteloup-Demange C, Reiffers-Magnani K, Fauquant J, Ballevre O, Beaufrere B. The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *Journal of Physiology-London*. 2003; 549 : 635-644.
DOI : 10.1113/jphysiol.2002.036897
2. Bos C, Juillet B, Fouillet H, Turlan L, Daré S, Luengo C, N'tounda R, Benamouzig R, Gausserès N, Tomé D, Gaudichon C. Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81 : 87-94.
3. Bos C, Airinei G, Mariotti F, Benamouzig R, Bérot S, Evrard J, Fénart E, Tomé D, Gaudichon C. The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137 : 594-600.
4. Gaudichon C, Bos C, Morens C, Petzke KJ, Mariotti F, Everwand J, Benamouzig R, Daré S, Tomé D, Metges CC. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology*. 2002; 123 : 50-59.
DOI : 10.1053/gast.2002.34233
5. Mariotti F, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Daré S, Gaudichon C, Tomé D. Nutritional value of [¹⁵N]-soy protein isolate assessed from ileal digestibility and postprandial protein utilization in humans. *The Journal of Nutrition*. 1999; 129 : 1992-1997.
6. Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, Bérot S, Benamouzig R, Mahé S. The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. *The Journal of Nutrition*. 2001; 131 : 1706-1713.
7. Young VR, Fajardo L, Murray E, Rand WM, Scrimshaw NS. Protein requirements of man - Comparative nitrogen-balance response within submaintenance to maintenance range of intakes of wheat and beef proteins. *J Nutr*. 1975; 105 : 534-542.
8. Wayler A, Queiroz E, Scrimshaw NS, Steinke FH, Rand WM, Young VR. Nitrogen-balance studies in young men to assess the protein-Quality of an isolated soy protein in relation to meat proteins. *J Nutr*. 1983; 113 : 2485-2491.
9. Symons TB, Sheffield-Moore M, Wolfe RR, Paddon-Jones D. A moderate serving of high-quality protein maximally stimulates skeletal muscle protein synthesis in young and elderly subjects. *Journal of the American Dietetic Association*. 2009; 109 : 1582-1586.
DOI : 10.1016/j.jada.2009.06.369
10. Bauchart C, Savary-Auzeloux I, Mirand PP, Thomas E, Morzel M, Rémond D. Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. *J Nutr*. 2007; 137 : 589-593.
11. Park YJ, Volpe SL, Decker EA. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53 : 4736-4739.
DOI : 10.1021/jf047934h

12. Bauchart C, Morzel M, Chambon C, Mirand PP, Reynes C, Buffiere C, Rémond D. Peptides reproducibly released by *in vivo* digestion of beef meat and trout flesh in pigs. *British Journal of Nutrition*. 2007; 98 : 1187-1195.
13. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer : A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*. 2008; 60 : 131-144.
DOI : 10.1080/01635580701684872
14. Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence : Meta-analysis of prospective studies. *PLOS ONE*. 2011; 6 :
DOI : 10.1371/journal.pone.0020456
15. Alexander DD, Cushing CA. Red meat and colorectal cancer : a critical summary of prospective epidemiologic studies. *Obesity Reviews*. 2010; 12 : e472-e493.
DOI : 10.1111/j.1467-789X.2010.00785.x
16. Tabatabaei SM, Fritschi L, Knuiaman MW, Boyle T, Iacopetta BJ, Platell C, Heyworth JS. Meat consumption and cooking practices and the risk of colorectal cancer. *Eur J Clin Nutr*. 2011; 65 : 668-675.
17. Rémond D, Machebeuf M, Yven C, Buffière C, Mioche L, Mosoni L, Mirand PP. Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85 : 1286-1292.
18. Silvester KR, Cummings JH. Does digestibility of meat protein help explain large-bowel cancer risk. *Nutrition and Cancer-An International Journal*. 1995; 24 : 279-288.
19. Bax ML, Aubry L, Ferreira C, Daudin JD, Gatellier P, Rémond D, Santé-Lhoutellier V. Cooking temperature is a key determinant of *in vitro* meat protein digestion rate : Investigation of underlying mechanisms. *J Agric Food Chem*. 2012; 60 : 2569-2576.
DOI : 10.1021/jf205280y
20. Rémond D, Buffière C, Godin JP, Mirand PP, Obled C, Papet I, Dardevet D, Williamson G, Breuillé D, Faure M. Intestinal inflammation increases gastrointestinal threonine uptake and mucin synthesis in enterally fed minipigs. *The Journal of Nutrition*. 2009; 139 : 720-726.
DOI : 10.3945/jn.108.101675
21. de Vrese M, Frik R, Roos N, Hagemester H. Protein-bound D-amino acids, and to a lesser extent lysinoalanine, decrease true ileal protein digestibility in minipigs as determined with N-15-labeling. *J Nutr*. 2000; 130 : 2026-2031.
22. Gausserès N, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Ferriere F, Rautureau J, Tomé D. [¹⁵N]-labeled pea flour protein nitrogen exhibits good ileal digestibility and postprandial retention in humans. *The Journal of Nutrition*. 1997; 127 : 1160-1165.
23. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrere B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94 : 14930-14935.

24. Lacroix M, Bos C, Leonil J, Airinei G, Luengo C, Dare S, Benamouzig R, Fouillet H, Fauquant J, Tomé D, Gaudichon C. Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006; 84 : 1070-1079.
25. West DW, Burd NA, Coffey VG, Baker SK, Burke LM, Hawley JA, Moore DR, Stellingwerff T, Phillips SM. Rapid aminoacidemia enhances myofibrillar protein synthesis and anabolic intramuscular signaling responses after resistance exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011; 94 : 795-803.
DOI : 10.3945/ajcn.111.013722.
26. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer : a global perspective. 2007;
27. Bingham SA, Hughes R, Cross AJ. Effect of white versus red Meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *The Journal of Nutrition*. 2002; 132 : 3522S-3525S.
28. Magee EA, Richardson CJ, Hughes R, Cummings JH. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine : an *in vitro* and a controlled feeding study in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000; 72 : 1488-1494.
29. Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K, Tasman-Jones C. Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *British Journal of Nutrition*. 1994; 71 : 29-42.
DOI : <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19940108>
30. Hess V, Ganier P, Thibault JN, Seve B. Comparison of the isotope dilution method for determination of the ileal endogenous amino acid losses with labelled diet and labelled pigs. *British Journal of Nutrition*. 2000; 83 : 123-130.
DOI : <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114500000167>
31. Leterme P, Thewis A, Francois E, VanLeeuwen P, Wathélet B, Huisman J. The use of N-15-labeled dietary proteins for determining true ileal amino acid digestibilities is limited by their rapid recycling in the endogenous secretions of pigs. *J Nutr*. 1996; 126 : 2188-2198.
32. Schmitz M, Hagemeister H, Erbersdobler HF. Homoarginine labeling is suitable for determination of protein absorption in miniature pigs. *The Journal of Nutrition*. 1991; 121 : 1575-1580.

Table 1 Effect of meat cooking temperature on the kinetics of indispensable amino acids (IAA) concentration in the plasma of minipigs, after a meat meal¹

Item ³	Meat cooking temperature			ANOVA ²
	60°C	75°C	95°C	<i>P</i>
Cbase, mM	975 ± 59	1015 ± 42	1008 ± 25	0.817
ICmax, mM	816 ± 61	912 ± 147	873 ± 155	0.622
tICmax, min	162 ± 35	165 ± 62	290 ± 24	0.113
AUC _{150 min}	517 ^b ± 78	706 ^a ± 106	420 ^b ± 60	0.021
AUC _{360 min}	477 ± 21	521 ± 123	499 ± 51	0.894

¹ values are means ± SEM, n = 6

² Data were analyzed by ANOVA with minipigs and meat cooking temperatures as main factors.

³ Cbase = basal concentration in IAA; ICmax = maximal increase in IAA concentration; tICmax = time at which ICmax is observed; AUC = area under the curve (trapezoidal method) for the increase in IAA concentration over 150 or 360 min.

Table 2 Effect of meat cooking temperature on nitrogen flux at the ileum¹

	Meat cooking temperature			ANOVA ²
	60°C	75°C	95°C	<i>P</i>
Intake, g N	4.96	4.58	4.64	
Ileal digesta				
Total N, g	1.40 ± 0.12	1.20 ± 0.09	1.58 ± 0.19	0.094
dietary N, g	0.26 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.131
endogenous N, g	1.14 ± 0.11	1.03 ± 0.10	1.35 ± 0.20	0.151
Apparent ileal digestibility, %	72.7 ± 2.3	73.8 ± 1.9	66.2 ± 4.0	0.098
True ileal digestibility, %	94.7 ± 0.5	96.2 ± 0.4	95.2 ± 0.7	0.299

¹ values are means ± SEM, n = 6

² Data were analyzed by ANOVA with minipigs and meat cooking temperatures as main factors.

Table 3 Effect of the amount of ingested meat on nitrogen flux at the ileum¹

	Meat intake			ANOVA ²
	65 g	100 g	135 g	<i>P</i>
Intake, g N	3.42	5.13	6.83	
Ileal digesta				
Total N, g	1.72 ± 0.17	1.60 ± 0.16	1.40 ± 0.10	0.411
dietary N, g	0.18 ± 0.03 ^b	0.23 ± 0.02 ^b	0.32 ± 0.03 ^a	0.017
endogenous N, g	1.54 ± 0.17	1.36 ± 0.19	1.08 ± 0.07	0.176
Apparent ileal digestibility, %	49.6 ± 5.0 ^b	68.7 ± 3.2 ^a	79.7 ± 1.4 ^a	0.001
True ileal digestibility, %	94.7 ± 0.5	96.2 ± 0.5	95.2 ± 0.8	0.528

¹ values are means ± SEM, n = 6

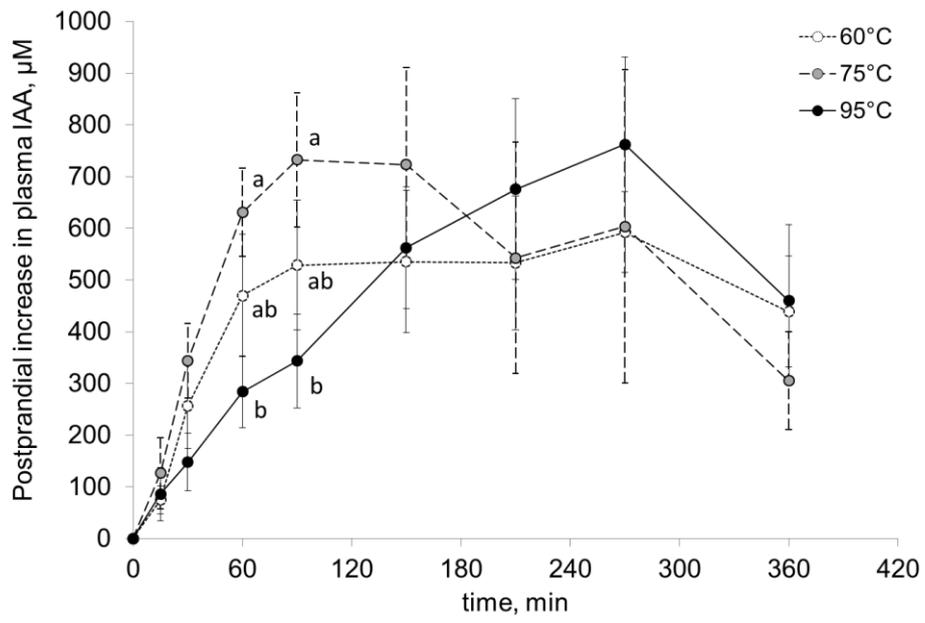
² Data were analyzed by ANOVA with minipigs and amounts of ingested meat as main factors.

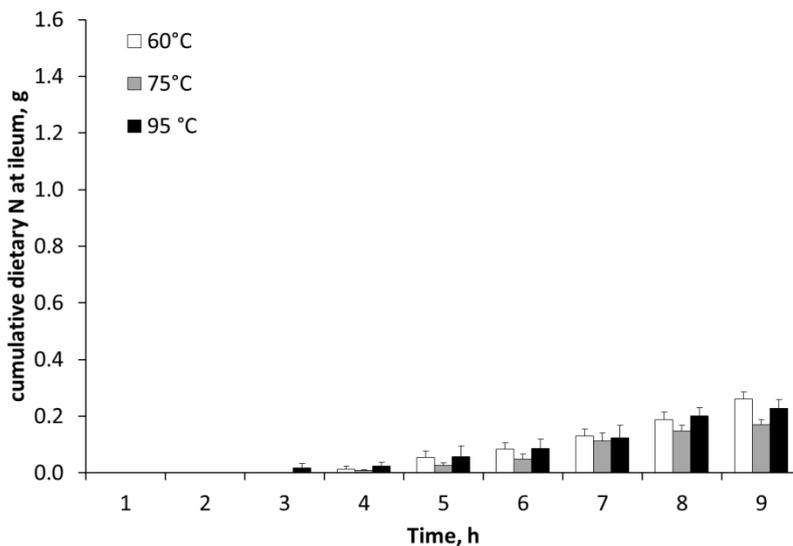
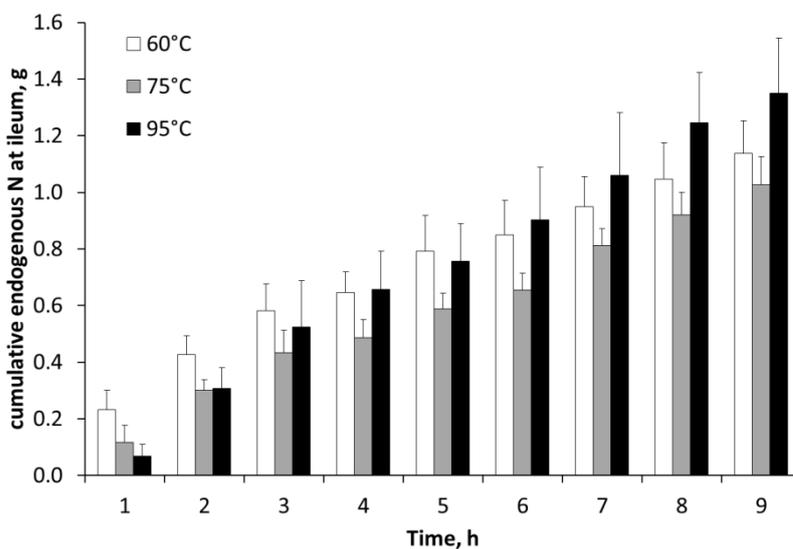
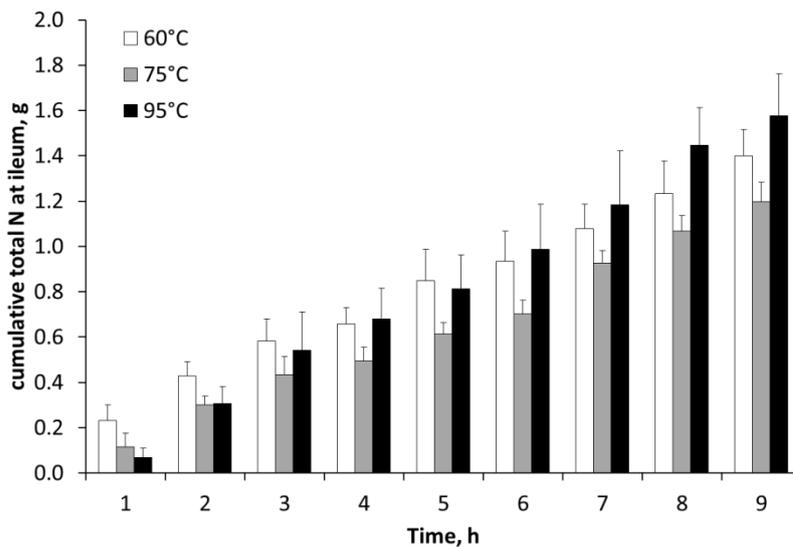
Figure 1 Effect of meat cooking temperature on the kinetics of plasma indispensable amino acids (IAA) of minipigs, after a meat meal. Values are means \pm SEM. Data were analyzed by a mixed-model ANOVA with time as a repeated factor. Test meal effect over the first 150 min was significant ($P = 0.0328$). Means at a time without a common letter differ ($P < 0.05$).

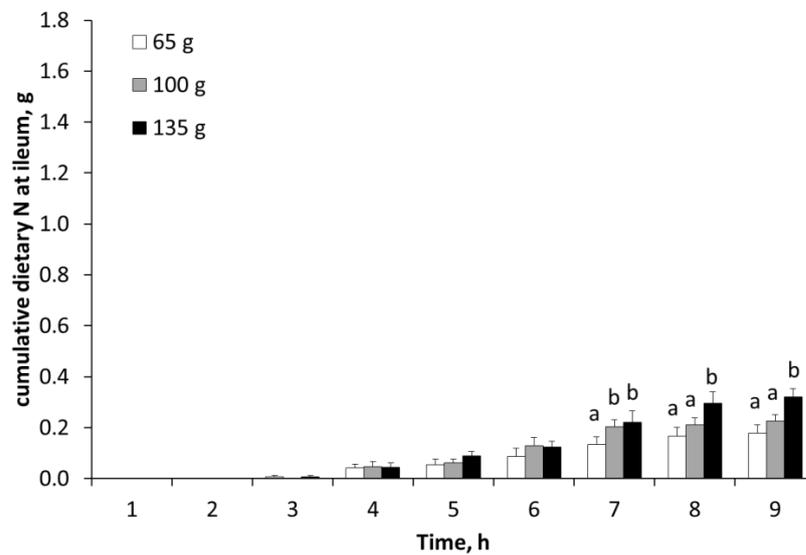
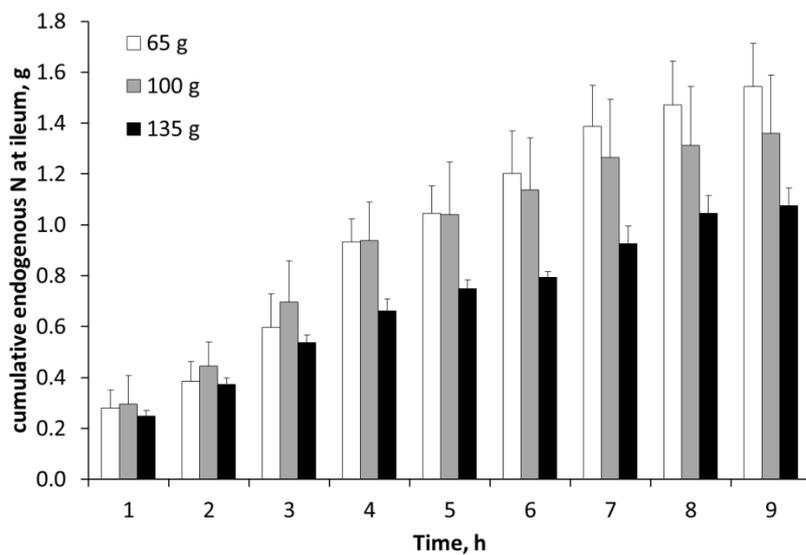
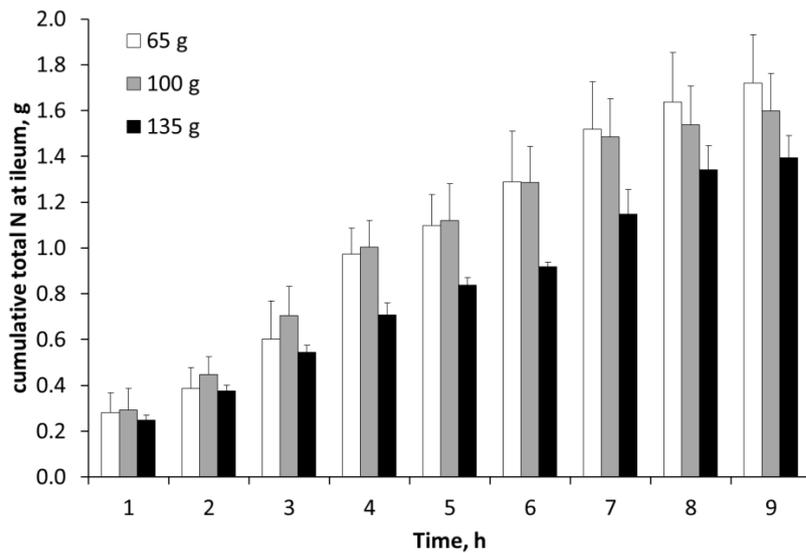
Supplemental Figure 1 Effect of meat cooking temperature on the kinetics of cumulative flux of nitrogen (total, endogenous and dietary N) at the ileum of minipigs, after a meat meal. Values are means \pm SEM. Data were analyzed by a mixed-model ANOVA with time as repeated factor. No interaction was observed between cooking temperature and time after the meal ($P > 0.10$).

Supplemental Figure 2 Effect of the amount of ingested meat on the kinetics of cumulative flux of nitrogen (total, endogenous and dietary N) at the ileum of minipigs, after a meat meal. Values are means \pm SEM. Data were analyzed by a mixed-model ANOVA with time as a repeated factor. Test meal \times time interaction was significant for dietary N ($P = 0.0314$). Means at a time without a common letter differ ($P < 0.05$).

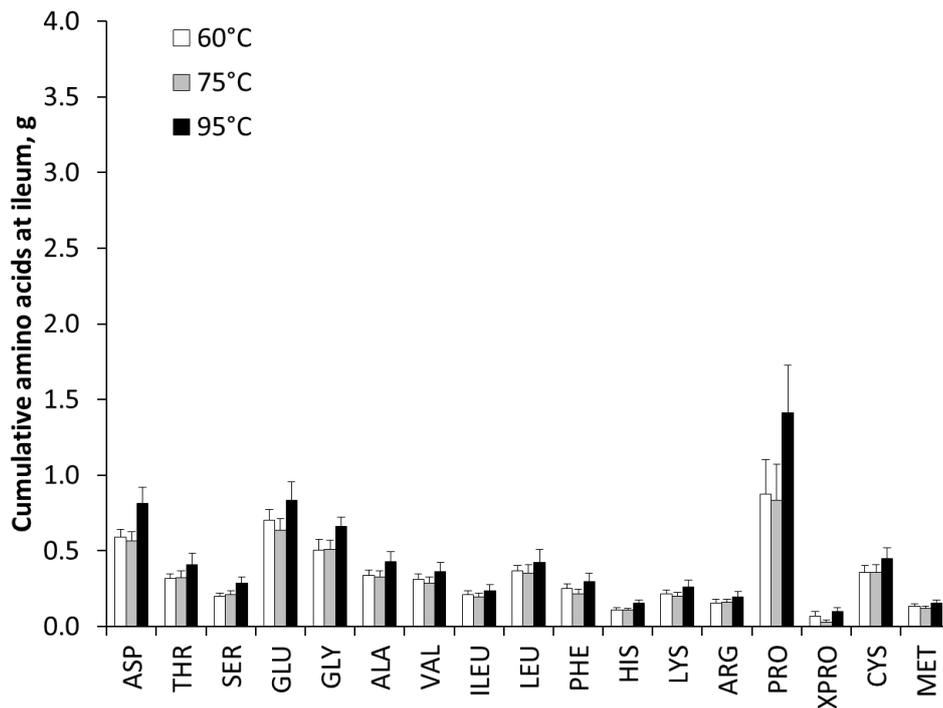
Supplemental Figure 3 Effect of meat cooking temperature (A), and amount of ingested meat (B), on the kinetics of cumulative flux of amino acids at the ileum of minipigs, after a meat meal. Values are means \pm SEM. Data were analyzed by a mixed-model ANOVA with time as a repeated factor. No interaction was observed between cooking temperature and time after the meal ($P > 0.10$).



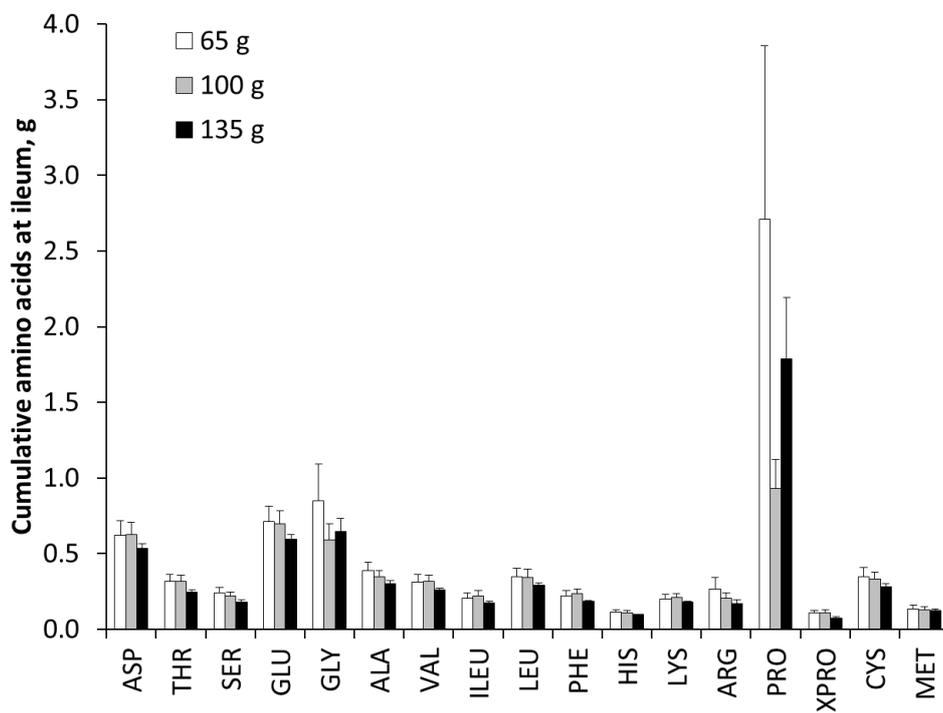




A



B



Conclusion de cette partie *in vivo*

Une des originalités de notre approche reposait sur l'utilisation, pour la première fois, de viande intrinsèquement marquée avec un isotope stable, pour mesurer la digestibilité réelle. Ce marquage permet de distinguer les flux d'azote issus de l'aliment de ceux issus des sécrétions endogènes. Nous avons observé que la digestibilité réelle des protéines de la viande dans l'intestin grêle du miniporc est très proche (95% vs 94%) de celle observé chez l'Homme iléostomisé (Silvester et Cummings, 1995), et nous avons pu montrer qu'elle n'est affectée ni par la température de cuisson, ni par la quantité de viande ingérée. L'étude *in vitro* suggérait une augmentation du potentiel de dégradation dans l'intestin grêle avec la température de cuisson, il semble donc que le paramètre de dégradation maximale mesuré *in vitro*, ne puisse pas être utilisé comme critère de prédiction de la digestibilité *in vivo*.

En ce qui concerne la vitesse de digestion, paramètre influençant l'anabolisme protéique postprandial, nous avons pu montrer qu'avec une température de cuisson de la viande de 75°C la digestion est plus rapide qu'avec des températures de 60 ou 95°C. Si on regarde le classement des vitesses de digestion en fonction de la température, on retrouve des résultats proches de ceux observés *in vitro*, pour lesquels on observait une augmentation de la vitesse de digestion entre la viande crue et la viande cuite à 70°C, puis une diminution pour des températures élevées (>100°C). Il semble ainsi que le dispositif *in vitro* développé ici soit bien adapté pour prédire la vitesse de digestion *in vivo*. Il faut cependant souligner que, dans nos mesures *in vivo*, la viande a été donnée aux miniporcs après hachage, ce qui a probablement limité les interactions de la mastication avec le temps de séjour dans l'estomac.

En conclusion, bien que la viande soit globalement une source de protéines rapidement digérées, la température de cuisson peut constituer un levier intéressant pour optimiser ce paramètre en fonction de la population ciblée. Pour les personnes âgées ou les sportifs, il semble par exemple qu'une température de 70-75°C permettent d'obtenir les vitesses de digestion les plus élevées, et sont donc plus favorables pour soutenir l'anabolisme protéique postprandial. De plus, quelle que soit la température de cuisson, la digestibilité des protéines de la viande dans l'intestin grêle est très élevée, la biodisponibilité des acides aminés est donc excellente, et surtout, les résidus protéiques entrant dans le côlon étant faibles, il semble peu probable que les

protéines soient impliquées dans la potentielle relation entre l'ingestion de viande et le cancer colorectal.

Pour conforter ces résultats, des études chez l'Homme sont actuellement en cours.

Discussion Générale

Discussion Générale

En France, la consommation de viande représente 1/3 des apports protéiques totaux. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, les protéines carnées apportent tous les acides aminés indispensables, en quantité équilibrée par rapport aux besoins de l'Homme. La viande est également une bonne source de vitamines et de minéraux, notamment de vitamine B12 et de fer. Le potentiel nutritionnel des protéines carnées est très élevé, il peut être modulé de deux manières : 1) par une digestion des protéines plus ou moins complète dans l'intestin grêle (digestibilité), déterminant la quantité d'acides aminés absorbés et 2) par une vitesse de digestion plus ou moins élevée, influençant la capacité d'assimilation des acides aminés absorbés. Nous avons voulu tester dans ce projet de thèse les conditions qui étaient susceptibles de modifier ce potentiel, en vue d'optimiser les procédés technologiques appliqués aux viandes.

En règle générale, une ou plusieurs étapes de transformation sont appliquées aux viandes, avant de les consommer. Ces transformations modifient la matière première (le muscle) et contribuent au développement de la qualité sensorielle et technologique des viandes. L'impact sur le potentiel nutritionnel des viandes, tel que décrit plus haut, nécessite donc d'être étudié à la lumière des modifications de la composition et de la structure des matrices carnées, induites par leur transformation. Qu'il s'agisse de réactions d'oxydation, de dénaturation, d'interactions avec d'autres macromolécules, il est nécessaire de définir leur impact sur le degré d'accessibilité des enzymes digestives à leur site de coupure à l'intérieur des protéines. L'objectif est, ensuite, de proposer les traitements permettant de favoriser une digestion la plus complète possible avec une vitesse promouvant la synthèse protéique postprandiale. A ce jour l'ampleur et la nature des modifications ne sont pas vraiment connues. De plus, le rôle et l'impact des opérations unitaires de transformation sur le potentiel nutritionnel restent peu étudiés.

Dans les études qui se sont précédemment intéressées aux effets des traitements technologiques sur la digestion des protéines de la viande, des dispositifs *in vitro* ont généralement été utilisés (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008; Filgueras *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011). Dans ces études, l'évaluation de la capacité des enzymes digestives à digérer les protéines s'est généralement limitée à une mesure sur un temps fixe, sans tenir compte de la cinétique de digestion. Gatellier et Santé-Lhoutellier (2009) ont déterminé 2 paramètres pour caractériser la digestion *in vitro* : le maximum d'absorbance et le temps de demi-vie.

Dans le même esprit que ces travaux, nous avons développé un modèle de digestion *in vitro* (pepsine seule ou couplée à la trypsine/ α -chymotrypsine) appliqué aux protéines myofibrillaires extraites, ces protéines représentent la fraction majoritaire des protéines du tissu musculaire. En utilisant un ajustement mathématique des cinétiques de digestion, nous avons pu déterminer deux nouveaux paramètres : la vitesse maximale et le temps d'obtention de cette vitesse maximale. Ces paramètres ont permis de caractériser et de comparer les effets de différents traitements (maturation, cuisson, hachage) sur la cinétique de digestion.

Parmi les procédés technologiques appliqués aux viandes, la **maturation**, dont la durée est variable en fonction de l'espèce (de quelques jours à une quinzaine de jours), est incontournable. Cette étape contribue à l'élaboration des qualités sensorielles des viandes importantes pour le consommateur à savoir, la tendreté, la jutosité et la flaveur, spécifiques du produit.

Notre première étude, sur de la viande de porc, a permis de mettre en évidence un début des processus d'oxydation, aussi bien des lipides que des protéines, au bout de 4 jours de maturation. Cela montre que, malgré la présence d'antioxydants résiduels dans le muscle après l'abattage, soit l'efficacité antioxydante diminue, mais dans notre cas les concentrations en antioxydants ne diminuent pas durant la maturation, soit les enzymes n'ont plus les capacités suffisantes pour lutter contre l'afflux d'espèces réactives et notamment en absence d'ATP. Au niveau structural, il est observé aussi une agrégation des particules qui s'est traduite par une augmentation de leur circularité et du ratio Feret. Nous avons également observé une augmentation du nombre de particules, cela suggère un début de dégradation des protéines suite aux réactions de protéolyse *post mortem*. La tendreté de la viande est fonction du pH *post mortem* qui va influencer la protéolyse par les calpaïnes. Ces dernières ont besoin de calcium pour fonctionner et dégrader les protéines myofibrillaires. Elles vont ainsi puiser le calcium stocké dans les réserves musculaires et enclencher le phénomène d'attendrissage (Huff-Lonergan *et al.*, 2010). Cette protéolyse tend à diminuer la capacité de digestion *in vitro* des protéines myofibrillaires par la pepsine. Son impact s'est cependant limité à l'étape gastrique, la digestion complète (pepsine couplée à la trypsine/ α -chymotrypsine) est sans effet. La maturation a donc un effet sur la digestion, mais qui reste toutefois assez limitée. Du point de vue de l'enzymologie, l'activité enzymatique dépend à la fois du rapport enzyme/substrat mais aussi des conditions environnementales et donc de la température.

Les protéases endogènes du tissu musculaire doivent fonctionner pendant la phase de maturation à une température faible, inférieure à 4°C ce qui ne favorise pas leur activité. Par contre pendant la maturation, des phénomènes oxydatifs s'intensifient car les systèmes antioxydants s'altèrent mais surtout car une recrudescence d'agents prooxydants est observée. A titre d'exemple, la ferritine, protéine capable de chélater plus de 4500 atomes de fer perd ses charges négatives avec l'abaissement du pH *post mortem* et relargage alors le fer. Il serait intéressant de voir si des durées plus longues de maturation, telles que celles appliquées chez le bovin, influencent aussi les paramètres de digestion, et plus particulièrement au niveau de la phase gastrique. Pour cela il serait nécessaire de suivre les modifications biochimiques à différents temps de maturation et de vérifier si le type de muscle et l'espèce peuvent être des éléments influençant l'effet de la maturation sur les paramètres de la digestion.

La **cuisson** est probablement le traitement technologique qui influence le plus la digestion des protéines. A l'aide de notre dispositif *in vitro*, nous avons évalué l'effet d'une élévation de la température de cuisson, de 70 à 140°C. Cette gamme de température très large permettait de mimer l'effet d'une cuisson allant du type jambon, au type grillade « extrême ». L'application de ces températures a mis en évidence une dénaturation des protéines dès 70°C suivie des phénomènes d'oxydation pour les températures de 100 et 140°C. La combinaison de ces modifications se caractérise par l'apparition d'agrégats des protéines carnées, avec une augmentation de la circularité des particules et une réduction de leur nombre. La vitesse de digestion était supérieure à 70°C par rapport à la viande crue et pour des températures de cuisson de 100 à 140°C.

Par contre, le potentiel de dégradation maximale était plus élevé pour des températures supérieures à 100°C. La mise en relation des caractéristiques de la viande, avec les paramètres de digestion, suggère que pour des températures de cuisson de l'ordre de 70°C, la dénaturation des protéines favorise une digestion rapide en accroissant l'accessibilité des sites de coupure pour les enzymes digestives, mais que pour des températures supérieures, l'oxydation conduit à des agrégats qui limitent cette accessibilité. Cette hypothèse sur les mécanismes explicatifs de l'effet de la température de cuisson sur la digestion des protéines de la viande a été construite sur la base d'observations réalisées sur des protéines myofibrillaires isolées en suspension.

Afin d'améliorer la capacité de prédiction du modèle de digestion, il serait nécessaire de complexifier le modèle en travaillant sur un morceau de viande « plus » structuré.

Cela permettrait de prendre en compte la matrice extracellulaire contenant du collagène dont la digestibilité pourrait être différemment affectée par la température de cuisson. Pour cela, il faudrait notamment ajouter de l'élastase, enzyme intestinale dégradant le collagène. A l'heure actuelle, des travaux similaires sont en cours sur le bovin dans le cadre du projet ANR Pronutrial et pourront donner des éléments de réponse.

Le **hachage** est un procédé qui a pour but de déstructurer le produit et pour conséquence d'augmenter la surface d'échanges entre le produit et l'air. Il pourrait ainsi favoriser les phénomènes d'oxydation. En ce qui concerne les conditions de hachage, nous avons réalisé un hachage de 8 mm de diamètre ce qui équivaut à un hachage de type steak haché, après 24 h passé à 4°C sous film perméable. La viande a ensuite été cuite à 70 ou 140°C. Les résultats ont montré que, contrairement à notre attente, cela n'avait pas eu d'influence sur les phénomènes d'oxydation ou de dénaturation. Deux raisons possibles à cette absence d'effets, soit la cuisson a masqué totalement les différences, soit la durée de stockage de 24 h n'est pas suffisante pour enclencher des modifications détectables avec nos méthodes de mesure. Cependant, l'analyse granulométrique a permis de mettre en évidence une augmentation de la sphéricité (circularité et ratio Feret) des particules avec le hachage. Cette agrégation des particules, pouvant être dues à la mise en place de nouvelles interactions non covalentes comme des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques, hydrophobes,... a pour conséquence de réduire la vitesse de digestion *in vitro*, notamment pour une température de cuisson de 70°C. Là encore, ces observations ont été obtenues sur des myofibrilles isolées, et ne tiennent pas compte du principal effet du hachage qui est la déstructuration de la viande. Une approche similaire en utilisant directement des morceaux de viande hachée ou non, dans le dispositif *in vitro* permettrait d'appréhender l'effet du hachage dans sa globalité.

Si l'on essaie de hiérarchiser les 3 procédés testés, il est clair que chacun participe aux modifications physicochimiques des protéines. La phase de maturation commence à mettre en évidence des phénomènes d'oxydations, qui ont pour conséquence une réduction de la vitesse de digestion et du potentiel maximal de digestion par la pepsine, sans effet sur l'étape suivante de digestion par les enzymes pancréatiques. La cuisson possède un rôle prédominant dans les modifications des protéines.

En fonction de la température, deux phénomènes vont être déterminants : la dénaturation, augmentant l'accessibilité des protéases à leurs sites d'action, et l'agrégation, résultant des processus d'oxydation, qui vont masquer ces sites.

A 70°C le phénomène de dénaturation prédomine, alors qu'au-delà de 100°C, c'est l'agrégation qui prédomine. Ainsi, la vitesse de dégradation maximale optimale est observée pour une température de 70°C. C'est vrai pour la digestion avec la pepsine mais également pour la digestion avec les enzymes pancréatiques. L'action potentiellement prooxydante du hachage, semble avoir un effet mineur sur la digestion.

Nos travaux montrent que l'agrégation des particules est un point clé dans la détermination des vitesses de digestion *in vitro* des protéines. La méthode de caractérisation de l'agrégation que nous avons utilisée apporte des informations sur le nombre et la forme des particules en solution, l'utilisation et/ou le couplage avec d'autres méthodes de détection seraient nécessaires pour améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu. Pour cela, la technique de SDS-PAGE ou la SE-HPLC peuvent fournir des indications sur l'intervention ou non de liaisons covalentes dans la formation d'agrégat due à l'oxydation de la cystéine. Il existe différentes techniques de caractérisation des agrégats qui vont informer sur la structure des particules, la méthode du dichroïsme circulaire, la spectroscopie à fluorescence, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la spectroscopie Raman ou encore la spectroscopie par résonance nucléaire magnétique (Mahler *et al.*, 2009; Hillger *et al.*, 2007). Ces méthodes permettent d'accéder à la structure de l'agrégat. Cependant ces techniques sont plus lourdes à mettre en place et à interpréter.

La viande provient du tissu musculaire dont la variabilité en termes de qualités sensorielles et technologiques constitue un verrou scientifique. Fort de cette connaissance, nous avons testé si l'influence de la composition biochimique intrinsèque du muscle pouvait avoir une influence sur les paramètres de digestion *in vitro*, en interaction avec la maturation et la cuisson. Afin de limiter l'effet structure, race et espèce, il a été décidé d'étudier un seul muscle, d'une seule espèce, le porc, et une seule race (Basque). Nous nous sommes intéressés à des différences de composition induites par l'alimentation. L'étude a donc porté sur des muscles issus de porcs élevés soit en intérieur, soit en plein air, et l'analyse protéomique a permis l'obtention d'un screening exhaustif des composés protéiques présents dans les tissus à un temps donné. Dans la littérature, la majorité des études réalisées sur la viande portent sur la fraction sarcoplasmique. Le couplage avec une analyse de la fraction myofibrillaire, nous a permis d'obtenir une comparaison fine et exhaustive des différences d'expression des protéines entre nos deux groupes d'animaux. L'analyse a été réalisée sur des muscles prélevés 24 h après abattage.

Quand on compare les 2 groupes d'animaux, on observe que parmi les protéines qui sont différemment exprimées et identifiées, au niveau de la fraction myofibrillaire, environ un quart correspond à des protéines de structure (actine, myosine), un tiers à des protéines impliquées dans la régulation de l'activité contractile du muscle, et chose surprenante, un tiers à des protéines solubles impliquées dans le métabolisme qui ne devraient pas être retrouvées dans cette fraction et donc démontrent une perte de leur propriété de solubilité. Dans la fraction sarcoplasmique, 70% des protéines exprimées différemment sont des protéines solubles, le reste étant des protéines chaperonnes, de la myoglobine ou autres protéines de diverses fonctions. Les muscles issus de groupe de porcs élevés en plein air ont montré un niveau d'oxydation, tant protéiques que lipidiques, plus important que le groupe élevé en intérieur. Parallèlement nous avons observé au niveau protéomique une surexpression des enzymes antioxydantes ou de détoxification, comme la SOD et la glutathion-S-transférase, ou encore de stress. Ceci pourrait s'expliquer par une activité physique plus importante chez les animaux élevés à l'extérieur ou à la présence de composés oxydants issus de l'alimentation extérieure. Malgré la différence visible au niveau des compositions des muscles, il n'est pas trouvé de réels impacts sur la digestion des protéines surtout après l'application de traitements thermiques. L'étude de corrélation entre les paramètres protéomiques et ceux de la digestion *in vitro* montre cependant qu'il existe des enzymes, notamment impliquées dans la détoxification, ou des protéines impliquées dans la régulation de la contraction, qui pourraient s'avérer être des marqueurs intéressants pour la prédiction de la vitesse de digestion.

En conclusion, dans la première partie de ces travaux, la caractérisation biochimique des viandes, au cours des différentes étapes de la transformation, nous a permis d'élucider les mécanismes responsables des modifications de la capacité de digestion *in vitro* des protéines par les enzymes digestives. Il s'avère que les traitements thermiques possèdent un rôle prédominant et gomme notablement les effets à la fois des autres procédés de transformation comme la maturation, mais aussi les différences au niveau de la composition initiale du produit. Nous avons clairement montré que par rapport à de la viande crue, une cuisson à 70°C permet d'améliorer la vitesse de digestion. Par contre pour une température de 100°C et au-delà, on observe un ralentissement de la vitesse de digestion des protéines. Néanmoins, ces données, obtenues *in vitro* dans des conditions simplifiées et standardisées, s'affranchissent des régulations de la physiologie digestive. Pour conforter nos observations, l'obtention de données *in vivo* était donc nécessaire.

Bien que la viande soit un des principaux vecteurs de protéines de notre alimentation, sa digestion a été peu étudiée dans le cadre de la nutrition humaine. N'entrant pas en tant que telle dans l'alimentation des animaux domestiques, la viande n'a également pas été étudiée dans le cadre des productions animales. Chez l'Homme, on trouve de nombreux travaux sur la digestion de fractions protéiques isolées à partir du lait ou de végétaux (caséine et lactosérum : Mandalari *et al.*, 2009; le haricot : Momma *et al.*, 2007; l'amidon : Kim *et al.*, 2008), mais très peu sur la digestion des protéines alimentaires à l'intérieur de leur matrice naturelle. Il est vrai que contrairement à ces produits, l'extraction des protéines de la viande ne présente aucun intérêt industriel. La digestion des viandes a ainsi été peu explorée, et l'effet des procédés de transformation, comme la cuisson, sur la mise à disposition des acides aminés constitutifs (quantité, cinétique) a été peu étudié.

L'étude expérimentale menée, *in vivo* sur le miniporc, s'est attachée à déterminer les effets de différentes températures de cuisson sur la digestion de viande dans l'intestin grêle. Une des originalités de notre étude a été la production de viande dont les acides aminés ont été uniformément marqués à l'azote 15, pour permettre la distinction de l'aliment et la mesure de la digestibilité réelle dans l'intestin grêle. Pour cette partie, les températures de cuisson à cœur appliquées à la viande ont été 60, 75 et 95°C. Les résultats de cette étude ont permis de confirmer ceux de l'étude *in vitro*, la vitesse d'apparition des acides aminés dans le sang, suite à l'ingestion des viandes étant supérieure pour une température de cuisson à cœur de 75°C, par rapport à des cuissons à 60 ou 95°C. Par contre, contrairement à ce qui était observé *in vitro*, nous avons montré que la température de cuisson n'affecte pas la quantité totale de protéines digérées dans l'intestin grêle (environ 95% des protéines ingérées). *In vivo*, la capacité enzymatique et le temps de séjour dans l'intestin grêle, sont donc toujours suffisants pour compenser d'éventuelles différences de digestion dans l'estomac, et assurer ainsi une dégradation maximale de protéines de la viande avant le côlon. Ainsi, le degré de cuisson de la viande va essentiellement influencer sur l'efficacité de la digestion par la pepsine, conduisant à une sortie de l'estomac et une attaque des protéines par les enzymes pancréatiques plus ou moins rapides, conditionnant la cinétique d'apparition des acides aminés dans le sang.

Dans cette étude, le rôle de la mastication a été volontairement éludé, or des études menées dans l'équipe ont montré que cette dernière avait une influence importante sur la digestion, il serait donc intéressant d'intégrer cet aspect dans de futures expériences.

En conclusion, parmi les opérations unitaires impliquées dans la préparation des viandes, la cuisson semble être celle qui influence le plus la digestion des protéines. L'équilibre entre les processus de dénaturation et d'oxydation des protéines en fonction de la température de cuisson est un point clé dans la détermination de la vitesse de digestion des protéines. Par contre, les compensations au cours des étapes de la digestion font que ces différences de vitesses ne se traduisent pas par des différences de digestibilité dans l'intestin grêle. La température de cuisson semble ainsi être un levier intéressant pour moduler la vitesse de digestion des protéines de la viande sans altérer la biodisponibilité des acides aminés. Cette vitesse de digestion revêt un intérêt particulier dans le cadre de la nutrition des personnes âgées. En effet, les stratégies nutritionnelles développées pour lutter contre la fonte musculaire liée à l'âge s'appuient sur l'utilisation d'aliments riches en protéines rapidement digérées, pour permettre de relancer l'anabolisme protéique postprandial. La viande remplit pleinement ces critères. Cependant, nous avons montré que la vitesse de digestion des protéines peut être modulée par la température de cuisson, et il est probable qu'elle soit également modulée par la texture de la viande en interaction avec la capacité masticatoire du sujet. Des études chez l'Homme sont actuelles en cours pour conforter dans un premier temps l'effet de la température de cuisson. Enfin, il ne faut pas oublier que la viande est consommée au sein de repas plus ou moins complexe, et il sera par la suite intéressant d'étudier l'effet des interactions avec les autres composantes du repas, sur la détermination de la vitesse de digestion des protéines de la viande.

En améliorant notre compréhension des effets des traitements thermiques sur les protéines de la viande, et des conséquences sur leur devenir digestif, ces travaux ouvrent des pistes pour le développement de produits permettant d'optimiser l'apport protéique en fonction des caractéristiques physiopathologiques du consommateur.

Références

&

Annexes

Références

- Abdel-Mohsen, H. A., Nakamoto, M., Kim, J.-B., Nogusa, Y., Gekko, K., Ishioroshi, M. *et al.* (2003). Changes in the properties of porcine myosin during postmortem aging. *Food Science and Technology Research*, *9*, 297-303.
- Aebi, H. (1974). Catalase. In Bergmeyer H.U (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (Second ed., pp. 673-677). New-York: Academic Press.
- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2007). *Apport en protéines: Consommation, qualité, besoins et recommandations*.
- Alexander, D. D. & Cushing, C. A. (2010). Red meat and colorectal cancer: a critical summary of prospective epidemiologic studies. *Obesity Reviews*, *12*, e472-e493.
- Anderson, K. E., Kadlubar, F. F., Kulldorff, M., Harnack, L., Gross, M., Lang, N. P. *et al.* (2005). Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: Associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *14*, 2261-2265.
- Anderson, K. E., Sinha, R., Kulldorff, M., Gross, M., Lang, N. P., Barber, C. *et al.* (2002). Meat intake and cooking techniques: associations with pancreatic cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *506–507*, 225-231.
- Arrigo, A. P. (2005). Chaperons moléculaires et repliement des protéines: L'exemple de certaines protéines de choc thermique. *Médecine Sciences*, *21*, 619-625.
- Ashmore, C. R. & Doerr, L. (1971). Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Experimental Neurology*, *31*, 408-418.
- Astruc, T., Marinova, P., Labas, R., Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2007). Detection and localization of oxidized proteins in muscle cells by fluorescence microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 9554-9558.
- Astruc, T., Gatellier, P., Labas, R., Santé-Lhoutellier, V., & Marinova, P. (2010). Microstructural changes in m. rectus abdominis bovine muscle after heating. *Meat Science*, *85*, 743-751.
- Bacou, F. & Vigneron, P. (1976). Évolution périnatale des voies métaboliques glycolytique et oxydative de divers types de muscles squelettiques du lapin et du poulet. *Ann.Biol.anim.Bioch.Biophys.*, *16*, 675-686.
- Baron, C. P. & Andersen, H. J. (2002). Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 3887-3897.
- Bauchart, C. (2006). *Contribution à l'étude d'oligopeptides (> 5kDa) générés par la préparation et la digestion de deux aliments carnés, la viande bovine et la chair de truite*. Spécialité Nutrition Thèse de doctorat, Clermont-Ferrand.

- Bauchart, C., Rémond, D., Chambon, C., Mirand, P. P., Savary-Auzeloux, I., Reynes, C. *et al.* (2006). Small peptides (< 5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Science*, *74*, 658-666.
- Bauchart, C., Morzel, M., Chambon, C., Mirand, P. P., Reynes, C., Buffiere, C. *et al.* (2007a). Peptides reproducibly released by in vivo digestion of beef meat and trout flesh in pigs. *British Journal of Nutrition*, *98*, 1187-1195.
- Bauchart, C., Savary-Auzeloux, I., Mirand, P. P., Thomas, E., Morzel, M., & Rémond, D. (2007b). Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. *Journal of Nutrition*, *137*, 589-593.
- Bauchart, D., Chantelot, F., and Gandemer, G. (2008). Qualités nutritionnelles de la viande et des abats chez le bovin: Données récentes sur les principaux constituants d'intérêt nutritionnel. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, *43*, 1S29-1S39.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. (4th ed.) Springer.
- Bendall, J. R. (1973). *Post mortem* changes in muscle. In G.H.Bourne (Ed.), *Structure and function of muscle* (pp. 244-309). New York: Academic Press.
- Bennink, M. R. & Ono, K. (1982). Vitamin B12, E and D Content of Raw and Cooked Beef. *Journal of Food Science*, *47*, 1786-1792.
- Bergmeyer, H. U. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. (Second ed.) (vols. 3) New-York: Academic Press. pp1127, 1196, 1238, 1464.
- Bingham, S. A., Hughes, R., & Cross, A. J. (2002). Effect of white versus red Meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *The Journal of Nutrition*, *132*, 3522S-3525S.
- Bjarnadottir, S. G., Hollung, K., Faergestad, E. M., & Veiseth-Kent, E. (2010). Proteome changes in bovine Longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: Shifts in energy status and myofibrillar stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 7408-7414.
- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J. F., & Tomé, D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids*, *33*, 547-562.
- Blanquet-Diot, S., Denis, S., Chalancon, S., Chaira, F., Cardot, J. M., & Alric, M. (2011). Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharmaceutical Research*, 1-10.
- Bodwell, C. E., Satterlee, L. D., & Hackler, L. R. (1980). Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by *in vitro* enzymic digestion methods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *33*, 677-686.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., & Beaufriere, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*, 14930-14935.

- Bos, C., Mahé, S., Gaudichon, C., Benamouzig, R., Gausserès, N., Luengo, C. *et al.* (1999). Assessment of net postprandial protein utilization of N-labelled milk nitrogen in human subjects. *British Journal of Nutrition*, *81*, 221-226.
- Bos, C., Metges, C. C., Gaudichon, C., Petzke, K. J., Pueyo, M. E., Morens, C. *et al.* (2003). Postprandial kinetics of dietary amino acids are the main determinant of their metabolism after soy or milk protein ingestion in humans. *The Journal of Nutrition*, *133*, 1308-1315.
- Bos, C., Juillet, B., Fouillet, H., Turlan, L., Daré, S., Luengo, C. *et al.* (2005). Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*, 87-94.
- Bos, C., Airinei, G., Mariotti, F., Benamouzig, R., Bérot, S., Evrard, J. *et al.* (2007). The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *The Journal of Nutrition*, *137*, 594-600.
- Bottinelli, R. & Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *73*, 195-262.
- Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. (1970). Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of Neurology*, *23*, 369-379.
- Cacciapuoti, F. (2011). Hyper-homocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases? Pathogenetic and therapeutical uncertainties. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, *32*, 82-88.
- Cao, J. J., Johnson, L. K., & Hunt, J. R. (2011). A diet high in meat protein and potential renal acid load increases fractional calcium absorption and urinary calcium excretion without affecting markers of bone resorption or formation in postmenopausal women. *The Journal of Nutrition*, 172-182.
- Carmody, R. N. & Wrangham, R. W. (2009). The energetic significance of cooking. *Journal of Human Evolution*, *57*, 379-391.
- Centre d'Information des Viandes (CIV). (2010). Valeurs Nutritionnelles des viandes: L'essentiel des viandes. Ref Type: Internet Communication
- Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E *et al.* (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *PLOS ONE*, *6*, e20456,1-12.
- Chardigny, J. M. (2008). Acides gras trans et oméga 3 : du bon et du moins bon. *Science et Pseudo-Sciences*, *283*, 24-29.
- Chelh, I., Gatellier, P., & Sante-Lhoutellier, V. (2006). Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Science*, *74*, 681-683.
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M., & Verrez-Bagnis, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in *post mortem* fish and meat muscles. *Food Chemistry*, *101*, 1474-1479.

- Coles, L. T., Moughan, P. J., Awati, A., Darragh, A. J., & Zou, M. L. (2010). Predicted apparent digestion of energy-yielding nutrients differs between the upper and lower digestive tracts in rats and humans. *The Journal of Nutrition*, *140*, 469-476.
- Coudray, C. & Hercberg, S. (2001). Fer. In A.Martin (Ed.), *Apports nutritionnels conseillés pour la population française* (3^{ème} ed., pp. 150-155). Paris: Tec et Doc.
- Cowin, I., Emond, A., & Emmett, P. (2001). Association between composition of the diet and haemoglobin and ferritin levels in 18-month-old children. *European Journal of Clinical Nutrition*, *55*, 278-286.
- Cross, A. J., Pollock, J. R. A., & Bingham, S. A. (2003). Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-Nitrosation arising from red meat. *Cancer Research*, *63*, 2358-2360.
- Dai, Q., Shu, X. o., Jin, F., Gao, Y. T., Ruan, Z. X., & Zheng, W. (2002). Consumption of animal foods, cooking methods, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *11*, 801-808.
- Dalrymple, R. H. & Hamm, R. (1973). A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *International Journal of Food Science & Technology*, *8*, 439-444.
- Dangin, M., Guillet, C., Garcia-Rodenas, C., Gachon, P., Bouteloup-Demange, C., Reiffers-Magnani, K. *et al.* (2003). The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *Journal of Physiology-London*, *549*, 635-644.
- Dardevet, D., Sornet, C., Balage, M., & Grizard, J. (2000). Stimulation of *in vitro* rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *The Journal of Nutrition*, *130*, 2630-2635.
- Darragh, A. J. & Hodgkinson, S. M. (2000). Quantifying the digestibility of dietary protein. *The Journal of Nutrition*, *130*, 1850S-1856S.
- Davies, K. J. A., Delsignore, M. E., & Lin, S. W. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals .2. Modification of amino-acids. *Journal of Biological Chemistry*, *262*, 9902-9907.
- Davies, K. J. A. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1703*, 93-109.
- de Lange, C. F., Souffrant, W. B., & Sauer, W. C. (1990). Real ileal protein and amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs as determined with the 15N-isotope dilution technique. *Journal of Animal Science*, *68*, 409-418.
- de Vrese, M., Frik, R., Roos, N., & Hagemester, H. (2000). Protein-bound D-amino acids, and to a lesser extent lysinoalanine, decrease true ileal protein digestibility in minipigs as determined with N-15-labeling. *Journal of Nutrition*, *130*, 2026-2031.
- Deglaire, A. (2008). *Flux de protéines endogènes dans l'intestin et métabolisme postprandial des acides aminés alimentaires chez les mammifères monogastriques et chez l'Homme*. Spécialité: Nutrition Humaine, Thèse de doctorat. Paris.

- Deglaire, A., Bos, C., Tomé, D., & Moughan, P. J. (2009). Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *British Journal of Nutrition*, *102*, 1752-1759.
- DeSesso, J. M. & Jacobson, C. F. (2001). Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*, *39*, 209-228.
- Donkoh, A., Moughan, P. J., & Smith, W. C. (1994). True ileal digestibility of amino acids in meat and bone meal for the growing pig-application of a routine rat digestibility assay. *Animal Feed Science and Technology*, *49*, 73-86.
- Durand, D., Gatellier, P. & Santé-Lhoutellier, V. (2010). Stabilité oxydative et qualités des viandes. In INRA (Ed.), *Muscle et viande de ruminant* (QUAE Synthèse ed., pp. 183-196). Versailles: Bauchart D. & Picard B.
- Edelbroek, M., Horowitz, M., Maddox, A., & Bellen, J. (1992). Gastric emptying and intragastric distribution of oil in the presence of a liquid or a solid meal. *The Journal of Nuclear Medicine*, *33*, 1283-1290.
- Ehrlein, H. & Stockmann, A. (1998). Absorption of nutrients is only slightly reduced by supplementing enteral formulas with viscous fiber in miniature pigs. *The Journal of Nutrition*, *128*, 2446-2455.
- Estévez, M., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in food proteins using Liquid Chromatography (LC)–Electrospray Ionization (ESI)–Multistage Tandem Mass Spectrometry (MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 3901-3910.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, *89*, 259-279.
- Evenepoel, P., Geypens, B., Luybaerts, A., Hiele, M., Ghoo, Y., & Rutgeerts, P. (1998). Digestibility of cooked and raw egg protein in humans as assessed by stable isotope techniques. *The Journal of Nutrition*, *128*, 1716-1722.
- Farrell, J. H. (1956). The effect of mastication on the digestion of food. *British Dental Journal*, *100*, 149-155.
- Fenton, T., Lyon, A., Eliasziw, M., Tough, S., & Hanley, D. (2009). Phosphate decreases urine calcium and increases calcium balance: A meta-analysis of the osteoporosis acid-ash diet hypothesis. *Nutrition Journal*, *8*, 1-15.
- Filgueras, R. S., Gatellier, P., Aubry, L., Thomas, A., Bauchart, D., Durand, D. *et al.* (2010). Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air- and vacuum-packaged storage: Influence of muscle on oxidative processes. *Meat Science*, *86*, 665-673.
- Forsum, E., Goranzon, H., & Thilen, M. (1982). Protein evaluation of mixed diets in young adults, growing pigs, and growing rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *36*, 505-513.
- Frassetto, L. A., Todd, K. M., Morris, R. C., & Sebastian, A. (2000). Worldwide incidence of hip fracture in elderly women. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *55*, M585-M592.

- Fuller, M. F. & Reeds, P. J. (1998). Nitrogen cycling in the gut. *Annual Review of Nutrition*, *18*, 385-411.
- Fuller, M. F. & Tome, D. (2005). *In vivo* determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. *Journal of AOAC International*, *88*, 923-934.
- Galan, P., Yoon, H.-C., Preziosi, P., Viteri, F., Valeix, P., Fieux, B. *et al.* (1998). Determining factors in the iron status of adult women in the SU.VI.MAX study. *European Journal of Clinical Nutrition*, *52*, 383-388.
- Gatellier, P., Mercier, Y., & Renner, M. (2004). Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. *Meat Science*, *67*, 385-394.
- Gatellier, P. & Santé-Lhoutellier, V. (2009). Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat Science*, *81*, 405-409.
- Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S., & Santé-Lhoutellier, V. (2010a). Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. *Meat Science*, *85*, 645-650.
- Gatellier, P. & Santé-Lhoutellier, V. (2010b). Cuisson et sensibilité à la peroxydation des viandes. In INRA (Ed.), *Muscle et viande de ruminant* (QUAE Synthèse ed., pp. 197-207). Versailles: Bauchart D. & Picard B.
- Gaudichon, C., Laurent, C., Mahé, S., Marks, L., Tomé, D., & Krempf, M. (1994). Rate of [15N]leucine incorporation and determination of nitrogenous fractions from gastro-jejunal secretion in fasting humans. *Reproduction Nutrition Development*, *34*, 349-359.
- Gaudichon, C., Mahé, S., Luengo, C., Laurent, C., Meugeais, P., Krempf, M. *et al.* (1996). A 15N-leucine-dilution method to measure endogenous contribution to luminal nitrogen in the human upper jejunum. *European Journal of Clinical Nutrition*, *50*, 261-268.
- Glover, J. R. & Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, *94*, 73-82.
- Gobert, M. (2010). *Prévention de la peroxydation des acides gras polyinsaturés par des antioxydants alimentaires chez le bovin en production*. Spécialités : Nutrition-Biochimie Thèse de doctorat. Clermont-Ferrand.
- Gobert, M., Gruffat, D., Habeau, M., Parafita, E., Bauchart, D., & Durand, D. (2010). Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation. *Meat Science*, *85*, 676-683.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., & Davies, K. J. A. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*, 2519-2530.
- Hambraeus, L. (1999). Animal- and plant-food-based diets and iron status: benefits and costs. *Proceedings of the Nutrition Society*, *58*, 235-242.

- Hannan, M. T., Tucker, K. L., Wason-Hughes, B., Cupples, L. A., Felson, D. T., & Kiel, D. P. (2000). Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: The Framingham osteoporosis study. *Journal of Bone and Mineral Research*, *15*, 2504-2512.
- Hayakawa, T., Yoshida, Y., Yasui, M., Ito, T., Iwasaki, T., Wakamatsu, J. *et al.* (2012). Heat-induced gelation of myosin in a low ionic strength solution containing L-histidine. *Meat Science*, *90*, 77-80.
- Hébel, P. (2007). *Enquête : Comportements et Consommations Alimentaires en France*.
- Hébraud, M. (2002). L'approche protéomique pour mieux comprendre la physiologie de l'adaptation des bactéries aux environnements agro-alimentaires. In *9^{èmes} Journées "Science du Muscle et Technologies des viandes"* (pp. 174-175). Clermont-Ferrand.
- Hennig, U., Metges, C. C., Berk, A., Tuchscherer, A., & Kwella, M. (2004). Relative ileal amino acid flows and microbial counts in intestinal effluents of Goettingen Minipigs and Saddleback pigs are not different. *Journal of Animal Science*, *82*, 1976-1985.
- Hess, V., Ganier, P., Thibault, J. N., & Seve, B. (2000). Comparison of the isotope dilution method for determination of the ileal endogenous amino acid losses with labelled diet and labelled pigs. *British Journal of Nutrition*, *83*, 123-130.
- Hillger, F., Nettels, D., Dorsch, S., & Schuler, B. (2007). Detection and analysis of protein aggregation with confocal single molecule fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, *17*, 759-765.
- Hoac, T., Daun, C., Trafikowska, U., Zackrisson, J., & Akesson, B. (2006). Influence of heat treatment on lipid oxidation and glutathione peroxidase activity in chicken and duck meat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *7*, 88-93.
- Hodgson, J. M., Burke, V., Beilin, L. J., & Puddey, I. B. (2006). Partial substitution of carbohydrate intake with protein intake from lean red meat lowers blood pressure in hypertensive persons. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*, 780-787.
- Holmes, M. D., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Rosner, B., Speizer, F. E. *et al.* (2003). Meat, fish and egg intake and risk of breast cancer. *International Journal of Cancer*, *104*, 221-227.
- Hoshijima, M. (2006). Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *290*, H1313-H1325.
- Huff Lonergan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, *86*, 184-195.
- Hughes, R., Cross, A. J., Pollock, J. R. A., & Bingham, S. (2001). Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*, *22*, 199-202.
- Humphrey, S. P. & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *85*, 162-169.

- Hur, S. J., Ou Lim, B., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, *125*, 1-12.
- Jakszyn, P., Agudo, A., Lujan-Barroso, L., Bueno-de-Mesquita, H. B., Jenab, M., Navarro, C. *et al.* (2012). Dietary intake of heme iron and risk of gastric cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *International Journal of Cancer*, *130*, 2654-2663.
- Jamrozik, K., Broadhurst, R. J., Forbes, S., Hankey, G. J., & Anderson, C. S. (2000). Predictors of death and vascular events in the Elderly : The Perth community stroke study. *Stroke*, *31*, 863-868.
- Jia, X. H., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K. I., & Bendixen, E. (2006). Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M-longissimus dorsi and M-semitendinosus. *Proteomics*, *6*, 936-944.
- Jurie, C. & Listrat, A. (2010). Structure et fonction des constituants du muscle squelettique. In D.Bauchart & B. Picard (Eds.), *Muscle et viande de ruminant* (pp. 61-70). Versailles: Quae.
- Kamin-Belsky, N., Brillon, A. A., Arav, R., & Shaklai, N. (1996). Degradation of myosin by enzymes of the digestive system: Comparison between native and oxidatively cross-linked protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 1641-1646.
- Kararli, T. T. (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, *16*, 351-380.
- Kerstetter, J. E., Wall, D. E., O'Brien, K. O., Caseria, D. M., & Insogna, K. L. (2006). Meat and soy protein affect calcium homeostasis in healthy women. *The Journal of Nutrition*, *136*, 1890-1895.
- Key, T. J., Appleby, P. N., Spencer, E. A., Travis, R. C., Allen, N. E., Thorogood, M. *et al.* (2009). Cancer incidence in British vegetarians. *British Journal of Cancer*, *101*, 192-197.
- Kimura, Y., Kono, S., Toyomura, K., Nagano, J., Mizoue, T., Moore, M. A. *et al.* (2007). Meat, fish and fat intake in relation to subsite-specific risk of colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Science*, *98*, 590-597.
- Kondjoyan, A. (2008). La cuisson des viandes et produits carnés et le couplage avec les réactions à l'origine de la qualité. In 12^{èmes} Journées "Sciences du Muscle et Technologies des Viandes" (pp. 41-48). Tours
- Kong, F. & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, *73*, R67-R80.
- Koschinsky, T., He, C. J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C. *et al.* (1997). Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*, 6474-6479.
- Krebs, N. F. (2007). Food choices to meet nutritional needs of breast-fed infants and toddlers on mixed diets. *The Journal of Nutrition*, *137*, 511S-517S.

- Kuhnle, G. G. C. & Bingham, S. A. (2007). Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1355-1357.
- Lacroix, M., Bos, C., Leonil, J., Airinei, G., Luengo, C., Dare, S. *et al.* (2006). Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 1070-1079.
- Lametsch, R. & Bendixen, E. (2001). Proteome analysis applied to meat science: Characterizing *post mortem* changes in porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4531-4537.
- Laser-Reutersward, A., ASP, N. G., Bjorck, I., & Ruderus, H. (1982). Effect of collagen content and heat treatment on protein digestibility and biological value of meat products. *International Journal of Food Science & Technology*, 17, 115-123.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Chambon, C., Damon, M., Larzul, C. *et al.* (2007). Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles selected for shear force of cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5834-5841.
- Laville, E., Sayd, T., Morzel, M., Blinet, S., Chambon, C., Lepetit, J. *et al.* (2009a). Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10755-10764.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Blinet, S., Pinguet, J., Fillaut, M. *et al.* (2009b). Differences in pig muscle proteome according to HAL genotype: Implications for meat quality defects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4913-4923.
- Lebret, B. (2008). Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. *animal*, 2, 1548-1558.
- Lebret, B., Prunier, A., BonHomme, N., Foury, A., Mormède, P., & Dourmad, J. Y. (2011). Physiological traits and meat quality of pigs as affected by genotype and housing system. *Meat Science*, 88, 14-22.
- Lefèvre, F., Fauconneau, B., Thompson, J. W., & Gill, T. A. (2007). Thermal denaturation and aggregation properties of atlantic salmon myofibrils and myosin from white and red muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4761-4770.
- Lepetit, J. (2008). Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, 80, 960-967.
- Leskova, E., Kubikova, J., Kovacikova, E., Kosicka, M., Porubská, J., & Holcikova, K. (2006). Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 252-276.
- Leterme, P., Thewis, A., Francois, E., VanLeeuwen, P., Wathélet, B., & Huisman, J. (1996). The use of N-15-labeled dietary proteins for determining true ileal amino acid digestibilities is limited by their rapid recycling in the endogenous secretions of pigs. *Journal of Nutrition*, 126, 2188-2198.

- Levitt, M., Furne, J., Springfield, J., Suarez, F., & Demaster, E. (1999). Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *The Journal of Clinical Investigation*, *104*, 1107-1114.
- Lewin, M. H., Bailey, N., Bandaletova, T., Bowman, R., Cross, A. J., Pollock, J. *et al.* (2006). Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-Carboxymethyl Guanine: Implications for colorectal cancer risk. *Cancer Research*, *66*, 1859-1865.
- Lien, K. A., Sauer, W. C., Mosenthin, R., Souffrant, W. B., & Dugan, M. E. (1997). Evaluation of the ¹⁵N-isotope dilution technique for determining the recovery of endogenous protein in ileal digestion of pigs: effect of dilution in the precursor pool for endogenous nitrogen secretion. *Journal of Animal Science*, *75*, 148-158.
- Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988). The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics*, *22*, 631-677.
- Liu, G. & Xiong, Y. L. (2000a). Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and in vitro digestibility of oxidized myosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 624-630.
- Liu, G. & Xiong, Y. L. (2000b). Thermal transitions and dynamic gelling properties of oxidatively modified myosin, β -lactoglobulin, soy 7S globulin and their mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 1728-1734.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*, 83-95.
- Lynch S.R. (1997). Interaction of iron with other nutrients. *Nutrition Reviews*, *55*, 102-110.
- Lynch, S. M. & Frei, B. (1993). Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, *34*, 1745-1753.
- Magee, E. A., Richardson, C. J., Hughes, R., & Cummings, J. H. (2000). Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*, 1488-1494.
- Mahler, H. C., Friess, W., Grauschopf, U., & Kiese, S. (2009). Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *98*, 2909-2934.
- Mann, N., Pirotta, Y., O'Connell, S., Li, D., Kelly, F., & Sinclair, A. (2006). Fatty acid composition of habitual omnivore and vegetarian diets. *Lipids*, *41*, 637-646.
- Mariotti, F., Mahé, S., Benamouzig, R., Luengo, C., Daré, S., Gaudichon, C. *et al.* (1999). Nutritional value of [¹⁵N]-soy protein isolate assessed from ileal digestibility and postprandial protein utilization in humans. *The Journal of Nutrition*, *129*, 1992-1997.
- Mariotti, F., Pueyo, M. E., Tomé, D., Bérot, S., Benamouzig, R., & Mahé, S. (2001). The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. *The Journal of Nutrition*, *131*, 1706-1713.

- Mariotti, F., Pueyo, M. E., Tomé, D., & Mahé, S. (2002). The bioavailability and postprandial utilisation of sweet lupin (*Lupinus albus*)-flour protein is similar to that of purified soyabean protein in human subjects: a study using intrinsically ¹⁵N-labelled proteins. *British Journal of Nutrition*, *87*, 315-323.
- Mariscallandin, G., Seve, B., Colleaux, Y., & Lebreton, Y. (1995). Endogenous amino nitrogen collected from pigs with end-to-end ileorectal anastomosis is affected by the method of estimation and altered by dietary fiber. *Journal of Nutrition*, *125*, 136-146.
- Marklund, S. & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, *47*, 469-474.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, *21*, 361-370.
- Martinaud, A., Mercier, Y., Marinova, P., Tassy, C., Gatellier, P., & Renerre, M. (1997). Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2481-2487.
- Maskarinec, G., Novotny, R., & Tasaki, K. (2000). Dietary patterns are associated with body mass index in multiethnic women. *The Journal of Nutrition*, *130*, 3068-3072.
- McAfee, A. J., McSorley, E. M., Cuskelly, G. J., Moss, B. W., Wallace, J. M. W., Bonham, M. P. *et al.* (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*, *84*, 1-13.
- Medhus, Sandstad, Bredesen, & Husebye (1999). Delay of gastric emptying by duodenal intubation: sensitive measurement of gastric emptying by the paracetamol absorption test. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *13*, 609-620.
- Melanson, K., Gootman, J., Myrdal, A., Kline, G., & Rippe, J. M. (2003). Weight loss and total lipid profile changes in overweight women consuming beef or chicken as the primary protein source. *Nutrition*, *19*, 409-414.
- Melkani, G. C., Cammarato, A., & Bernstein, S. I. (2006). alpha B-crystallin maintains skeletal muscle myosin enzymatic activity and prevents its aggregation under heat-shock stress. *Journal of Molecular Biology*, *358*, 635-645.
- Metges, C. C. (2000). Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *The Journal of Nutrition*, *130*, 1857S-1864S.
- Micha, R., Wallace, S. K., & Mozaffarian, D. (2010). Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus. *Circulation*, *121*, 2271-2283.
- Michaud, D. S., Giovannucci, E., Willett, W. C., Colditz, G. A., & Fuchs, C. S. (2003). Dietary meat, dairy products, fat, and cholesterol and pancreatic cancer risk in a prospective study. *American Journal of Epidemiology*, *157*, 1115-1125.

- Mikkelsen, P. B., Toubro, S., & Astrup, A. (2000). Effect of fat-reduced diets on 24-h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein, and carbohydrate. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*, 1135-1141.
- Minelli, G., Culioli, J., Vignon, X., & Monin, G. (1995). *Postmortem* changes in the mechanical properties and ultrastructure of the *Longissimus* in two porcine breeds. *Journal of Muscle Foods*, *6*, 313-326.
- Mioche, L., Bourdiol, P., & Monier, S. (2003). Chewing behaviour and bolus formation during mastication of meat with different textures. *Archives of Oral Biology*, *48*, 193-200.
- Mioche, L., Bourdiol, P., Monier, S., Martin, J. F., & Cormier, D. (2004). Changes in jaw muscles activity with age: effects on food bolus properties. *Physiology & Behavior*, *82*, 621-627.
- Mishellany-Dutour, A., Renaud, J., Peyron, M. A. s., Rimek, F., & Woda, A. (2008). Is the goal of mastication reached in young dentates, aged dentates and aged denture wearers? *British Journal of Nutrition*, *99*, 121-128.
- Missmer, S. A., Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Yaun, S. S., Adami, H. O., Beeson, W. L. *et al.* (2002). Meat and dairy food consumption and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *International Journal of Epidemiology*, *31*, 78-85.
- Monin, G. (1988). Évolution post-mortem du tissu musculaire et conséquences sur les qualités de la viande de porc. In *Journées de la Recherche Porcine en France*. (pp. 201-214).
- Monin, G., Larzul, C., Le Roy, P., Culioli, J., Mourot, J., Rousset-Akrim, S. *et al.* (1999). Effects of the halothane genotype and slaughter weight on texture of pork. *Journal of Animal Science*, *77*, 408-415.
- Morita, J. I. & Yasui, T. (1991). Involvement of hydrophobic residues in heat-induced gelation of myosin tail subfragments from rabbit skeletal-muscle. *Agricultural and Biological Chemistry*, *55*, 597-599.
- Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M., & Laville, E. (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science*, *73*, 536-543.
- Mosoni, L. & Patureau Mirand, P. (2003). Type and timing of protein feeding to optimize anabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *6*, 301-306.
- Moughan, P. J., BATTERY, P. J., Essex, C. P., & Soar, J. B. (1992). Evaluation of the isotope dilution technique for determining ileal endogenous nitrogen excretion in the rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *58*, 165-172.
- Munger, R. G., Cerhan, J. R., & Chiu, B. C. H. (1999). Prospective study of dietary protein intake and risk of hip fracture in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *69*, 147-152.

- Neumann, C. G., Murphy, S. P., Gewa, C., Grillenberger, M., & Bwibo, N. O. (2007). Meat supplementation improves growth, cognitive, and behavioral outcomes in Kenyan children. *The Journal of Nutrition*, *137*, 1119-1123.
- Olaoye, O. A. (2011). Meat: An overview of its composition, biological changes and associated microbial agents. *International Food Research Journal*, *18*, 877-885.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., & Stadtman, E. R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *262*, 5488-5491.
- Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G. *et al.* (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science & Technology*, *36*, 3326-3334.
- Ouali, A. (1991). Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *INRA Production Animale*, *4*, 195-208.
- Pearson, J. R., Gill, C. I., & Rowland, I. R. (2009). Diet, fecal water, and colon cancer – development of a biomarker. *Nutrition Reviews*, *67*, 509-526.
- Pera, P., Bucca, C., Borro, P., Bernocco, C., De Lillo, A., Tealdo, T. *et al.* (2002). Influence of mastication on gastric emptying. *Journal of Dental Research*, *81*, B289.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A., & Stempel, K. E. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, *11*, 2627-2633.
- Philo, J. S. & Arakawa, T. (2009). Mechanisms of protein aggregation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *10*, 348-351.
- Pierre, F., Freeman, A., Taché, S., van der Meer, R., & Corpet, D. E. (2004). Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-Induced Mucin-Depleted Foci and Aberrant Crypt Foci in rat colons. *The Journal of Nutrition*, *134*, 2711-2716.
- Pierre, F., Tache, S., Guéraud, F., Rerole, A. L., Jourdan, M. L., & Petit, C. (2006a). Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis*, *28*, 321-327.
- Pierre, F., Peiro, G., Taché, S., Cross, A. J., Bingham, S. A., Gasc, N. *et al.* (2006b). New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-Dihydroxynonane Mercapturic Acid. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *15*, 2274-2279.
- Pierre, F., Bastide, N., & Corpet, D. E. (2010). Viandes rouges et risques de cancer du côlon. In *13èmes Journées "Sciences du Muscle et Technologies des Viandes"* (pp. 23-30). Clermont-Ferrand.
- Promeyrat, A., Bax, M. L., Traoré, S., Aubry, L., Santé-Lhoutellier, V., & Gatellier, P. (2010a). Changed dynamics in myofibrillar protein aggregation as a consequence of heating time and temperature. *Meat Science*, *85*, 625-631.

- Promeyrat, A., Gatellier, P., Lebret, B., Kajak-Siemaszko, K., Aubry, L., & Santé-Lhoutellier, V. (2010b). Evaluation of protein aggregation in cooked meat. *Food Chemistry*, *121*, 412-417.
- Promeyrat, A., Sayd, T., Laville, E., Chambon, C., Lebret, B., & Gatellier, P. (2011). Early post-mortem sarcoplasmic proteome of porcine muscle related to protein oxidation. *Food Chemistry*, *127*, 1097-1104.
- Punnen, S., Hardin, J., Cheng, I., Klein, E. A., & Witte, J. S. (2011). Impact of meat consumption, preparation, and mutagens on aggressive prostate cancer. *PLOS ONE*, *6*, e27711, 1-8.
- Rémond, D., Machebeuf, M., Yven, C., Buffière, C., Mioche, L., Mosoni, L. *et al.* (2007). Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, *85*, 1286-1292.
- Rémond, D., Savary-Auzeloux, I., Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2008). Propriétés nutritionnelles des peptides et protéines de la viande: Impact des procédés de transformation. (Nutritional properties of meat peptides and proteins: impact of processing). In *12^{ème} Journées "Science du Muscle et Technologies des Viandes"* (pp. 389-401). Tours.
- Rémond, D., Peyron, M.-A., & Savary-Auzeloux, I. (2010). Viande et nutrition protéique. In *Muscle et viande de ruminants* (QUAE :Synthèse ed., pp. 255-266). Versailles: Bauchart, D. & Picard, B.
- Rémond, D., Buffière, C., Pouyet, C., Papet, I., Dardevet, D., Savary-Auzeloux, I. *et al.* (2011). Cysteine fluxes across the portal-drained viscera of enterally fed minipigs: effect of an acute intestinal inflammation. *Amino Acids*, *40*, 543-552.
- Renner, M. (2002). Les oxydations lipidiques dans la viande. In *9^{èmes} Journées "Science du Muscle et Technologies des Viandes"* (pp. 75-76). Clermont-Ferrand.
- Roberts, C. J. (2007). Non-native protein aggregation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, *98*, 927-938.
- Rosell, M. S., Lloyd-Wright, Z., Appleby, P. N., Sanders, T. A., Allen, N. E., & Key, T. J. (2005). Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in plasma in British meat-eating, vegetarian, and vegan men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *82*, 327-334.
- Roughead, Z. K., Johnson, L. K., Lykken, G. I., & Hunt, J. R. (2003). Controlled high meat diets do not affect calcium retention or indices of bone status in healthy postmenopausal women. *The Journal of Nutrition*, *133*, 1020-1026.
- Roussel, M. A., Hill, A. M., Gaugler, T. L., West, S. G., Vanden Heuvel, J. P., Alaupovic, P. *et al.* (2012). Beef in an optimal lean diet study: effects on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *95*, 9-16.
- Rowan, A. M., Moughan, P. J., Wilson, M. N., Maher, K., & Tasman-Jones, C. (1994). Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *British Journal of Nutrition*, *71*, 29-42.

- Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., & Huff-Lonergan, E. (2004). Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *Journal of Animal Science*, *82*, 785-793.
- Rutherford, S. M. & Moughan, P. J. (2003). The rat as a model animal for the growing pig in determining ileal amino acid digestibility in soya and milk proteins. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *87*, 292-300.
- Saebø, M., Skjelbred, C., Li, K., Lothe, I., Hagen, P., Johnsen, E. *et al.* (2008). CYP1A2 164A – Polymorphism, Cigarette Smoking, Consumption of Well-done Red Meat and Risk of Developing Colorectal Adenomas and Carcinomas. *Anticancer Research*, *28*, 2289-2295.
- Sagone, A., Greenwald, J., Kraut, E. H., Bianchine, J., & Singh, D. (1983). Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *101*, 97-104.
- Sant'Ana, R., Mendes, F., Pires, C., & Oliveira, M. (2011). Influence of lipid extraction from different protein sources on *in vitro* digestibility. *Ciência e Agrotecnologia*, *35*, 758-764.
- Santarelli, R. L., Pierre, F., & Corpet, D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*, *60*, 131-144.
- Santé-Lhoutellier, V., Aubry, L., & Gatellier, P. (2007). Effect of oxidation on *in vitro* digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 5343-5348.
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Greve, E., & Gatellier, P. (2008a). Effect of meat cooking on physicochemical state and *in vitro* digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 1488-1494.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Aubry, L., & Gatellier, P. (2008b). Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and *in vitro* digestibility. *Meat Science*, *79*, 777-783.
- Sawa, T., Akaike, T., Kida, K., Fukushima, Y., Takagi, K., & Maeda, H. (1998). Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *7*, 1007-1012.
- Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C. *et al.* (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: Implications on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 2732-2737.
- Schmitz, M., Hagemester, H., & Erbersdobler, H. F. (1991). Homoarginine labeling is suitable for determination of protein absorption in miniature pigs. *The Journal of Nutrition*, *121*, 1575-1580.
- Silvester, K. R. & Cummings, J. H. (1995). Does digestibility of meat protein help explain large-bowel cancer risk. *Nutrition and Cancer-An International Journal*, *24*, 279-288.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2000). *La composition des aliments: Tableaux des valeurs nutritives*. (6^{ème} ed.) Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.

- Soucy, J. & Leblanc, J. (1998). Protein meals and postprandial thermogenesis. *Physiology & Behavior*, *65*, 705-709.
- Stabursvik, E., Fretheim, K., & Frøystein, T. (1984). Myosin denaturation in pale, soft, and exudative (PSE) porcine muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *35*, 240-244.
- Stadtman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, *9*, 315-325.
- Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry*, *62*, 797-821.
- Stein, H. H., Seve, B., Fuller, M. F., Moughan, P. J., & de Lange, C. F. M. (2007). Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *Journal of Animal Science*, *85*, 172-180.
- Sun, W., Zhou, F., Zhao, M., Yang, B., & Cui, C. (2011). Physicochemical changes of myofibrillar proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and in vitro digestibility. *Food Chemistry*, *129*, 472-478.
- Symons, T. B., Sheffield-Moore, M., Wolfe, R. R., & Paddon-Jones, D. (2009). A moderate serving of high-quality protein maximally stimulates skeletal muscle protein synthesis in young and elderly subjects. *Journal of the American Dietetic Association*, *109*, 1582-1586.
- Tabatabaei, S. M., Fritschi, L., Knuiman, M. W., Boyle, T., Iacopetta, B. J., Platell, C. *et al.* (2011). Meat consumption and cooking practices and the risk of colorectal cancer. *European Journal of Clinical Nutrition*, *65*, 668-675.
- Tang, D., Liu, J. J., Rundle, A., Neslund-Dudas, C., Savera, A. T., Bock, C. H. *et al.* (2007). Grilled meat consumption and PhIP-DNA adducts in prostate carcinogenesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *16*, 803-808.
- Taylor, E. F., Burley, V. J., Greenwood, D. C., & Cade, J. E. (2007). Meat consumption and risk of breast cancer in the UK Women's Cohort Study. *British Journal of Cancer*, *96*, 1139-1146.
- Thorpe, D. L., Knutsen, S. F., Lawrence Beeson, W., Rajaram, S., & Fraser, G. E. (2008). Effects of meat consumption and vegetarian diet on risk of wrist fracture over 25 years in a cohort of peri- and postmenopausal women. *Public Health Nutrition*, *11*, 564-572.
- Tomé, D. (2008). Qualité nutritionnelle des protéines de la viande. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, *43*, 1S40-1S45.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, *70*, 493-508.
- Tortora, G. J. & Grabowski, S. R. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*. (2^{ième} ed.) De Boeck Université.
- Truswell, A. S. (2009). Problems with red meat in the WCRF2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *89*, 1274-1275.

- Uhe, A. M., Collier, G. R., & O'Dea, K. (1992). A comparison of the effects of beef, chicken and fish protein on satiety and amino acid profiles in lean male subjects. *The Journal of Nutrition*, *122*, 467-472.
- van Laack, R. L. & Kauffman, R. G. (1999). Glycolytic potential of red, soft, exudative pork longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, *77*, 2971-2973.
- Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., & Scharpe, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *The FASEB Journal*, *9*, 736-744.
- Volpi, E., Ferrando, A. A., Yeckel, C. W., Tipton K.D., & Wolfe, R. R. (1998). Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *The Journal of Clinical Investigation*, *101*, 2000-2007.
- Warriss, P. D. (2000). *MEAT SCIENCE: An introductory text*. CABI; 1st edition (May 15, 2000).
- Watanabe, F. (2007). Vitamin B12 sources and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, *232*, 1266-1274.
- Wayler, A., Queiroz, E., Scrimshaw, N. S., Steinke, F. H., Rand, W. M., & Young, V. R. (1983). Nitrogen-balance studies in young men to assess the protein-Quality of an isolated soy protein in relation to meat proteins. *Journal of Nutrition*, *113*, 2485-2491.
- Weiner, K., Graham, L. S., Reedy, T., Elashoff, J., & Meyer, J. H. (1981). Simultaneous gastric-emptying of two solid foods. *Gastroenterology*, *81*, 257-266.
- West, D. W., Burd, N. A., Coffey, V. G., Baker, S. K., Burke, L. M., Hawley, J. A. *et al.* (2011). Rapid aminoacidemia enhances myofibrillar protein synthesis and anabolic intramuscular signaling responses after resistance exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *94*, 795-803.
- Wilhelmus, M., de Waal, R., & Verbeek, M. (2007). Heat Shock Proteins and amateur chaperones in amyloid-beta accumulation and clearance in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, *35*, 203-216.
- Windey, K., De Preter, V., & Verbeke, K. (2012). Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*, 184-196.
- Wisker, E., Knudsen, K. E. B., Daniel, M., Feldheim, W., & Eggum, B. O. (1996). Digestibilities of energy, protein, fat and nonstarch polysaccharides in a low fiber diet and diets containing coarse or fine whole meal rye are comparable in rats and humans. *The Journal of Nutrition*, *126*, 481-488.
- World Cancer Research Fund's & American Institute for cancer Research (2007). *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. Washington DC:AICR.
- Wood, J. D., Brown, S. N., Nute, G. R., Whittington, F. M., Perry, A. M., Johnson, S. P. *et al.* (1996). Effects of breed, feed level and conditioning time on the tenderness of pork. *Meat Science*, *44*, 105-112.

- Wu, F. Y., Dutson, T. R., & Smith, S. B. (1985). A scanning electron microscopic study of heat-induced alterations in bovine connective tissue. *Journal of Food Science*, *50*, 1041-1044.
- Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. In E.A.Decker, C. Faustman, & C. J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods* (pp. 85-111). New-York: Wiley.
- Yoon, H., Benamouzig, R., Little, J., François-Collange, M., & Tomé, D. (2000). Systematic review of epidemiological studies on meat, dairy products and egg consumption and risk of colorectal adenomas. *European Journal of Cancer Prevention*, *9*, 151-164.
- Young, V. R., Fajardo, L., Murray, E., Rand, W. M., & Scrimshaw, N. S. (1975). Protein requirements of man - Comparative nitrogen-balance response within submaintenance to maintenance range of intakes of wheat and beef proteins. *Journal of Nutrition*, *105*, 534-542.
- Yven, C., Culioli, J., & Mioche, L. (2005). Meat bolus properties in relation with meat texture and chewing context. *Meat Science*, *70*, 365-371.
- zur Hausen, H. (2012). Red meat consumption and cancer: Reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, *130*, 2475-2483.

Sites web

<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/contractionmuscle/contractmuscle.htm>

<http://www.joint-muscle-relief.com/how-to-build-collagen.html>

[http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation au met oxygene/peroxlip.html](http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/peroxlip.html)

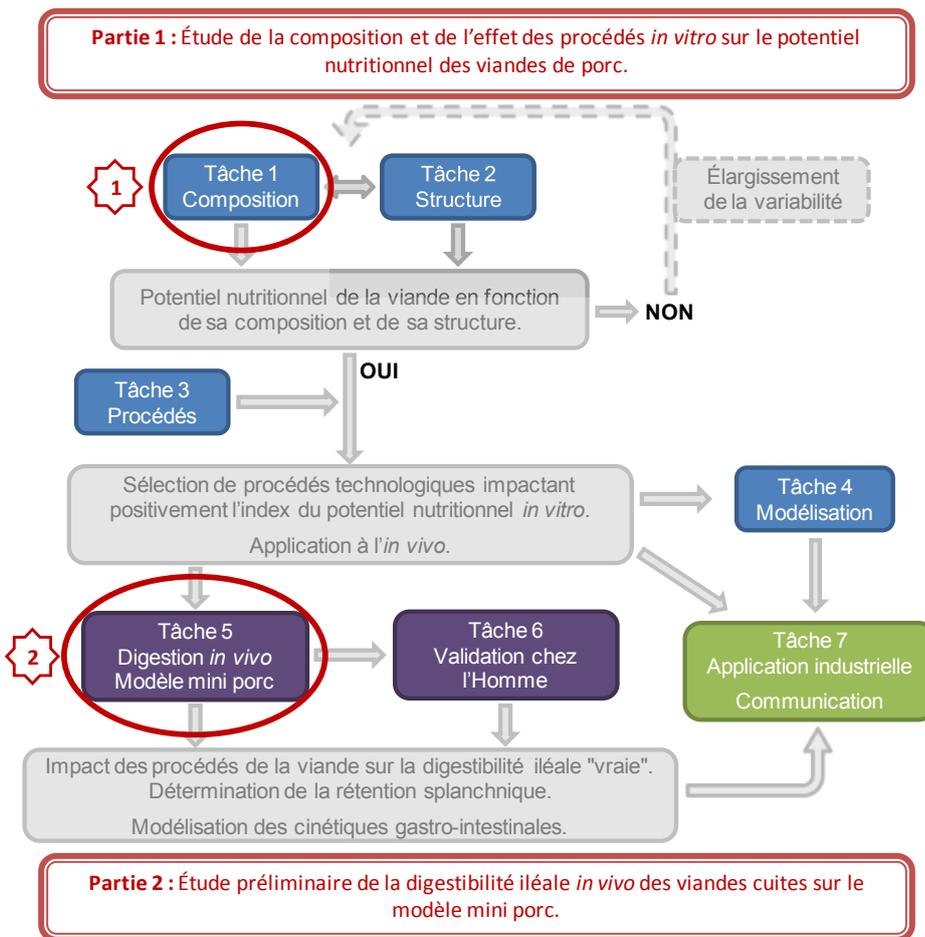


Figure 34 Organisation schématique de l'ANR PRONUTRIAL et positionnement du projet de thèse (cercles rouge).

Annexes

Le projet ANR PRONUTRIAL (ANR 09-ALIA-008-02)



Contexte

En France, la consommation de viande représente 1/3 des protéines totales ingérées. Contrairement aux protéines végétales, les protéines carnées apportent tous les acides aminés indispensables, en quantité équilibrée par rapport aux besoins de l'Homme, ce qui leur confère un potentiel nutritionnel intéressant. Ce potentiel peut être modulé 1) par une digestion des protéines plus ou moins importante dans l'intestin grêle (digestibilité), ce qui détermine la quantité d'acides aminés absorbés et 2) par une vitesse de digestion plus ou moins élevée, ce qui influence la capacité d'assimilation des acides aminés absorbés, par l'organisme du consommateur. La préparation de la viande nécessite l'application de traitements technologiques (conservation, hachage, cuisson, salage,...) qui génèrent des modifications physicochimiques des protéines dont les impacts sur la digestibilité et la vitesse de digestion sont évalués *in vitro*, puis *in vivo* sur le miniporc.

Hypothèse

Nous cherchons à connaître des mécanismes à l'origine des variations de la vitesse de digestion des protéines de la viande. Les modifications physicochimiques induisent la formation d'agrégats qui sont des amas de protéines. La formation de ces agrégats réduirait l'efficacité et l'accessibilité des enzymes digestives aux protéines et affecterait ainsi la vitesse de digestion. Notre hypothèse est que la nature, la quantité et la forme des agrégats protéiques limiteraient l'accès et l'efficacité des enzymes de la digestion et diminueraient le potentiel nutritionnel. Afin de vérifier les hypothèses issues de ces travaux menés *in vitro*, des études *in vivo* seront réalisées pour établir les cinétiques de digestion et d'absorption ainsi que des profils métabolomiques seront réalisés en fonction de l'aliment carné ingéré. L'ensemble de ces travaux apportera des connaissances nouvelles sur le potentiel nutritionnel des protéines carnées.

Structuration du Projet et Positionnement du projet de thèse

Le projet PRONUTRIAL s'articule en plusieurs tâches complémentaires (Figure 34) qui ont pour but d'intégrer des connaissances en sciences des aliments et en nutrition. La stratégie que nous avons développée consiste à évaluer la variation du potentiel nutritionnel des produits carnés par des approches *in vitro* (protéomique, empreinte peptidique, activité antioxydante,

digestion *in vitro*, modélisation (Tâche 4),...) qui prennent en compte la composition (Tâche 1) et la structure des matrices (Tâche 2), à sélectionner des conditions de procédés divergents sur ces critères (Tâche 3), et à évaluer leurs impacts physiologiques sur l'animal (Tâche 5) et chez l'Homme (Tâche 6). Outre l'acquisition de connaissances académiques, nous avons pour objectif de transférer celles-ci auprès des acteurs des filières et pour cela ce projet dispose d'un partenariat (Tâche 7) avec un centre technique (ADIV : Institut technique Agro-Industriel des filières viandes), un industriel (groupe Aoste) et une plateforme d'information grand public (Centre d'Information des Viandes). Ce projet a débuté en Janvier 2010 et se termine en Décembre 2013.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai travaillé dans un premier temps, sur la tâche 1 concernant la caractérisation de la composition de la viande de porc à l'état mûré ou non ainsi que cuit avec ou sans hachage et étudié la digestion *in vitro* de ces différentes conditions. Dans un deuxième temps, étant donné que ma thèse a débuté avant le projet ANR, je n'ai pas pu effectuer les expériences prévues dans le projet, j'ai donc réalisé des études préliminaires à la tâche 5 et testé *in vivo* sur le modèle miniporc, l'effet de 3 traitements thermiques sur la digestibilité iléale des protéines, ainsi que l'effet de la quantité ingérée.

[PRONUTRIAL]

Impact des procédés sur la qualité nutritionnelle des protéines carnées.

Coordinatrice : Véronique SANTE-LHOUELLIER - INRA - Qualité des Produits Animaux
 63122 Saint Genès Champanelle

[Contexte]

En Europe, la consommation de viandes et produits carnés représente 1/3 de l'apport total en protéines. Celles-ci, de par leur équilibre en acides aminés essentiels, participent de façon fondamentale au bon fonctionnement des organes vitaux. Dans les sociétés industrialisées, l'alimentation couvre en général les besoins en acides aminés essentiels. Cependant, chez les personnes âgées, les besoins en protéines sont accrus pour lutter contre la fonte musculaire. Or, les procédés de transformation des viandes (conservation, cuisson, salaison, appertisation) induisent des oxydations et dénaturations des protéines qui peuvent conduire à une perte de biodisponibilité de certains acides aminés et ainsi altérer le potentiel nutritionnel des viandes, allant jusqu'à de potentiels effets néfastes pour la santé.

[Objectifs]

Déterminer l'impact des procédés de transformation de la viande sur l'état des protéines et leurs interactions avec d'autres composés (acides gras insaturés, sucres...), sur leur vitesse de digestion et leur digestibilité.

Le projet est organisé en 7 workpackages :

WP1 et 2 : Détermination du potentiel nutritionnel de viandes à composition et organisation structurale variables : application aux modèles de porc et de bœuf.

WP3 : Impact relatif des caractéristiques de la viande crue et des procédés technologiques sur la digestibilité in vitro.

WP4 : Développement d'un modèle permettant de sélectionner les paramètres de traitements combinés : marinade et cuisson.

WP5 : Impact des procédés technologiques sur la digestion in vivo dans l'intestin grêle.

WP6 : Validation chez l'homme par une étude clinique.

WP7 : Etude de faisabilité à l'échelle pilote (semi-industrielle) et transfert à l'échelle industrielle.

[Résultats attendus]

Ce projet produira de nouvelles connaissances destinées à améliorer et optimiser les qualités nutritionnelles des viandes et des produits carnés et qui ont pour vocation à être transférées auprès des industries de la viande et de sa transformation.

[6 Partenaires]

INRA - UPR 370 Qualité des Produits Animaux • INRA - UMR 1019 Unité Nutrition Humaine • Association pour le développement de l'Institut de la viande (ADIV) • INRA - UMR 914 Physiologie de la Nutrition et Comportement Alimentaire • Centre d'Information des Viandes (CIV) • SEC SNC - AOSTE

[Caractéristiques générales]

- 120 personnes impliquées dans le projet
- Budget total : 2 022 870 euros dont financement ANR 548 000 euros
- Début et durée du projet : Janvier 2010 – 48 mois
- Participation centre ACTIA ADIV et labellisation pôle de compétitivité INNOVIANDES





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Characterization of protein aggregates following a heating and freezing process

K. Kajak-Siemaszko^a, L. Aubry^b, F. Peyrin^b, M.-L. Bax^b, P. Gatellier^b, T. Astruc^b, W. Przybylski^a, D. Jaworska^a, B. Gaillard-Martinie^c, V. Santé-Lhoutellier^{b,*}

^a Faculty of Human Nutrition and Consumer Sciences, Warsaw University of Life Sciences, SGGW, Poland

^b INRA, UR370 QuaPA, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^c INRA CR de Clermont-Ferrand-Theix Plateau technique de Microscopie, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2011

Accepted 21 July 2011

Keywords:

Protein aggregation
Freezing and heating treatment
Light scattering
Image analysis
Scanning electron microscopy

ABSTRACT

This study used complementary multi-scale analytical methods in order to better understand how technological procedures such as freezing and heating affect protein aggregation. The research was conducted on fresh and frozen *Longissimus dorsi* (LD) which were heated at different temperatures and for various times. Protein aggregates were measured using light scattering, SDS PAGE electrophoresis, and optical and scanning electron microscopy. Heating led to a higher molecular weight of aggregates, while freezing had an additive effect on aggregates, with the actin band decreasing as cooking times increased.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Protein aggregation formation have been extensively studied for medical issues (Bucciantini et al., 2002), as it affects the biological activity of the protein. Literature in the pharmaceutical domain reports different consequences of aggregation, such as reduction of drug efficiency (Charman, Mason, & Charman, 1993; Cudd, Arvinte, Das, Chinni, & MacIntyre, 1995) and potential toxic effects (Bucciantini et al., 2002). Recent nutrition science research analyzing the impact of protein aggregates has shown a lower *in vivo* and/or *in vitro* digestibility of proteins from processed products such as meat, wheat or beans (Domenek, Brendel, Morel, & Guilbert, 2004; Promeyrat et al., 2010; Rémond, Savary-Auzeloux, Gatellier, & Santé-Lhoutellier, 2008; Tang, Chen, & Mab, 2009), where aggregation was promoted by processing, especially heating. In European countries, where meat consumption represents one third of the total plant and animal protein intake, meat is generally heated before consumption.

Processing the meat, particularly heat treatment, can generate chemical reactions affecting several amino acids (carbonyl formation, thiol oxidation and aromatic hydroxylation) leading to protein denaturation, protein cross-linking, and aggregate formation. Freezing is a hugely significant method of meat and fish preservation, but the quality of frozen tissue progressively deteriorates due to changes in lipids and proteins. Oxidation has been shown to induce a number of changes in proteins, including modification of amino acid side chains,

formation of protein polymers, loss of solubility, increase in carbonyl groups, and change in amino acid composition (Soyer, Özalp, Dalmiş, & Bilgin, 2010). These alterations are thought to decrease the rate of meat protein digestibility in the human small intestine and increase the risk of protein fermentation in the large intestine, ultimately forming unwanted end-products such as nitrosamines, sulfide, cresol or phenol — all of which are potentially mutagenic (Evenepoel et al., 1998; Geypens et al., 1997; Hugues, Mages, & Bingham, 2000; Roberfroid, Bomet, Bouley, & Cummings, 1995). In meat, muscle cells contain both globular and fibrous proteins that exhibit different behaviors upon heating. Myosin and BSA have been extensively studied as a protein model (Brenner, Johannsson, & Nicolai, 2009; Su, Qi, He, Zhang, & Jin, 2008; Ye, 2006). Slight heat-induced aggregation starts in BSA at above 60 °C, whereas 50 °C is enough to induce the aggregation process in myosin. However, the heat processes applied on meat generally use higher temperatures and various times, thus potentially producing protein aggregates. A two-step molecular mechanism of protein aggregation has been reported for myosin, with first an association of the heads, possibly through disulphide bridge formation, followed second by oligomer aggregation to form larger clusters, possibly involving association of the tails (Sharp & Offer, 1992; Tazawa, Kato, Katoh, & Konno, 2002). There is little available data on the structure, size variability and shape of these larger aggregates (Brenner et al., 2009). One of the major challenges that protein aggregates analysis has to contend with is that there is still no single analytical method able to cover the entire size range in which aggregates may appear, and specifically no routine method for quantifying submicron particles. Different analytical methods therefore have to be employed in order to detect just a minute aggregate fraction of total protein mass and cover the size range from a

* Corresponding author.

E-mail address: veronique.sante@clermont.inra.fr (V. Santé-Lhoutellier).



Contents lists available at ScienceDirect

Meat Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci

Changed dynamics in myofibrillar protein aggregation as a consequence of heating time and temperature

A. Promeprat, M.L. Bax, S. Traoré, L. Aubry, V. Santé-Lhoutellier, Ph. Gatellier*

INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122 Saint Genès-Champagnelle, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2009

Received in revised form 14 March 2010

Accepted 15 March 2010

Keywords:

Cooked meat

Laser granulometry

Protein aggregation

ABSTRACT

The kinetics of protein aggregation induced by cooking were investigated in pig *M. Longissimus dorsi*. The 4 day aged muscles were cooked either in water or under dry heat conditions for 30 min. Four temperatures from 50 to 100 °C were tested for the “in water” cooking mode and an additional temperature of 140 °C was tested in the dry condition. Raw and cooked meat specimens were ground in a KCl solution. After delipidation of the meat extract, protein aggregation was evaluated with a laser granulometer (Sysmex FPIA-3000) which enabled reliable and reproducible characterization of particle number, size, and shape distribution using automated imaging techniques. The cooking mode (dry/“in water”) did not affect the granulometry measurements. But, increasing cooking time and temperature affected the number, the size, and the shape of particles. An important decrease in particle number was observed during cooking in parallel with a reduction in particle size and a change in circularity. From these data a model with intermediary fibrillar aggregates and final amorphous aggregates was proposed.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Protein aggregation is an important phenomenon that affects numerous biological processes. In medical science the aggregation of proteins has been suggested to be intimately associated with neurodegenerative disorders such as Alzheimer's (Blennow, de Leon, & Zetterberg, 2006), Huntington's (Bates & Benn, 2002), Parkinson's (Dauer & Przedborski, 2003) and prion (Prusiner, 1991) diseases and with many forms of cancer (Stefani & Dobson, 2003). Protein aggregation is also important in the food industry where it can interfere with many processes. It is generally regarded as a nuisance in protein and peptide fractionation and extraction processes (Mahmoud, 1994; Pouliot, Gauthier, & l'Heureux, 2000; Pouliot, Wijers, Gauthier, & Nadeau, 1999). On the contrary aggregation has a positive effect on protein gelation by increasing the gel strength (Barbut & Foegeding, 1993; Ju & Kilara, 1998; Nakamura et al., 1996).

In meat, some model system studies, using chemically oxidized proteins, have demonstrated the negative impact of aggregations on the sensitivity of proteins to proteolysis by enzymes of the digestive tract (Kamin-Belsky, Brillon, Arav, & Shaklai, 1996; Liu & Xiong, 2000; Santé-Lhoutellier, Aubry, & Gatellier, 2007). This reduced digestibility of proteins leads to a decrease in bio-availability of amino acids with a negative impact on the nutritional quality

of meat products. Besides poorer amino acid bio-availability, reduced protein digestion rate could have a deleterious effect on human health by the formation of fermented products which can increase the risk of colon cancer. The production, from tyrosine, of mutagenic compounds like phenols and cresols has been described (Evenepoel et al., 1998; Geypens et al., 1997).

The effect of heating treatment on the aggregation process of myofibrils is poorly documented. Recently it has been demonstrated that some protein oxidative modifications generated during meat cooking, like cysteine oxidation and reaction of lysine amino groups with dialdehydic products of the lipid peroxidation, can induce intermolecular cross links implicated in the protein aggregation (Promeprat et al., in press; Santé-Lhoutellier, Astruc, Marinova, Grève, & Gatellier, 2008). In the same studies, the major role of protein surface hydrophobicity was highlighted, generated by heating, on aggregate formation. Nevertheless, because of its importance in nutrition and health (qualities which reduce the risk of chronic diseases), further studies are needed to better understand the kinetics and mechanism of protein aggregation induced by heat processes.

Many techniques have been used to study protein aggregation. Up to now, this phenomenon has been measured by at least 20 different analytical techniques (for recent reviews see: Bondos, 2006; Morris, Watzky, & Finke, 2009), each having its own intrinsic advantages and disadvantages. To characterize the protein aggregates formed during meat cooking laser granulometry technology which has the advantage, in comparison with other techniques, to provide both quantitative and qualitative information on this

* Corresponding author. Tel.: +33 473 62 41 98; fax: +33 473 62 42 68.
E-mail address: pgatel@clermont.inra.fr (Ph. Gatellier).



PROTEIN BIOMARKERS OF *IN VITRO* DIGESTION PARAMETERS OF RAW AND COOKED MEAT

Santé-Lhoutellier V. ¹, Bax M-L. ^{1,2}, Sayd T. ¹, Aubry L. ¹, Chambon C. ¹, Astruc T. ¹ & Rémond D. ²
INRA, ¹UR370 QuaPA, ²UMRI019 UNH, 63122 Saint Genes Champanelle, France



Meat, protein, *in vitro* digestion parameters, proteome, MALDI TOF

Abstract

The aim of the study was identify significant associations between *in vitro* pepsin and trypsin/chymotrypsin digestion parameters of raw and cooked meat, and protein biomarkers.

This study revealed a few potential protein biomarkers associated to raw and cooked meat digestion potential. Contractile proteins (actin, MLC), cytoskeletal proteins (tubulin), chaperones and transferrin are negatively associated to pepsin digestion parameters. On the contrary, enzymes implicated in detoxification (glutamate DH, DJ1), in energy production (malate DH, ATP synthase) and proteins from Z-line (calsarcin) are positively associated to higher *in vitro* pepsin digestion. Similar trends were found with trypsin/chymotrypsin digestion, enhancing the positive implication of antioxidant proteins (S-formylglutathione hydrolase, peroxiredoxine, ...).

Introduction

Consumers today are well aware of the impact of food on their health. In addition to food hygiene and sensory aspects, nutritional quality is becoming an increasingly important factor in food choices, especially against a background of increasing demand for convenience foods. Meat is also a major source of proteins and a valuable source of micronutrients providing all the body's essential amino acids. However, the nutritional quality requires information about digestibility in the small intestine and protein digestion rate must be taken into account. Few studies have focused on the determining of these parameters for meat products in human diet.

The meat is a complex type of food which undergoes numerous transformations before being consumed (maturation, preservation, mincing, cooking, ...), technological processes which may alter the biochemical composition and structure of proteins, and hence may change their nutritional properties. Recent studies showed that meat cooked at high temperature induced oxidation by the formation of carbonyls groups, disulfide bridges and also protein denaturation. The impact on *in vitro* digestion parameters are not well documented.

Recently Bax et al (2012) proposed a mechanism for the higher degradation potential of meat cooked at 70 °C in a system mimicking the gastric compartment. Protein conformation changes due to heating would maximize protein surface exposure to hydrophobic zones and thus promote the bioaccessibility of pepsin to cleavage sites – although only up to a certain limit. However the target proteins were not identified.

The aim of the study was identify significant associations between *in vitro* pepsin and trypsin/chymotrypsin digestion parameters of raw and cooked meat, and potential protein biomarkers.

Material & methods

The experiment was carried out on 12 commercial pigs (6 months old) slaughtered at about 100 kg live weight in a commercial slaughterhouse. After 24 hours, the *Longissimus dorsi* muscle was removed from each carcass. One part of the muscles was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C (proteomic samples), while the other part was kept for 3 days at 4 °C under air-permeable film before being frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until sample preparation and analysis (raw and cooked samples).

Proteomic analysis was performed on sarcoplasmic and myofibrillar fraction according to Théron et al (2011). Gels were stained with colloidal Coomassie Blue G-250.

Gels were visualized and analyzed using the two-dimensional electrophoresis (2DE) image analysis software SameSpots (non-linear dynamics). Coomassie stained spots of interest were analysed by MALDI-TOF mass spectrometry and using nano LC-ion trap MS/MS analysis. Identification of peptides was performed with Mascot 2.2, restricting the taxonomy to mammalia (20080417, 1177111 sequences) in the protein NCBI database.

Digestion parameters (initial slope, half-life time, maximal degradation) were measured as described by Bax et al (2012) on raw meat and meat cooked during 30 minutes at 70, 100 and 140 °C to represent the main processing conditions occurring.

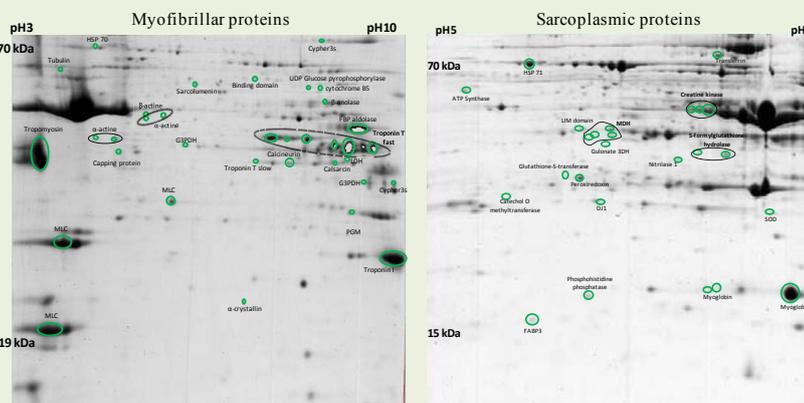
The experimental data were statistically processed using Statistica software release 7.1 package (StatSoft). Pearson correlation was determined between *in vitro* pepsin and trypsin/chymotrypsin digestion parameters and proteomic data. Only significant correlation are shown.

Conclusion

This study revealed a few potential protein biomarkers associated to raw and cooked meat digestion potential. Contractile proteins (actin, MLC), cytoskeletal proteins (tubulin), chaperones and transferrin are negatively associated to pepsin digestion parameters. On the contrary, enzymes implicated in muscle detoxification (glutamate, DJ1), in energy production (malate DH, ATP synthase) and proteins from Z-line (calsarcin) are positively associated to higher *in vitro* pepsin digestion. Similar trends were found with trypsin/chymotrypsin digestion, enhancing the positive implication of antioxidant proteins (S-formylglutathione hydrolase, peroxiredoxine, ...) and stress proteins (nitritease, catechol O-methyltransferase). Protein oxidation lead in particular to carbonylated lysine (one of trypsin cleavage sites) and consequently hydrolysis by trypsin would be less effective.

Results

	Raw	70 °C	100 °C	140 °C	p _r
Cooking losses (%)	21.5 [0.8] ^a	31.6 [0.7] ^b	58.2 [0.5] ^c	***	
<i>In vitro</i> Pepsin digestion					
Initial slope (ΔOD/h)	0.086 [0.002] ^b	0.107 [0.003] ^c	0.064 [0.003] ^c	0.065 [0.002] ^c	***
Half-life time (minutes)	24.8 [0.4]	30.6 [0.1] ^a	46.1 [0.4] ^a	45.2 [0.8] ^a	***
Maximal degradation (ODmax)	0.065 [0.002] ^c	0.106 [0.005] ^b	0.124 [0.003] ^b	0.122 [0.004] ^b	***
Maximal rate of digestion (ΔOD/h)	0.126 [0.003] ^b	0.163 [0.004] ^a	0.127 [0.002] ^b	0.126 [0.003] ^b	***
Time to maximal rate of digestion (minutes)	8.6 [0.2] ^c	10.6 [0.4] ^b	16.1 [0.5] ^a	15.7 [0.3] ^a	***
<i>In vitro</i> Trypsin/Chymotrypsin digestion					
Initial OD	0.088 [0.001] ^b	0.105 [0.002] ^b	0.086 [0.002] ^b	0.089 [0.003] ^b	***
Initial slope (ΔOD/h)	0.210 [0.006] ^c	0.363 [0.014] ^a	0.381 [0.008] ^{ab}	0.392 [0.009] ^{ab}	***
Half-life time (minutes)	6.4 [0.3] ^b	9.4 [0.6] ^a	13.3 [0.3] ^a	12.8 [0.5] ^a	***
Maximal degradation (ODmax)	0.09 [0.003] ^c	0.17 [0.01] ^b	0.21 [0.01] ^b	0.21 [0.01] ^b	***
Maximal rate of digestion (ΔOD/h)	0.67 [0.02] ^c	0.88 [0.03] ^b	0.77 [0.03] ^b	0.82 [0.03] ^{ab}	***
Time to maximal rate of digestion (minutes)	2.3 [0.1] ^b	3.4 [0.2] ^b	4.7 [0.4] ^a	4.5 [0.5] ^a	***



Digestion with Pepsin

- **Raw ODmax** negatively associated with 3 isoforms of actin, 3 isoforms of troponin T, myosin light chain, tubulin, α crystallin, HSP70, fructose biphosphatase, LDH and positively associated with calcineurin, calsarcin, glycerol 3 phosphate dehydrogenase and glucose pyrophosphorylase

- **Raw Maximal rate of digestion** negatively associated with troponin I (fast), 2 isoforms of actin, α crystallin, fructose biphosphatase, LDH and positively associated with calcineurin, calsarcin and sarculemin

Digestion with Trypsin/Chymotrypsin

- **Raw Initial OD** negatively associated with 3 isoforms of actin, β-actin, 2 isoforms of myosin light chain, 3 isoforms of troponin T (fast), troponin I, cypher3 tubulin, α crystallin, HSP70, fructose biphosphatase, and positively associated with calcineurin, calsarcin, 3 isoforms of troponin T, sarculemin, glycerol 3 phosphate dehydrogenase and glucose pyrophosphorylase

- **Raw Maximal rate of digestion** negatively associated with troponin I (fast),

- **70 °C Initial OD** negatively associated with fructose biphosphatase

- **70 °C ODmax** negatively associated with 2 isoforms of troponin T (fast) and glycerol 3 phosphate dehydrogenase

- **70 °C Maximal rate of digestion** negatively associated with myosin light chain and positively associated with actin

- **100 °C Initial OD** negatively associated with 2 isoforms of actin, tubulin, phosphoglycerate mutase, β-enolase, HSP and LDH and positively associated with calcineurin, troponin T

- **140 °C Initial slope** negatively associated with actin, 2 isoforms of troponin T (fast), troponin I

- **140 °C Maximal rate of digestion** negatively associated with actin

Digestion with Pepsin

- **Raw Initial slope and Maximal rate of digestion** positively associated with glutamate 3 DH, catechol O-methyltransferase, 2 isoforms of CK, DJ1 and ATP synthase

- **Raw ODmax** positively associated with glutamate 3DH, catechol methyl transferase, FABP3, 2 isoforms of CK, formyl glutathione hydrolase, DJ1, myoglobin, ATP synthase and negatively with transferrin

- **140 °C ODmax** positively associated with 2 isoforms of malate DH

- **140 °C Maximal rate of digestion** positively associated with 3 isoforms of malate DH

Digestion with Trypsin/Chymotrypsin

- **Raw Initial OD** positively associated with glutamate 3DH, catechol O-methyltransferase, glutathione S transferase, peroxiredoxin, FABP3, 3 isoforms of CK, 4 isoforms of malate DH, S-formylglutathione hydrolase, DJ1, myoglobin, ATP synthase

- **Raw ODmax** positively associated with S-formylglutathione hydrolase, SOD, nitritease

- **Raw Maximal rate of digestion** positively associated with 2 isoforms CK and DJ1

- **70 °C ODmax** negatively associated with 2 isoforms malate DH

- **100 °C Initial OD** positively associated with FABP3, 2 isoforms malate DH

- **140 °C Initial OD** positively associated with S-formylglutathione hydrolase, 2 isoforms CK and nitritease

- **140 °C ODmax** positively associated with S-formylglutathione hydrolase

- **140 °C Maximal rate of digestion** negatively associated with S-formylglutathione hydrolase



IN VITRO PEPSIN RATE OF DIGESTION INCREASED BY HEATING: ASSOCIATED PROTEOMIC MARKERS

Bax M-L.^{1,2}, Aubry L.¹, Ferreira C.¹, Gatellier P.¹, Sayd T.¹, Rémond D.², and Santé-Lhoutellier V.^{1*}

INRA, ¹UR370 QuaPA, ²UMR1019 UNH, 63122 Saint Genès Champanelle, France



CONSEIL RÉGIONAL
AUVERGNE

Ageing, Denaturation, Heating, *In Vitro* Digestion Rate, Oxidation, Proteome

1

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of ageing and heating on muscle protein *in vitro* pepsin digestion rate and to find proteomic markers associated with this parameter. This study demonstrated that a temperature of 70°C increased the *in vitro* pepsin digestion rate, unlike ageing. This can be possibly explained by the conformational changes of the proteins, leading to a better accessibility for the protease to its cutting sites. At this temperature, less protein oxidation was noted compared to lipid oxidation. Numerous spots were correlated to the *in vitro* pepsin digestion rate for the different conditions (raw, aged and heated meat).

2

INTRODUCTION

Nowadays consumers are aware of the impact of food on their health. The nutritional quality becomes an important factor in the choice of food, especially in a context of an increasing demand for more elaborated foodstuffs. Meat is a complex food product which undergoes numerous transformations before being consumed (maturation, preservation, mincing, cooking...). Technological processes alter both the biochemical composition and the structure of proteins, and hence may change their nutritional properties. Recent studies showed that meat cooked at high temperature induced oxidation by the formation of carbonyl groups, disulfide bridges and also protein denaturation. The aim of the study was to evaluate the effect of ageing and heating on muscle protein *in vitro* pepsin digestion rate and to find some proteomic markers associated with this parameter.

3

MATERIALS AND METHODS

- 12 pigs, muscle *Longissimus dorsi*
- **Sampling:** one day (Day 1) and 4 days (Day 4) after slaughter and frozen at -80 °C until analysis.
- **Heating procedure:**
 - Sample Day 4 heated at 70 °C during 30 minutes
 - Cooking loss
- **Protein:**
 - Total extract and myofibrillar protein hydrophobicity.
 - Protein oxidation: carbonyls.
 - Granulometry parameters: Particles number, EC diameter, circularity, aspect Feret ratio.
- **Lipid:**
 - Lipid oxidation: TBA-RS.
- **Glycogen:**
 - Determination of glycolytic potential, glycogen residual and lactate according to Monin & Sellier (1985)
- **Antioxidant status:**
 - Activities of SuperOxyde Dismutase and Catalase
- ***In vitro* rate of digestion:**
 - Digestion by pepsin (50 U/mg proteins) on myofibrillar sub-fraction
 - Kinetics of digestion: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 90, 120 min.
 - Measurements of liberated peptides in the supernatant $\lambda=280$ nm.
- **Proteomic analysis in raw meat (Day1):**
 - Extraction of myofibrillar proteins in a buffer containing 40mM Tris-HCl pH8, 2mM EDTA and a protease inhibitor cocktail at 4 °C. After centrifugation the pellet is dissolved in buffer containing 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, protease inhibitors, 0.1M EDTA, 1% DTT.
 - Bi-dimensional electrophoresis (Strips pH3-10NL, 11% SDS-PAGE gel)
 - Analysis and comparison profiles using Progenesis SameSpots.
- **Statistical analysis:**
 - ANOVA with SAS; ACP and Pearson correlation with Statistica

REFERENCES

Ashby, M.D. et al. (2003). *Food Quality and Preference*, 14, 277-288.
Bergmeyer, H.U. (1993). *Academic Press*, New York, pp. 1127, 1196, 1238, 1468.
Chib, I. et al. (2006). *Meat Science*, 74, 681-684.
Dalympik, R.H., & Hamm, R. (1973). *International Journal of Food Science & Technology*, 8, 439-444.
García-Segovia, P. et al. (2007). *Journal of Food Engineering*, 80, 81-88.

Gatellier, P. et al. (2004). *Meat Science*, 67, 338-344.
Kawabara, A. et al. (2008). *Meat Science*, 80, 982-996.
Lau, B.E. et al. (2009). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4903-23.
Lynch, S.M., & Frazer, B. (1993). *Journal of Lipid Research*, 34, 1745-1751.
Mercier, Y. et al. (1998). *Meat Science*, 48, 301-317.
Monin, G., & Sellier, P. (1985). *Meat Science*, 13, 49-63.

Oliver, C.N. et al. (1987). *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488-5491.

Primozyk, A. et al. (2001). *Food Chemistry*, 72, 142-147.
Renner, M. et al. (1996). *Meat Science*, 43, 111-121.
Santé-Lhoutellier, V. et al. (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1488-1494.
Santé-Lhoutellier, V. et al. (2008). *Meat Science*, 79, 777-783.
Sayd, T. et al. (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2732-737.

4

RESULTS AND DISCUSSION



Table 1: *In vitro* rate of proteins digestion by pepsin, physico-chemical and granulometry parameters, glycolytic potential, SOD and Catalase, TBA-RS and cooking loss of raw (Day 1 and Day 4) and on cooked *Longissimus dorsi* muscle (Day 4 - 70 °C).

	Raw meat		Cooked meat 30 min		p (raw vs. cooked)	p (day 1 vs. day 4)
	Day 1	Day 4	Day 4 - 70°C			
Pepsin rate of digestion (AODP 10h)	2.508 ± 0.051 ^a	2.526 ± 0.064 ^b	3.330 ± 0.096 ^b	NS	NS	<0.0001
Carbonyls (nmol of DMSO/mg of protein)	1.345 ± 0.017 ^a	1.923 ± 0.040 ^b	1.662 ± 0.057 ^b	NS	NS	0.0051
Total delipidated protein hydrophobicity (ug bound BPH)	181.216 ± 5.430 ^b	179.802 ± 5.655 ^b	228.717 ± 6.549 ^a	NS	NS	<0.0001
Myofibrillar protein hydrophobicity (ug bound BPH)	67.665 ± 3.094 ^b	61.667 ± 4.282 ^b	222.336 ± 3.679 ^a	NS	NS	<0.0001
Granulometry parameters						
Particles number	25294 ± 3323 ^{ab}	34916 ± 2690 ^a	16764 ± 4121 ^b	NS	NS	0.0030
EC Diameter (µm)	13.432 ± 0.280 ^a	13.597 ± 0.135 ^a	8.830 ± 0.232 ^b	NS	NS	<0.0001
Circularity	0.748 ± 0.008 ^c	0.788 ± 0.004 ^b	0.821 ± 0.008 ^a	NS	NS	0.0017
Aspect Feret Ratio	0.730 ± 0.004 ^b	0.752 ± 0.002 ^b	0.749 ± 0.005 ^a	NS	NS	NS
SOD (U.L.)	1.079 ± 0.056	1.259 ± 0.087		NS		
Catalase (nmol H ₂ O ₂ /min/mg post)	2080.9 ± 189	2134.4 ± 131.8		NS		
Glycolytic Potential (µmol/g)	110.450 ± 2.520	108.580 ± 4.754		NS		
Lactate (nmol/g lactate/g)	9.3222 ± 0.9131	8.253 ± 1.094		NS		
Lactate (µmol/g)	91.805 ± 1.879	92.074 ± 3.623		NS		
TBA-RS (mg MDA/kg of meat)	0.098 ± 0.025 ^a	0.263 ± 0.053 ^b	0.963 ± 0.161 ^a	NS	NS	<0.0001
Cooking loss (%)			21.51 ± 0.78			

Values are means ± SEM, p value from the ANOVA analysis. ^{a, b, c} Means show significant differences between treatment groups (p < 0.05).

Ageing increased protein oxidation (carbonyls +43%) and slightly shape parameters (circularity +5%, aspect Feret ratio +3%) but did not affect antioxidant status, glycolytic potential, protein hydrophobicity and lipid oxidation.

Heating treatment increased sharply protein hydrophobicity (+27% for total extract and +260% for myofibrillar proteins) and lipid oxidation (+266%) and steadily circularity (+4%). A decrease of protein oxidation (-14%) and shape parameters (particles number -52%, EC diameter -35%) were noted.

These parameters underlined aggregation phenomena induced by the heating treatment.

The *in vitro* rate of pepsin digestion was increased by 32% during heating treatment. The temperature of 70°C induced protein denaturation leading to conformational changes and to an increase of hydrophobic sites at the protein surface. This improved the accessibility for the pepsin to its cutting sites (the aromatic amino acids: Phe, Tyr, Trp) by favouring exposed hydrophobic sites.

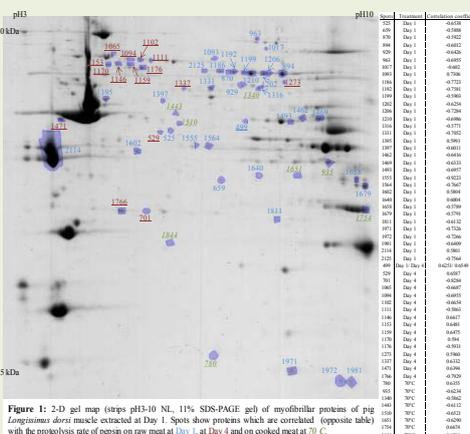


Figure 1: 2-D gel map (strips pH3-10 NL, 11% SDS-PAGE gel) of myofibrillar proteins of pig *Longissimus dorsi* muscle extracted at Day 1. Spots show proteins which are correlated (opposite table) with the proteolysis rate of pepsin on raw meat at Day 1, at Day 4 and on cooked meat at 70 °C.

57 spots: 34 (Day 1), 15 (Day 4) and 8 (70°C).

At Day 1 and Day 4:

- Spots positively correlated mostly found in the acidic zone of the gel (left part)
- Spots negatively correlated found in the basic zone of the gel.
- On the right part and spread from the top to the bottom → Day 1
- On the left corner → Day 4
- # 499 correlated with digestion rate at Day 1 and Day 4.
- No specific position → 70°C

The number of spots correlated with pepsin rate of digestion decreased with *post mortem* time and with heating treatment.

5

CONCLUSIONS

- This study demonstrated that a temperature of 70°C increased the *in vitro* pepsin digestion rate, of muscle proteins unlike ageing. This can be possibly explained by the conformational changes of the proteins, leading to a better access for the protease to its cutting sites.
- At the temperature of 70°C, less protein oxidation was noted compared to lipid oxidation.
- Numerous spots were correlated to the *in vitro* pepsin digestion rate for the different conditions (raw, aged and heated meat). Furthermore, the number of spots correlated with pepsin rate of digestion decreased with *post mortem* time and with heating treatment, which could be explained by *post mortem* modifications: proteolysis during ageing and protein denaturation after heating treatment.
- Identification of spots of interest is in progress.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded by the French Research National Agency (ANR) under the Program PRONUTRIAL (2010-2013), the FEDER and the Regional council of Auvergne.

Impact des procédés de transformation sur le devenir digestif des protéines de la viande

En France, la consommation de viande représente 1/3 des apports protéiques totaux. Les protéines carnées apportent tous les acides aminés indispensables, en quantité équilibrée par rapport aux besoins de l'Homme. La viande étant également une bonne source de vitamine B12 et de fer, son potentiel nutritionnel est très élevé. Ce potentiel pourrait cependant être modulé 1) par une digestion des protéines plus ou moins complète dans l'intestin grêle (digestibilité), déterminant la quantité d'acides aminés absorbés, 2) par une vitesse de digestion plus ou moins élevée, influençant la capacité d'assimilation des acides aminés absorbés. Les procédés de transformation impliqués dans la préparation des viandes peuvent générer des modifications physicochimiques des protéines. Leurs conséquences sur la mise à disposition des acides aminés constitutifs (quantité, cinétique) ont été peu étudiées.

Après avoir déterminé l'impact des opérations unitaires de transformation de la viande (maturation, hachage, cuisson) sur les caractéristiques biochimiques et structurales des protéines, les conséquences sur les paramètres de digestion ont été étudiées, *in vitro*, sur des extraits myofibrillaires, et *in vivo* en utilisant le miniporc comme modèle animal.

L'approche protéomique est utilisée, en parallèle, pour comparer la composition de muscles de porcs issus de modes d'élevage différents et étudier les corrélations avec la digestion. Plusieurs marqueurs protéiques des paramètres de digestion *in vitro* sont trouvés sur la viande maturée et cuite, et sont liés au processus de détoxification et de contraction musculaire.

La cuisson est le procédé qui a le plus d'impact sur les caractéristiques du produit prêt à consommer, l'application de températures croissantes (70, 100 et 140°C) se traduisant par une combinaison progressive de dénaturation, d'oxydation puis d'agrégation des protéines. Le développement d'un modèle de digestion *in vitro* (pepsine seule ou couplée à la trypsine/ α -chymotrypsine), sur des protéines myofibrillaires, a permis d'étudier les différents paramètres de digestion (vitesse initiale, vitesse maximale, temps d'obtention de la vitesse maximale, temps de demi-vie et dégradation maximale) pour les différents procédés. Maturation et hachage ont eu peu d'effets sur ces paramètres. Par contre, par rapport à la viande crue, la vitesse de digestion est supérieure pour une température de cuisson de 70°C, ce qui n'est plus le cas à partir de 100°C. Inversement le potentiel de dégradation maximale est plus élevé pour des températures supérieures à 100°C. La mise en relation des caractéristiques de la viande, avec les paramètres de digestion, suggère que pour des températures de cuisson de l'ordre de 70°C, la dénaturation des protéines favorise une dégradation rapide des protéines en accroissant l'accessibilité des sites de coupure pour les enzymes digestives, mais que pour des températures supérieures, l'oxydation conduit à des agrégats qui limitent cette accessibilité. L'étude *in vivo*, sur le miniporc, a confirmé cette hypothèse, la vitesse d'apparition des acides aminés dans le sang, suite à l'ingestion des viandes étant supérieure pour une température de cuisson à cœur de 75°C, par rapport à des cuissons à 60 ou 95°C. Par contre contrairement à ce qui était observé *in vitro*, l'utilisation de viande marquée avec un isotope stable (^{15}N), nous a permis de montrer que la température de cuisson n'affecte pas la quantité totale de protéines digérées dans l'intestin grêle (environ 95% des protéines ingérées).

En conclusion, parmi les opérations unitaires impliquées dans la préparation des viandes, la cuisson semble être celle qui influence le plus la digestion des protéines. L'équilibre entre les processus de dénaturation et d'oxydation des protéines en fonction de la température de cuisson semble être un point clé dans la détermination de la vitesse de digestion des protéines. Ce paramètre est important notamment dans le cadre de la nutrition des personnes âgées. Par contre, les compensations au cours des étapes de la digestion font que ces différences de vitesses ne se traduisent pas par des différences de digestibilité dans l'intestin grêle.

Mots clés: vitesse de digestion, digestibilité, procédés de transformation, viande, oxydation, agrégation.