



Identification de marqueurs protéomiques prédictifs de l'oxydation des viandes

Etude menée sur le protéome du muscle *Longissimus lumborum* de porc en vue de la prédiction de l'oxydation des protéines et des lipides lors de la conservation et de la cuisson de la viande

Mots-clés : Analyse protéomique, oxydation des protéines, oxydation des lipides

Auteurs : Philippe Gatellier ^{a*}, Thierry Sayd ^a, Aurélie Promeyrat ^a, Mylène Gobert ^a, Christophe Chambon ^b, Véronique Santé-Lhoutellier ^a

^a Unité Qualité des Produits Animaux et ^b Plateforme d'Exploration du Métabolisme ; INRA de Theix, 63122 Ceyrat

*E-mail de l'auteur correspondant : philippe.gatellier@clermont.inra.fr

Les résultats de cette étude montrent que l'analyse protéomique (électrophorèse bidimensionnelle, couplée à la spectrométrie de masse), réalisée sur des échantillons de muscle prélevés précocement après la mort de l'animal, est une technique prometteuse pour la prédiction de la stabilité oxydative des viandes. Ceci aussi bien lors de la conservation que de la cuisson des viandes.

Résumé :

Dans le but d'identifier des marqueurs précoces de l'oxydation des viandes, des analyses protéomiques ont été réalisées sur le muscle *Longissimus lumborum* de porc juste après l'abattage. L'étude a porté sur le protéome sarcoplasmique qui renferme les protéines impliquées dans la protection antioxydante et dans le stress oxydatif musculaire. La viande a été conservée 4 jours à l'air puis cuite à 100°C. Les niveaux d'expression de nombreuses protéines ont été corrélés significativement à l'oxydation des protéines et des lipides.

Abstract: Identification of proteomic markers for meat oxidation prediction

In order to identify early markers of meat oxidation, proteomic analyses were performed on the *Longissimus lumborum* muscle in pigs immediately after slaughter. This study focused on the sarcoplasmic proteome containing proteins involved in antioxidant protection and in muscle oxidative stress. Meat was stored for 4 days in air and then cooked at 100°C. Expression levels of numerous proteins were significantly related to the oxidation of proteins and lipids.

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les procédés de conservation et de transformation, comme la cuisson, la salaison ou le marinage, permettent de préserver et/ou d'améliorer les qualités microbiologiques et organoleptiques des viandes. Le développement d'arômes spécifiques dans les produits salés et cuits, les changements de couleur induits par les traitements thermiques, la destruction des germes pathogènes à haute température sont autant de qualités positives apportées par les traitements technologiques. Cependant, ces traitements peuvent aussi avoir un impact négatif sur certaines qualités des produits du fait d'une oxydation importante des protéines et des lipides. Le conditionnement sous atmosphère modifiée riche en oxygène, qui est de plus en plus pratiqué, et l'exposition à la lumière (au cours de la conservation en linéaire) favorisent aussi les processus oxydatifs.

Dans la viande, l'oxydation est due à la production d'espèces réactives de l'oxygène (les radicaux libres) catalysée par les métaux de transition, comme le cuivre et surtout le fer. Ce phénomène est connu sous le nom de stress oxydatif. L'impact de ces radicaux libres est d'autant plus fort que la protection antioxydante du muscle (enzymes antioxydantes endogènes et vitamines antioxydantes apportées par l'alimentation) diminue rapidement après la mort de l'animal.

Les radicaux libres attaquent en priorité les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés des lipides. L'oxydation des lipides conduit alors à la formation d'aldéhydes impliqués dans la dégradation de l'odeur et la flaveur des produits, notamment via l'apparition d'odeur de rance (Byrne *et al.*, 2001). Les radicaux libres vont aussi attaquer les protéines de la viande en ciblant certains acides aminés. Les acides aminés les plus sensibles à l'attaque radicalaire sont les acides aminés basiques et aromatiques ainsi que la cystéine (Gatellier *et al.*, 2009 ; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008). L'oxydation des protéines, en générant des agrégats peu solubles (Promeyrat *et al.*, 2010), va impacter de manière importante leurs propriétés technologiques comme l'émulsification, la gélification ou encore l'extraction de protéines d'intérêt. L'oxydation des protéines de la viande conduit à une perte de biodisponibilité des acides aminés, soit par dénaturation chimique de ces composés, soit par diminution de la digestibilité des protéines (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008). Ce phénomène, surtout lorsqu'il touche les acides aminés essentiels, va

impacter de manière négative la valeur nutritionnelle des viandes. La diminution de la vitesse de digestibilité des protéines, due à leur oxydation et à leur agrégation, peut aussi avoir des conséquences négatives en termes de santé humaine. Il a été démontré, dans plusieurs études, que l'accumulation et la fermentation dans le gros colon de protéines non digérées dans l'intestin grêle pouvaient conduire à la formation de produits potentiellement mutagènes comme les crésols et les phénols formés à partir de la tyrosine (Evenepoel *et al.*, 1998). Ces produits sont fortement soupçonnés d'être impliqués dans le cancer de l'intestin.

Pour assurer une qualité finale optimale des viandes et produits carnés il est donc indispensable de disposer d'outils permettant de maîtriser au mieux ces oxydations. Dans cette étude nous avons évalué l'utilisation de l'analyse protéomique pour identifier des marqueurs protéiques spécifiques utilisables dans des outils de prédiction de la sensibilité des viandes à l'oxydation. La protéomique (analyse d'un ensemble de protéines) a déjà été utilisée avec succès comme outil de prédiction de certaines qualités de la viande comme la tendreté (Laville *et al.*, 2007) et la couleur (Sayd *et al.*, 2006). En 2004, les travaux de Hwang avaient montré que l'analyse protéomique permettait de prédire les pertes d'eau à la conservation. Dans une revue récente, Picard *et al.* (2012) ont discuté les applications possibles de la protéomique dans l'amélioration des qualités de la viande et du poisson. L'identification de marqueurs précoces de l'oxydation permettrait aux industriels du secteur viande d'orienter les produits, selon leur susceptibilité oxydative, vers différents modes de conservation et/ou de transformation. Les viandes les plus sensibles à l'oxydation seraient alors destinées à l'appertisation, la salaison ou la confection de plats cuisinés alors que les viandes les plus stables pourraient être conservées réfrigérées en boucherie artisanale ou, après conditionnement en barquette, dans les linéaires de la grande distribution. Il serait aussi possible de donner aux industriels et aux consommateurs des recommandations quant aux traitements thermiques (couple temps/température) à appliquer pour la cuisson des viandes. Les viandes seraient alors orientées vers différents types de cuisson selon leur sensibilité oxydative en évitant, par exemple, d'exposer les viandes les plus sensibles à l'oxydation aux hautes températures (grillade, fritures...).

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel animal et traitement des échantillons

Cette étude a été réalisée sur 50 porcs mâles et femelles de race pure Large White. Les échantillons ont été prélevés sur le muscle *Longissimus lumborum* au niveau de la dernière côte. Pour l'analyse protéomique les échantillons (environ 5 grammes) ont été prélevés exactement 30 minutes après l'abattage, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Pour les mesures d'oxydation, des tranches de 120 grammes ont été prélevées 24 heures *post mortem* et conservées 3 jours supplémentaires en barquettes

I.2. Mesure des oxydations

L'oxydation des protéines a été évaluée par le dosage des carbonyles protéiques à l'aide du Dinitrophénylhydrazine selon la méthode d'Oliver *et al.* (1987) modifiée dans le cas des produits carnés par Mercier *et al.* (1998). La production

de carbonyles protéiques correspond à l'oxydation des acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine) et à l'oxydation de la thréonine.

L'oxydation des lipides a été évaluée par la mesure des substances réactives à l'acide Thio barbiturique (SR-TBA) selon la méthode de Lynch et Frei (1993) adaptée aux produits carnés par Mercier *et al.* (1998). Cette technique

permet d'évaluer la quantité d'aldéhydes non volatils produits lors de l'oxydation. Le principal aldéhyde produit dans les viandes étant le malondialdéhyde (MDA).

1.3. Analyse protéomique

Les protéines sarcoplasmiques ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle (Promeprat *et al.*, 2011) ; la première dimension permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique et la seconde dimension selon leur masse moléculaire (figure 1). La coloration des gels a été réalisée au bleu de Coomassie. Les images des gels 2D ont ensuite été enregistrées à l'aide d'un densitomètre GS-800 (BioRad) et analysées à l'aide du logiciel Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). La densité totale des spots a été mesurée puis corrélée (analyse de corrélation de Pearson sur xlstat) aux paramètres

d'oxydation mesurés après conservation et cuisson. Une corrélation est considérée comme significative au seuil de 5% ($p < 0.05$).

Les spots protéiques, dont la densité présentait des corrélations significatives avec les paramètres d'oxydation ont ensuite été prélevés et hydrolysés par la trypsine. L'analyse des peptides formés, qui permet l'identification des protéines, a été réalisée par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) sur la Plateforme d'Exploration du Métabolisme (composante protéomique) à l'INRA de Theix.

II. PRINCIPAUX RESULTATS

II.1. Niveaux d'oxydation induits par la conservation et la cuisson

Cette étude a montré une augmentation significative de l'oxydation des protéines et des lipides lors de la conservation et de la cuisson de la viande. Dans le cas de la conservation réfrigérée (J1-J4) le taux de carbonyles protéiques a augmenté de 55% ($P < 0,01$) et le taux de SR-TBA de 188% ($P < 0,001$). L'oxydation induite par la cuisson a été plus modérée puisque l'augmentation du taux

de carbonyles n'a été que de 15% ($P < 0,05$) et celui des SR-TBA de 37% ($P < 0,05$). Ceci pouvant s'expliquer par un temps de cuisson relativement court. Ces résultats étaient compatibles avec ceux obtenus dans différents types de viande et déjà publiés (Mercier *et al.*, 1998 ; Promeprat *et al.*, 2010).

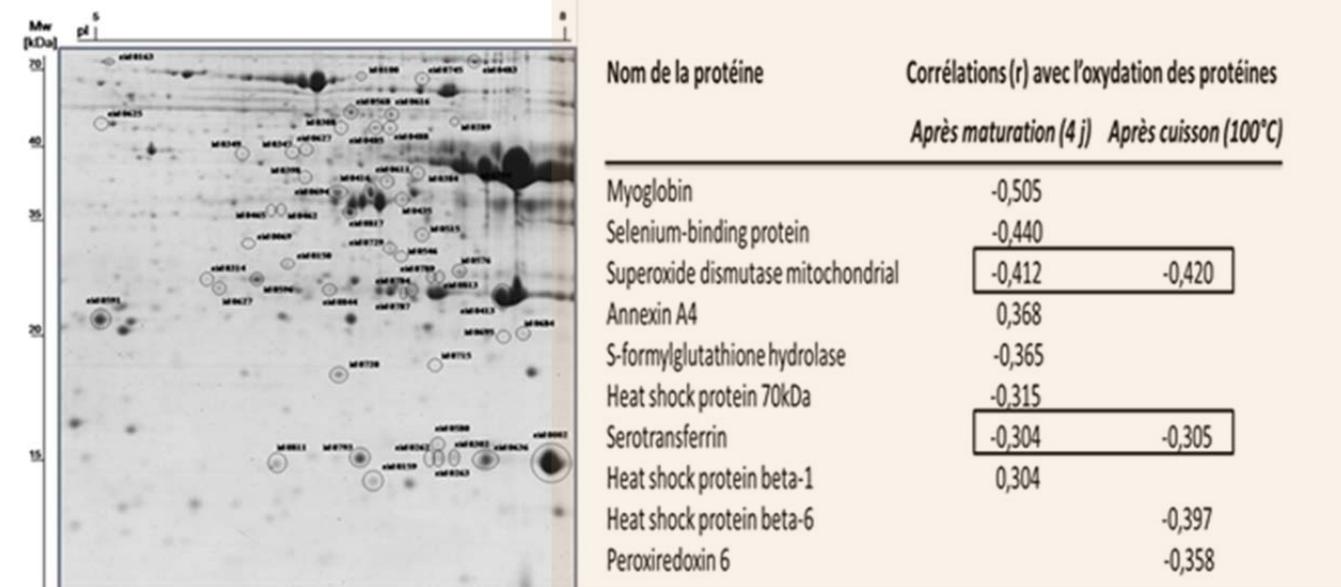
II.2. Détermination de marqueurs prédictifs de l'oxydation

Les résultats obtenus dans cette étude ont fait l'objet de deux publications. (1 : Promeprat *et al.*, 2011 et 2 : Sayd *et al.*, 2012).

Marqueurs prédictifs de l'oxydation des protéines : La première étude (1), portant sur le protéome musculaire et l'oxydation des protéines, a permis d'identifier 30 protéines significativement corrélées à l'oxydation en fin de maturation sur la viande crue et 19 après cuisson. La figure 1 répertorie quelques-uns des meilleurs marqueurs de l'oxydation des protéines. Parmi ces protéines nous avons

noté de nombreuses protéines associées à un ion métallique, comme la myoglobine et la sérotransferrine (associées à un atome de fer), la superoxide dismutase (associée au cuivre et au zinc) et une protéine de transport du sélénium. Ces protéines, par le métal qu'elles renferment, peuvent être associées à la protection antioxydante ou, au contraire, au stress oxydatif musculaire. Dans le cas des protéines de choc thermique (HSP), des corrélations positives et négatives ont été observées, rendant difficile l'interprétation de leur rôle dans les processus oxydatifs.

Figure 1 : Electrophorèse 2D réalisée sur les protéines sarcoplasmiques du muscle *Longissimus lumborum* de porc et corrélations mesurées entre l'intensité des spots et l'oxydation des protéines



Il est à noter que seules la SOD mitochondriale (enzyme antioxydante) et la sérotransferrine (protéine de transport du fer), qui présentent toutes les deux de fortes corrélations négatives avec le taux de carbonyles, peuvent servir de marqueurs de l'oxydation des protéines à la fois lors de la conservation et de la cuisson. De par ses coefficients de corrélation élevés, la SOD mitochondriale ressort comme le meilleur marqueur prédictif de l'oxydation des protéines dans la viande de porc.

Marqueurs prédictifs de l'oxydation des lipides : La seconde étude (2), portant sur le protéome musculaire et l'oxydation des lipides, a permis d'identifier 26 protéines corrélées à l'oxydation en fin de maturation et 12 après cuisson. Les meilleurs marqueurs prédictifs de l'oxydation des lipides étaient les redoxines (peroxyredoxine et thioredoxine) et les annexines (A4 et A5). Ces différentes

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'analyse protéomique s'avère particulièrement prometteuse pour l'identification de marqueurs de voies métaboliques pouvant expliquer les différences de stabilité oxydative des viandes. Sur le plan des connaissances scientifiques, les données acquises par l'analyse protéomique permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le stress oxydatif musculaire par l'identification des voies enzymatiques de propagation ou de contrôle de ces oxydations.

Différentes protéines impliquées dans le statu pro- ou antioxydant du muscle ont pu être corrélées significativement aux paramètres d'oxydation de la viande. Ces marqueurs protéiques prédictifs de l'oxydation, une fois validés sur d'autres échantillons, pourraient permettre la mise au point de tests immunologiques rapides de type ELISA (résultats disponibles en moins d'une heure pour un prix unitaire d'analyse d'une dizaine d'euros) permettant le tri précoce des carcasses à l'abattoir en vue de l'orientation

protéines sont impliquées à différents niveaux dans le stress oxydatif *post-mortem*. Les redoxines sont décrites dans la littérature, selon les conditions et le type d'organisme, soit comme agent pro-oxydant soit comme agent antioxydant (Simzar *et al.*, 2000). Pour Rhee *et al.* (2000) les annexines régulent la production de radicaux libres oxygénés et peuvent être considérées comme des protéines de stress oxydatif. Certaines enzymes de la respiration cellulaire (glycolyse, cycle de Krebs et chaîne de transport des électrons) et des transporteurs de lipides ont pu être aussi corrélés à la concentration en substances réactives au TBA. La peroxyredoxine 6 ($r = 0.382$ à la conservation et 0.323 à la cuisson) et l'annexine A4 ($r = -0.385$ à la conservation et -0.293 à la cuisson) sont les seuls marqueurs de l'oxydation des lipides à la fois lors de la conservation et de la cuisson de la viande.

vers les différents modes de distribution et de transformation.

Il est à noter que ces deux études n'ont pas pu mettre en évidence de marqueurs universels de l'oxydation des viandes. L'annexine A4 semble être un marqueur de l'oxydation des protéines et des lipides lors de la conservation alors que la peroxyredoxine 6 peut servir de marqueur de l'oxydation des protéines et des lipides lors de la cuisson. Cependant aucune protéine ne peut prédire les deux types d'oxydation à la fois à la conservation et à la cuisson. L'absence de marqueurs universels montre que les voies métaboliques mises en jeu diffèrent. Ainsi pour prédire de manière satisfaisante l'oxydation des lipides et des protéines, pour tout type de transformation, la combinaison de plusieurs protéines s'avère nécessaire. Ces résultats obtenus sur de la viande de porc restent bien sûr à confirmer d'une part dans d'autres types de muscles et d'autre part dans d'autres espèces animales et suite à d'autres modes de transformation.

Bibliographie

- Byrne, D.V., Bredie, W.L.P., Bak, L.S., Bertelsen, G., Martens, H., & Martens, M. (2001). Sensory and chemical analysis of cooked porcine meat patties in relation to warmed-over flavour and pre-slaughter stress. *Meat Science*, 59, 229-249.
- Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Maes, B., Hiele, M., Rutgeerts, P., & Ghoos, Y. (1998). Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein related to gastric acid suppression therapy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12, 10-11.
- Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S., Greve, E., Yoon, K., & Santé-Lhoutellier, V. (2009). Determination of aromatic amino acid content in cooked meat by derivative spectrophotometry: Implications for nutritional quality of meat. *Food Chemistry*, 114, 1074-1078.
- Hwang, I. (2004). Proteomics approach in meat science: A model study for Hunter L* value and drip loss. *Food Science and Biotechnology*, 13, 208-214.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Chambon, C., Damon, M., Larzul, C., Leroy, P., Glénisson, J., & Chérel, P. (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.
- Lynch, S.M., & Frei, B. (1993). Mechanisms of copper- and iron- dependent oxidative modification of human low-density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 34, 1745-1751.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Viau, M., Remignon, H., & Renner, M. (1998). Effect of dietary fat and vitamin E on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Science*, 48, 301-317.
- Oliver, C.N., Alin, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., & Stadtman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488-5491.
- Picard, B., Lefèvre, F., & Lebret, B. (2012). Meat and fish flesh quality improvement with proteomic applications. *Animal Frontiers*, 2, 18-25.
- Promeyrat, A., Gatellier, P., Lebret, B., Kajak-Siemaszko, K., Aubry, L., & Sante-Lhoutellier, V. (2010). Evaluation of protein aggregation in cooked meat. *Food Chemistry*, 121, 412-417.

Promeyrat, A., Sayd, T., Laville, E., Chambon, C., Lebet, B., & Gatellier, P. (2011). Early post-mortem sarcoplasmic proteome of porcine muscle related to protein oxidation. *Food Chemistry*, 127, 1097-1104.

Rhee, H.J., Kim, G.Y., Huh, J.W., & Kim, D.S. (2000). Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and sulfhydryl-reactive agent. *European Journal of Biochemistry*, 267, 3220-3225.

Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Grève, 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.

Sayd, T., Chambon, C., Laville, E., Lebet, B., Gilbert, H., Gatellier, P. (2012). Early post-mortem sarcoplasmic proteome of porcine muscle related to lipid oxidation in aged and cooked meat. *Food Chemistry*, 135, 2238-2244.

Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., Chérel, P., & Laville, E. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig *semitendinosus* muscle: Implication on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2732-2737.

Simzar, S., Ellyin, R., Shau, H., & Sarafian, T.A. (2000). Contrasting antioxidant and cytotoxic effects of peroxiredoxin I and II in PC12 and NIH3T3 cells. *Neurochemical Research*, 25, 1613-1621.

