

L'oxydation des produits carnés : Méthodes de mesure et moyens de maîtrise



Sommaire

Principe de l'oxydation des lipides et des protéines	1
1. Evaluation de l'oxydation des lipides	6
1.1. Inventaire des méthodes	6
1.1.1. Indice de peroxyde	6
1.1.2. TBARS ou indice TBARS	7
1.1.3. Mesure des composés volatils.....	10
1.1.4. Evaluation sensorielle.....	12
1.1.5. Autres méthodes.....	14
1.2. Résultats d'études	15
1.3. Synthèse et recommandations d'utilisation	16
2. Evaluation de l'oxydation des protéines	19
2.1. Inventaire des méthodes	19
2.1.1. Taux de thiols libres.....	19
2.1.2. Teneur en carbonyles totaux	20
2.1.2.1. Méthode à la DNPH.....	20
2.1.2.2. Méthode par chromatographie liquide – ionisation electrospray – spectrométrie de masse	21
2.1.3. Détermination de cross-links entre protéines (liaisons intermoléculaires covalentes).....	22
2.1.3.1. Détermination des ponts disulfures.....	22
2.1.3.2. Estimation de formation de dityrosine.....	23
2.1.3.3. Evaluation de la formation de cross-links protéiques par électrophorèse SDS-PAGE et Western Blot	23
2.2. Résultats d'études	24
2.3. Synthèse et recommandations d'utilisation	27
3. Moyens de maitrise de l'oxydation tout au long de la chaîne de fabrication des produits carnés :	28
3.1. Maitriser l'oxydation des matières premières.	28
3.2. Réduire l'oxydation lors de la transformation des viandes	29
3.3. Maitriser l'oxydation des produits transformés.	30
Conclusion	32
Bibliographie	34
Annexes	38

Principe de l'oxydation des lipides et des protéines

Introduction

L'oxydation des composés majeurs du muscle (lipides et protéines) constitue la cause la plus importante de dégradation de la qualité sensorielle et nutritionnelle des viandes, préparations de viandes et produits à base de viandes. Ces réactions d'oxydation provoquent des changements irréversibles sur le goût, la flaveur, la couleur, la texture des produits, aboutissant à une diminution de leur durée de vie. Les oxydations dans les viandes et les produits carnés sont principalement associées à la présence de radicaux libres qui provoquent la production de différents composants (comme des aldéhydes ou des cétones) responsables du développement de flaveurs désagréables et de changements de couleurs.

L'oxydation des lipides est reconnue comme un problème important lors de la conservation ou lors des procédés de transformation des produits carnés. La peroxydation des lipides, principalement des acides gras, est un enchaînement de réactions radicalaires décomposable en 3 étapes : l'initiation dans laquelle le fer de l'hème joue un rôle important, la propagation et la terminaison. Bien que l'oxydation des lipides puisse contribuer au développement de flaveurs agréables dans les viandes cuites, ce sont les aspects négatifs de l'oxydation des lipides qui prédominent, notamment les effets sur leurs qualités sensorielles et leur valeur nutritionnelle.

Concernant l'oxydation des protéines, des études récentes ont montré que les protéines musculaires pouvaient être altérées par des substances réactives à l'oxygène (ROS) provenant de la décomposition des acides gras insaturés (Xiong 2000).

Bien que les effets de l'oxydation des protéines dans les produits carnés ne soient pas complètement connus, de grands efforts ont été menés récemment pour élucider les mécanismes provoquant la dégradation oxydative des protéines du muscle. (Estevez 2008).

Pour lutter *in vivo* contre le stress oxydant, la cellule musculaire dispose de systèmes antioxydants liposolubles et hydrosolubles qui limitent ou annihilent les réactions radicalaires. Cependant, *post mortem*, la balance entre système pro et antioxydant penche vers l'oxydation pendant les phases de maturation des viandes, phénomène qui s'accroît durablement pendant les traitements technologiques ou pendant les étapes de conservation. Certaines opérations comme le morcellement (découpe, broyage, hachage) et les mélanges favorisent les réactions entre l'oxygène moléculaire et les acides gras insaturés, d'autres opérations comme la cuisson, la pasteurisation qui font intervenir des étapes à températures élevées accroissent l'étendue des réactions d'oxydation. Ce dernier point est d'autant plus d'actualité que la demande de produits carnés précuits ou de viandes cuites augmente.

Les analyses visant à mesurer l'oxydation des lipides ou des protéines sont utiles pour le développement de stratégies anti-oxydantes efficaces. Par exemple, les modifications de composition des muscles par l'alimentation en modifiant la composition en acides gras, par les suppléments en caroténoïdes et tocophérols (Lund et al 2011), par l'amélioration des formulations et des procédés de fabrications.

Le fer non héminique (NHI) est considéré comme le plus fort promoteur de l'oxydation dans les viandes, aussi en parallèle de l'estimation de l'oxydation, la connaissance des proportions des différentes formes chimiques du fer est très importante. L'augmentation de fer non héminique dans les viandes est une conséquence de la rupture de l'hème soit pendant la cuisson soit lors de sa conservation.

Oxydation des lipides

La peroxydation des lipides concerne principalement les acides gras polyinsaturés (AGPI), il s'agit de réactions radicalaires en 3 étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

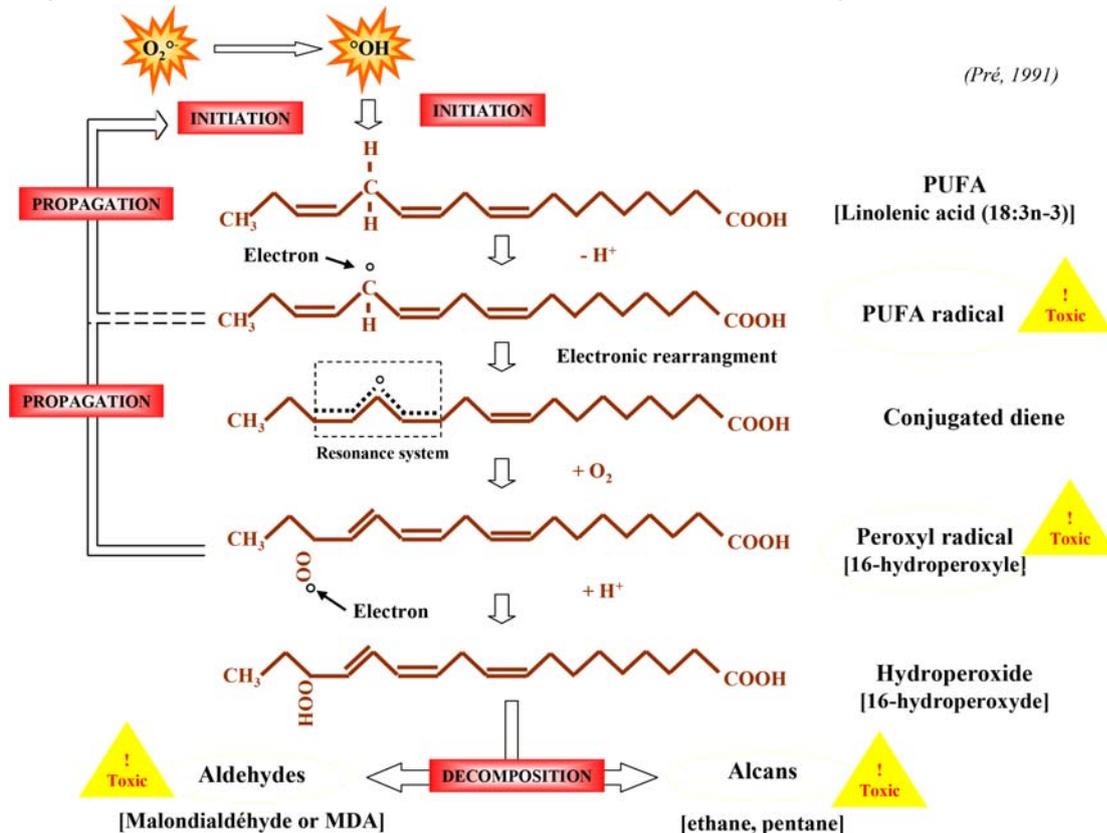
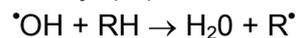


Figure 1 : Déroulement de l'oxydation des acides gras polyinsaturés.

L'initiation

En présence d'un initiateur, une ROS comprenant un radical avec oxygène ou un dérivé radicalaire ne contenant pas d'oxygène, un radical hydroxyle $^{\circ}OH$ par exemple, les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène provenant du groupement méthylène ($-CH_2-$) de l'acide gras pour former un radical alkyl (R°) ou radical libre lipidique :

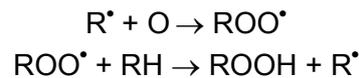


Les AGI insaturés sont d'autant plus facilement oxydés- susceptibilité à l'oxydation et la vitesse d'oxydation- que leur degré d'insaturation augmente.

La propagation

Les radicaux libres d'acides gras insaturés ainsi formés comportant un hydrogène instable réagissent très rapidement avec l'oxygène moléculaire (O_2) pour former des radicaux peroxy (ROO°) instables. Ces derniers réagissent avec une molécule lipidique (RH)

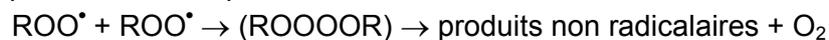
voisine pour former un hydroperoxyde (ROOH) et un nouveau radical alkyle (R^\bullet) qui assure la propagation de la réaction.



Les hydroperoxydes sont les produits les plus importants issus de la réaction initiale d'oxydation des lipides ; ce sont des espèces instables de nature très transitoires qui propagent au sein des matrices les initiateurs d'oxydation.

La terminaison

La dernière étape consiste en la formation de composés issus de l'association de deux espèces radicalaires pour former un produit non radicalaire stable. A la pression atmosphérique, la terminaison commence par la combinaison de 2 radicaux peroxydes (ROO^\bullet), la formation d'un composé intermédiaire tetroxyde instable suivi rapidement de sa décomposition pour former des produits non radicalaire.



La phase de terminaison conduit à la formation de différents produits terminaux dont des composés volatils (aldéhydes, alcools, cétones, furanes, etc) et des composés non volatils (oxy-monomères, oxy-dimères, etc.). La nature et la proportion des différents composés volatils formés dépendent de la nature des acides gras peroxydés, du type d'oxydation, des conditions du milieu (température, pH, présence de fer, etc.), de l'agent initiateur.

Oxydation des protéines

Comme les lipides, les protéines du muscle sont susceptibles de subir des réactions d'oxydation pouvant avoir des effets délétères sur la qualité de la viande.

L'oxydation des protéines est favorisée après la mort de l'animal par l'altération des systèmes de défense anti-oxydants, à savoir la perte d'activité des enzymes anti-oxydantes et la dégradation de molécules telles que la vitamine C.

L'oxydation des protéines est un phénomène complexe dans la mesure où les voies et les produits de l'oxydation dépendent des cibles et de la façon dont les réactions d'oxydation sont initiées.

L'initiation de l'oxydation des protéines dans les produits carnés semble être fonction de la présence de produits primaires et secondaires de l'oxydation des lipides, en particulier des hydroperoxydes et des aldéhydes.

Par ailleurs des ROS habituellement présentes dans les produits carnés comme $\bullet OH$, O_2^\bullet , RS^\bullet et ROO^\bullet , des cations de métaux (fer, cuivre) peuvent également catalyser la capture d'un atome d'hydrogène à partir du résidu d'un acide aminé et provoquer la formation d'un radical protéique (P^\bullet). Il est converti en radical peroxyde (POO) en présence d'oxygène, et en alkyle peroxyde (POOH) par capture d'un atome d'hydrogène à partir d'une autre molécule. Les réactions ultérieures avec H_2O^\bullet provoquent la formation d'un radical alcoyle (PO^\bullet) et son dérivé hydroxyle (POH) (Estevez 2008).

Les acides aminés hétérocycliques et ceux qui contiennent des chaînes latérales réactives (thiol, sulfhydryle, groupement imidazole, indole) sont les cibles communes.

Selon des études récentes, les protéines les plus sensibles à l'oxydation sont les protéines contenant des acides aminés soufrés, en particulier la **cystéine et la méthionine**.

L'oxydation des protéines par les radicaux libres concerne 3 classes d'acides aminés :

- les acides aminés basiques,
- les acides aminés soufrés,
- les acides aminés aromatiques.

Acides aminés basiques (lysine, histidine et l'arginine)

Les acides aminés basiques qui présentent des fonctions amines libres (NH ou NH₂) sur leurs chaînes latérales subissent une désamination oxydative en présence d'un radical hydroxyle, ou d'un métal comme le fer ou le cuivre, aboutissant à la formation de groupements carbonyles (CHO). Ces groupements carbonyles peuvent réagir avec les fonctions amines libres (non oxydées) de la lysine pour former des liaisons amides (-CO-NH-) (Morzel et al., 2006), impliquées dans les phénomènes de pontage des chaînes peptidiques entraînant la polymérisation ou l'agrégation des protéines entraînant une perte de fonctionnalité (Morzel et al., 2006 ; Santé-Lhoutellier et al., 2008a ; Promeprat et al., 2010).

La lysine étant un acide aminé essentiel son oxydation conduit à une perte de la valeur nutritionnelle des produits.

Acides aminés soufrés (cystéine, méthionine)

En présence d'oxygène, la méthionine va former de la méthionine sulfone (RS(O)₂CH₃) et de la méthionine sulfoxyde (RS(O)CH₃).

Les protéines comportant des cystéines avec des groupements SH libres sont également sensibles aux attaques radicalaires.

La réaction des résidus cystéine avec les radicaux [•]OH conduit principalement à la capture d'un hydrogène du groupement thiol. La dimérisation des radicaux thiols de la cystéine entraîne la formation des ponts disulfures (Cys-S-S-Cys) inter ou intra-chaînes peptidiques. Morzel et al. (2006) ont montré que les ponts disulfures entre deux radicaux thiols de protéines différentes peuvent conduire à l'agrégation des protéines et une réduction de fonctionnalité. Des études ont mis en évidence que les cross-links entre deux protéines myofibrillaires étaient principalement dus à la formation de ponts disulfures, et en moindre importance à la présence de dityrosine.

Acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et le tryptophane)

Les acides aminés aromatiques sont très sensibles à l'oxydation. Ainsi l'oxydation (hydroxylation) de leur noyau aromatique par le radical hydroxyle ([•]OH) conduit pour la phénylalanine à la formation de tyrosine, pour la tyrosine à de la dityrosine (Tyr-O-O-Tyr) et pour le tryptophane à de l'hydroxy-tryptophane. **La formation de molécules dityrosine se révèle être un marqueur discriminant de l'oxydation des myofibrilles** (Morzel 2006). La phénylalanine et le tryptophane sont des acides aminés essentiels, la tyrosine étant synthétisée à partir de la phénylalanine, l'oxydation de ces **3 acides aminés entraîne la diminution de la valeur nutritionnelle des produits carnés.**

L'oxydation peut également altérer la structure secondaire et tertiaire des protéines et augmenter l'hydrophobie de surface des protéines. Elle peut également provoquer la

formation d'agrégat via la formation de cross-links entre deux cystéines (pont disulfure) ou deux tyrosines (pont dityrosine).

En conditions oxydantes, l'interaction entre des protéines ou entre des protéines et d'autres molécules (MDA, HHE, HNE) peut également aboutir à la polymérisation (par exemple, les groupements carbonyles peuvent réagir sur les groupements amines libres pour former des liaisons amides inter chaînes peptidiques pouvant conduire à la polymérisation). Finalement une oxydation sévère peut provoquer la fragmentation des chaînes protéiques via l'attaque directe des ponts peptidiques par les radicaux libres.

L'oxydation des protéines peut toucher les chaînes latérales de certains acides aminés et/ou le squelette de ces protéines. Il peut en résulter des modifications des propriétés physiques des protéines comme la fragmentation, l'agrégation, l'altération de la solubilité.

Globalement, **l'altération protéique réduit leur pouvoir de rétention d'eau, leur pouvoir gélifiant, leur pouvoir émulsifiant et leur susceptibilité à la protéolyse.**

Dans les produits carnés, l'oxydation des protéines a été évaluée au travers de ses multiples manifestations chimiques. Les principales modifications chimiques connues touchant les acides aminés pendant l'oxydation sont :

- la formation de dérivés carbonyles
- la disparition de groupements thiol
- l'hydroxylation des dérivés aromatiques.
- la conversion d'un résidu d'un acide aminé en un autre.
- la formation d'agrégat via la mise en place de liaisons covalentes ou non-covalentes.

L'oxydation des protéines et des acides aminés est influencée par des facteurs environnementaux tels que le pH, la température, l'activité de l'eau, la présence de catalyseurs ou d'inhibiteurs. La structure tri-dimensionnelle des protéines et leurs compositions ont également une incidence sur leur sensibilité à l'oxydation.

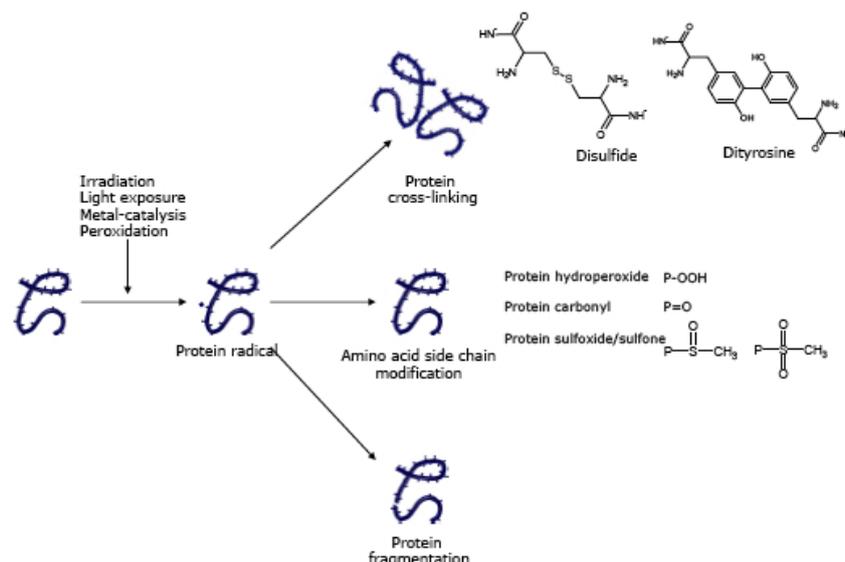


Figure 2 : Conséquence de l'oxydation des protéines (Ganhao, 2010)

1. Evaluation de l'oxydation des lipides

1.1. Inventaire des méthodes

Différentes méthodes d'analyse de l'état d'oxydation des viandes existent : l'Indice de peroxyde, l'Indice TBARS, l'Analyse des composés volatils issus de l'oxydation et l'Evaluation sensorielle.

1.1.1. Indice de peroxyde

Principe :

L'indice de peroxyde permet de quantifier les hydroperoxydes d'acides gras présents dans la matière grasse analysée.

Ces composés sont les produits primaires de l'oxydation des lipides. Par leurs caractéristiques labiles, transitoires, non responsables de goût spécifique, inodores et incolores, ces produits primaires de l'oxydation sont difficilement quantifiables (Ganhão, 2010).

Il existe cependant des méthodes de détermination de l'indice de peroxyde qui peuvent être utilisées soit pour de la matière grasse, soit pour un extrait lipidique obtenu à partir d'un produit transformé. La méthode la plus couramment employée pour déterminer l'indice de peroxyde est un **dosage titrimétrique par iodométrie** qui consiste en une réduction des groupements hydroperoxydes par des ions iodures (selon la norme NF T60-220 : Corps Gras d'origine animale et végétale : Détermination de l'Indice de Peroxyde).

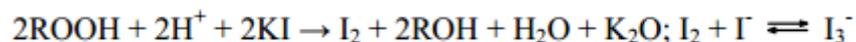


Figure 3 : Réaction d'oxydoréduction mise en œuvre pour le dosage des hydroperoxydes.

Intérêt :

La mesure de l'indice de peroxyde mesure la concentration de l'échantillon en composés primaires de l'oxydation. Elle permet de quantifier l'avancement de la première étape de l'oxydation des lipides. La quantification des hydroperoxydes d'acides gras apporte une vision de l'état oxydatif du produit dès les premières réactions d'oxydoréduction. La détermination de l'indice de peroxyde présente l'avantage d'être normalisée (NF T60-220) et spécifique des hydroperoxydes d'acides gras.

Limite(s) :

Cette méthode permet de détecter uniquement les produits primaires (et donc intermédiaires) formés au cours d'une peroxydation de la matière grasse.

Les hydroperoxydes sont des molécules thermosensibles : lors de la préparation de l'échantillon, celui-ci ne doit pas subir de chauffage excessif.

Une faible valeur d'hydroperoxydes n'est pas forcément synonyme d'un échantillon peu oxydé. En effet, au cours de l'oxydation, des réactions en chaînes ont lieu. Les hydroperoxydes formés vont être utilisés comme substrat pour les réactions suivantes. Pour pallier cette difficulté, il est conseillé de coupler cette analyse à une autre méthode de détermination de l'oxydation basée sur la quantification des composés secondaires (TBARS

ou mesure des composés volatils par exemple) pour avoir une vision globale de l'état d'oxydation du produit à analyser (ACTIA, 2005).

1.1.2. TBArS ou indice TBArS

Principe :

Les TBArS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) sont des coproduits formés au cours de la peroxydation des acides gras insaturés (acides gras de la série omega 3 et acides gras polyinsaturés de la série omega 6). Leur détermination permet de quantifier l'état d'oxydation des échantillons. Ces composés sont généralement stables et responsables d'odeurs, ils reflètent l'état d'oxydation de l'échantillon analysé.

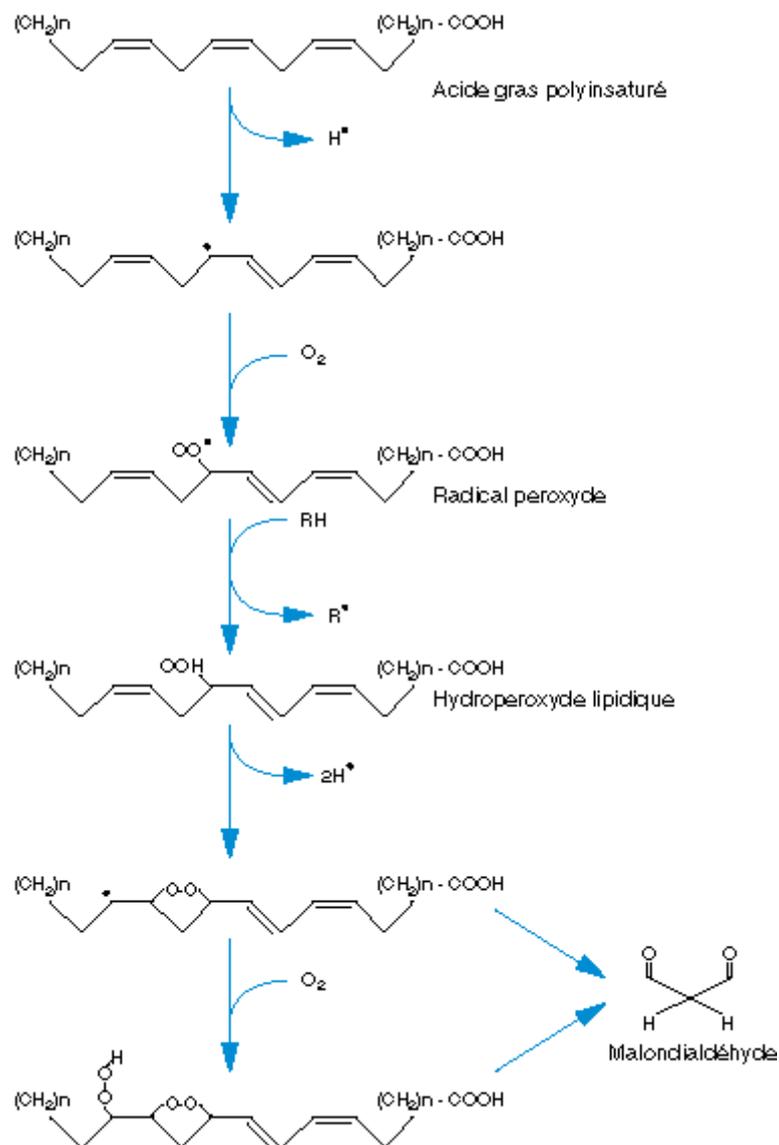


Figure 4 : Réactions de peroxydation des acides gras insaturés conduisant à la formation du malondialdéhyde.

L'indice TBArS correspond à une augmentation de l'absorbance mesurée à 530 nm suite à la réaction de l'échantillon et de l'acide 2-thiobarbiturique (Pokorny et Dieffenbacher, 1989).

Différentes méthodes d'extraction peuvent être employées. Les trois principales méthodes sont : l'extraction en milieu acide, l'extraction par distillation et les méthodes d'analyse directe de l'échantillon.

Selon le type d'extraction, la préparation de l'échantillon est adaptée pour la récupération des espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (TBAr) (Cf. annexe 1).

Sur les graisses pures, une méthode directe est utilisée (IUPAC 2.531) par dissolution de l'échantillon de lipide dans du butanol avant mise en présence d'acide thiobarbiturique (TBA). Au bout d'un temps de réaction de 45 minutes à 100°C, l'absorbance est mesurée à 530 nm.

La détermination de l'indice TBAr s'effectue à partir de courbes étalon qui sont déterminées par mesure de l'absorbance de solutions de concentration connue de TEP (1,1,3,3 tetraméthoxytetraéthoxypropane) (Raharjo et Sofos, 1993). Les tubes de dilutions servant à établir cette courbe doivent être traités en parallèle et dans les mêmes conditions que les tubes des échantillons (Ganhão *et al*, 2011). **Il s'agit d'une mesure relative. La valeur absolue ne doit pas être considérée comme représentant l'état de rancissement du produit** (Wrolstad *et al*, 2005).

La valeur de l'absorbance de l'échantillon est reportée sur la courbe étalon pour déterminer la concentration en malondialdéhyde (Cf. annexe 2). Les résultats sont exprimés en mg de malondialdéhyde/kg d'échantillon.

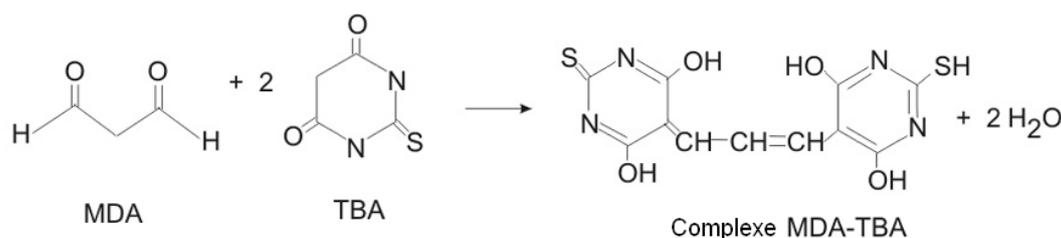


Figure 5 : Formation du complexe coloré Malondialdéhyde/Acide thiobarbiturique

Il n'existe pas dans la littérature de valeurs seuils d'indice TBAr, **toutefois, un produit contenant moins de 1 mg équivalent MDA/kg est généralement admis comme étant non oxydé**. Les analyses sont effectuées sur plusieurs échantillons. L'interprétation des résultats se fait par comparaison de mesures sur des produits différents (entre des essais de formulations différentes et des échantillons témoins).

Méthode par extraction en milieu acide

Cette méthode utilise une solution acide pour extraire les substances réactives à l'acide thiobarbiturique de l'échantillon. Différents protocoles ont été mis en œuvre utilisant plusieurs acides : l'acide perchlorique pour Tarladgis *et al* (1964) et Ganhão *et al* (2011) ou l'acide trichloroacétique et l'acide phosphorique pour Pegg (2001). Après l'extraction, la solution obtenue est filtrée. Une solution d'acide thiobarbiturique (TBA) est ajoutée au mélange réactionnel qui est incubé à 100°C avant mesure de l'absorbance.

Méthode par distillation

La méthode par distillation a été décrite par Tarladgis *et al* (1960) puis modifiée par Ganhão *et al* (2011). Les échantillons sont préparés par distillation en présence d'acide perchlorique. L'étape de distillation permet d'éliminer la plupart des molécules susceptibles d'interférer au cours de la réaction avec le TBA ou pendant la mesure de l'absorbance. Le distillat collecté

est mis en présence d'une solution de TBA, puis incubés à 100°C. Une mesure d'absorbance est alors réalisée. En 2001, Pegg a modifié le protocole et utilise l'acide chlorhydrique pour l'étape de distillation.

Méthode directe

La méthode TBARS directe est réalisable pour des échantillons d'huiles, de graisse ou sur des fractions lipidiques. Après récupération de la fraction lipidique si besoin (pour les produits complexes), l'échantillon est directement mis en contact avec une solution de TBA pour former le composé coloré. L'absorbance de la solution est ensuite mesurée.

Méthodes dérivées :

Des méthodes dérivées ont été développées pour pallier certains inconvénients des protocoles classiques. Par exemple, Guillevic (2009) a utilisé une méthode de mesure des TBARS dynamique pour tester la stabilité oxydative d'un produit en accélérant son vieillissement. Pour cela, un catalyseur de l'oxydation (FeSO_4) a été ajouté au milieu réactionnel, et les mesures de l'absorbance ont été réalisées à différents temps de réaction. Cette méthode permet de déterminer l'évolution de l'oxydation au cours du temps.

Intérêt :

Les méthodes TBARS permettent de quantifier **les produits secondaires de l'oxydation**. La mesure de TBARS n'est pas spécifique du malondialdéhyde mais permet la quantification de différents composés secondaires de l'oxydation.

Par le test TBA avec extraction à l'acide en milieu aqueux, l'auto-oxydation du produit en cours d'analyse est réduite car la préparation ne nécessite pas d'étape de chauffage (Wrolstad *et al*, 2005).

Si la mesure de l'absorbance est effectuée sur une solution aqueuse claire, le produit de la réaction colorée pourra être mesuré plus justement. La méthode par distillation, qui remplit cette condition, permet de minimiser les interférences dues à des composés non lipidiques (Ganhão, 2010).

Quel que soit la méthode de préparation de l'échantillon employée, certains auteurs recommandent une incubation plus longue à température ambiante pour minimiser les interférences dues à des réactions d'oxydation qui pourraient avoir lieu au cours du chauffage.

Limite(s) :

L'indice TBARS permet de quantifier la présence de malondialdéhyde mais il n'est pas rigoureusement spécifique de cette molécule (Wrolstad *et al*, 2005 ; Raharjo et Sofos, 1993). Des molécules non-oxydatives peuvent interférer sur la mesure. La valeur obtenue est fonction de la méthode employée.

Le principal inconvénient de l'extraction est que celle-ci n'est pas efficace s'il y a présence de protéines, de peptides, de pigments, d'acides aminés hydrosolubles dans l'échantillon. Ceux-ci seront également présents dans la solution d'extraction et pourront interférer pendant la mesure.

Dans le cas d'analyse de produits élaborés, **la présence de nitrites dans les échantillons peut créer des artefacts lors de l'analyse TBARS**. Par exemple, les nitrites peuvent influencer sur la turbidité des échantillons faussant ainsi le résultat obtenu. Selon Pegg et Shahidi (2000), la présence de nitrites est également susceptible d'interférer avec la mesure en

entraînant une nitrosation du malondialdéhyde pendant l'étape de distillation. Ceci le rend indisponible pour la réaction TBARS, entraînant ainsi une sous-estimation de la valeur obtenue.

Une addition de sulfanilamide permet une meilleure quantification du malondialdéhyde dans les produits fumés contenant du nitrite en limitant l'effet de ce dernier sur la mesure. Toutefois, la présence de sulfanilamide dans la solution entraîne une modification de l'absorbance du milieu, pouvant être responsable de sous-estimation de la mesure (Zipser et Watts, 1962). Les valeurs ainsi obtenues seront toujours inférieures à des valeurs obtenues sur une matrice sans nitrite ni sulfanilamide (Pegg et Shahidi, 2000). Izumimoto *et al.* (1997) ont comparé les méthodes TBARS par distillation et par extraction en présence de nitrite. La méthode par extraction permet une meilleure récupération des TBARS que la méthode par distillation : **une interférence de nitrite à 150 ppm peut être éliminée totalement par le protocole de TBARS par extraction.**

Le problème de la turbidité due à l'échantillon a été contourné par Juncher *et al* (2000). Leur protocole prend ce paramètre en compte par la mesure de l'absorbance à deux longueurs d'onde différentes. Après la préparation de l'échantillon, une première mesure à 600 nm détermine la turbidité due à l'échantillon ; une deuxième mesure à 532 nm correspond à l'absorbance habituellement mesurée lors des analyses TBARS. La différence d'absorbance ($A_{532nm} - A_{600nm}$) donne un résultat TBARS corrigé vis-à-vis de la turbidité due à l'échantillon.

D'après le rapport de l'étude sur l'évaluation de l'oxydation des lipides dans les produits carnés et les produits de la pêche conduite par le CTSCCV puis l'ITERG en 2006, les méthodes **TBA ne permettent pas d'obtenir une valeur absolue** du résultat. Par contre, **celles-ci sont utilisables dans le cadre de la réalisation d'essais comparatifs au sein d'un laboratoire donné et pour un produit donné.** Les limites de cette méthode sont la possibilité d'interférences avec la matrice, la qualité des réactifs, et une difficulté de réalisation dans le cas d'analyse d'une matrice peu oxydée.

1.1.3. Mesure des composés volatils

Principe :

Les réactions d'oxydation entraînent la création de composés volatils. L'analyse de ces composés volatils est un bon indicateur de l'état d'oxydation du produit. Le principal composé recherché est l'hexanal, qui est majoritaire dans les fractions volatiles des produits carnés (ACTIA, 2005). Des techniques de chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou de chromatographie liquide en phase gazeuse (GC) ont également été développées pour la détection et la mesure de malondialdéhyde libre dans la viande ou les tissus animaux (Raharjo et Sofos, 1993) (Cf. annexe 3). Actuellement, les composés volatils issus de l'oxydation sont principalement quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (Ross et Smith, 2006 ; Raharjo et Sofos, 1993).

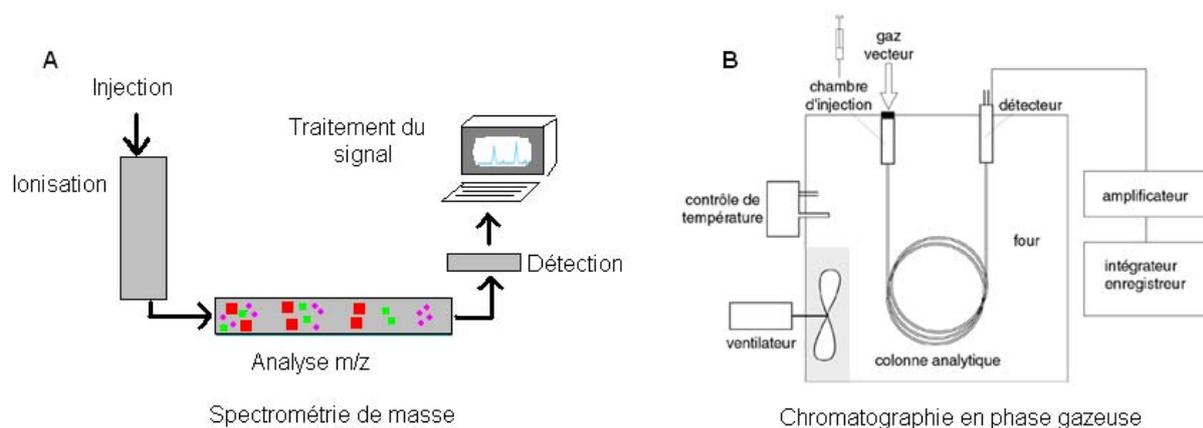


Figure 6 : Schéma des principes analytiques du spectromètre de masse (A) et de la chromatographie en phase gazeuse (B).

Les composés d'oxydation du cholestérol (dont les 3 principaux sont le 7-ketocholesterol, le 7 α -hydroxycholesterol et le 7 β -hydroxycholesterol) sont également des marqueurs d'oxydation des produits carnés. Ils peuvent être mesurés par les méthodes de chromatographie en phase gazeuse couplées à de la spectrométrie de masse (Buckley, 1995). Selon Petron *et al* (2003), le 7-ketocholesterol est considéré comme un marqueur intéressant d'oxydation des lipides car il est souvent retrouvé de façon prédominante par rapport aux autres composés issus de l'oxydation du cholestérol.

D'après le guide pratique pour l'évaluation de l'oxydation des lipides de l'ACTIA (2005), les trois techniques d'extraction couramment utilisées sont :

- le prélèvement dans l'espace libre statique,
- le prélèvement dans l'espace libre dynamique
- la micro-extraction en phase solide.

L'espace libre statique correspond à l'espace situé au-dessus de l'échantillon qui a été préalablement placé dans un récipient hermétique à une température donnée.

Pour analyser **l'espace libre dynamique**, un gaz inerte traverse l'échantillon de façon à entraîner les composés volatils présents sur la viande. Un système de capture permet de piéger les composés dans une cartouche avant d'être relâchés au moment de l'analyse. Par l'utilisation d'un gaz porteur (souvent l'hélium), la capture de composés moyennement ou faiblement volatils est possible. Un programme de montée en température par paliers est utilisé de façon à limiter au maximum l'auto-oxydation.

La micro-extraction en phase solide (SPME) a été développée plus récemment. Cette technique d'extraction est utilisée pour concentrer les composés volatils de l'échantillon avant la réalisation de l'analyse par chromatographie. L'échantillon est placé dans un flacon hermétique mis en équilibre à une température donnée. Une fibre de silice enveloppée d'un polymère absorbant est placée dans l'espace libre du flacon au-dessus de l'échantillon. La fibre absorbe ainsi les composés volatils qui seront ensuite désorbés directement dans la chambre d'injection d'un chromatographe. La technique de micro-extraction en phase solide a été utilisée dans plusieurs études pour évaluer l'oxydation des produits à base de viande (Ganhão, 2010).

Suite à la capture des composés volatils (dans l'espace libre statique, dynamique, ou par micro-extraction), une chromatographie en phase gazeuse ou une HPLC couplée à une spectrométrie de masse est réalisée pour détecter et quantifier les différentes molécules en présence. Quel que soit le protocole suivi, les conditions de l'analyse doivent être précisément établies pour assurer la répétabilité de la mesure (dans l'optique d'une comparaison des résultats de plusieurs échantillons). D'après Ganhão (2010), la SPME est de plus en plus utilisée du fait de sa simplicité de mise en place et de sa sensibilité.

Méthodes dérivées :

Un nez électronique peut être utilisé pour déterminer les composés volatils présents dans l'échantillon. Cet appareillage est conçu pour l'analyse par empreinte chimique ou par empreinte d'odeurs. Il est composé de trois modules : un système d'échantillonnage, un système de détection et un système de traitement des données. Selon Tikk *et al* (2008), cet outil offre une grande sensibilité vis-à-vis des produits de l'oxydation des lipides comme les aldéhydes et les cétones. Ce système peut être considéré comme une méthode rapide et potentiellement économique de détection des composés volatils.

Intérêt :

L'analyse par chromatographie des composés volatils permet de **détecter et quantifier les composés secondaires de l'oxydation présents dans un échantillon**. Les techniques de chromatographie sont utilisables **sur tous types de matrices** après adaptation de la méthode de capture en fonction de l'échantillon et de la sensibilité voulue : espace libre statique, dynamique... La chromatographie permet une **mesure rapide, automatisée et donc reproductible, et spécifique des molécules recherchées**.

De plus, les résultats obtenus par analyse des composés volatils (chromatographie en phase gazeuse (GC) ou HPLC) sont corrélables avec les résultats TBARS.

Limite(s) :

Les équipements de chromatographie (système de détection, de traitement des données...) doivent être **régulièrement étalonnés** pour s'assurer de la répétabilité des mesures. L'analyse de l'espace libre statique sous-estime les concentrations des composés volatils présents dans l'échantillon, L'utilisation d'un flux de gaz inerte (analyse de l'espace libre dynamique) permet de collecter des molécules présentes en plus faibles quantités. Cette technique qui permet une meilleure récupération des composés volatils est toutefois plus complexe à mettre en œuvre.

1.1.4. Evaluation sensorielle

Principe :

Les techniques d'évaluation sensorielle sont utilisables pour détecter les composés finaux de l'oxydation. Ces techniques permettent une évaluation de l'acceptabilité des produits à tester par les consommateurs (détection du goût de rance). Elles sont notamment utilisées pour définir les durées de vie sensorielle des produits permettant de fixer une DLUO.

Deux types d'essais sensoriels sont principalement conduits :

- Le **profil sensoriel** consiste à évaluer en qualité et en quantité la perception d'une ou plusieurs caractéristiques du produit. A chaque séance, un jury d'experts (sélectionnés et entraînés à reconnaître les caractéristiques à analyser) analyse un maximum de 5 produits. Chaque critère est évalué à l'aide de descripteurs de l'odeur et du goût du produit. La qualité des résultats obtenus est liée à l'entraînement des jurys (ACTIA 2005).
- Les **essais de positionnement** se déroulent également avec un panel entraîné. Contrairement au profil sensoriel, les produits sont présentés simultanément et l'ordre de dégustation est imposé (défini selon un plan d'expérience). Les produits sont évalués par différents descripteurs. Les membres du jury doivent soit effectuer des comparaisons par paires de produit (Quel est le produit ayant le caractère X le plus ou le moins marqué ?), soit un classement sur tous les produits (du plus au moins) ou encore attribuer une note à chaque produit selon l'intensité d'une caractéristique indépendamment des autres produits analysés (ACTIA, 2005).

Intérêt :

Les techniques d'évaluation sensorielle donnent une **description sensorielle globale** et non moléculaire des produits testés. L'ensemble des molécules issues de l'oxydation responsables (seules ou par interaction) de dégradations sensorielles du produit sont évaluées en un seul test.

L'analyse sensorielle donne un aperçu **de la perception consommateurs** des produits et des caractéristiques qui pourront influencer l'acceptation ou le rejet du produit.

Limite(s) :

La sélection des juges est un processus **long et très coûteux**. Elle s'effectue sur deux critères : leur capacité à discriminer et la répétabilité de leur notation. Les tests par des panels entraînés permettent une description précise du produit ainsi qu'une détermination des valeurs seuils des descripteurs liés à l'oxydation.

Les difficultés de réalisation d'analyses sensorielles sont d'uniformiser la notation de chacun des membres du jury et que chaque jury utilise le même vocabulaire pour les descripteurs. Plus le jury est entraîné, plus les résultats seront précis et répétables. Pour certains produits de formulation complexe, la caractéristique recherchée peut être masquée par d'autres odeurs ou goûts dus à la formulation ou au mode de préparation de l'aliment avant dégustation (ACTIA, 2005). La norme ISO 4121 présente les échelles de mesurage les plus fréquemment utilisées en analyse sensorielle ainsi que leur utilisation. Pour une description précise du produit, le panel de dégustateurs doit être familier avec le produit à caractériser et être capable de détecter les développements d'odeur ou de rancissement (Tikk *et al*, 2008).

1.1.5. Autres méthodes

La méthode Rancimat développée par Hador et Zurcher en 1974 est basée sur une oxydation accélérée du produit. Les analyses sont réalisées à température élevée en présence d'air selon la norme ISO 6886. Cette méthode permet de déterminer la stabilité oxydative des produits mais également de tester l'efficacité de molécules antioxydantes.

Des temps d'induction (temps nécessaire pour oxyder le produit) peuvent ensuite être prédits dans le cadre de scénarii de conservation classique.

Cet appareil permet donc d'étalonner des tests de vieillissement accélérés à partir de scénarii de conservation établis pour les produits.

La température d'analyse classique est de 120°C mais celle-ci peut varier en fonction du profil lipidique à analyser : une température de 100°C est préconisée pour de la graisse de porc (Metrohm).

Du fait de ces températures élevées, le test Rancimat n'est valable que pour des antioxydants thermostables, les antioxydants sensibles à la chaleur étant détruits ou inactivés pendant l'analyse. Cette méthode est comparative, elle ne permet pas d'obtenir de valeurs absolues sur l'état d'oxydation mais de comparer plusieurs échantillons entre eux notamment entre des produits avec antioxydants et des produits témoins.

Des équipements de laboratoire ont été développés pour étudier l'état d'oxydation de produits. **Les bombes thermostatées** à oxygène (Oxipres, Oxidograph par exemple) miment un vieillissement accéléré du produit en se positionnant à une température élevée et à forte pression en oxygène. Un capteur permet de suivre la pression en oxygène et donc la consommation d'oxygène au cours du temps dans l'environnement immédiat de l'échantillon (intérieur de la bombe). Cette méthode permet de déterminer trois paramètres à partir d'une même analyse :

- la capacité antioxydante du produit par la durée du temps d'induction avant l'initiation de la consommation d'oxygène ;
- la vitesse d'oxydation par la pente de la courbe de consommation d'oxygène ; et
- la consommation nette d'oxygène pouvant déterminer l'état d'avancement de l'oxydation entre un produit avec ou sans ajout d'antioxydants par exemple.

1.2. Résultats d'études

Les tableaux présentés ci-dessous regroupent, à titre d'exemples, des résultats de mesures de l'oxydation des lipides sur des viandes fraîches (tableau 1) et sur des produits transformés (tableau 2) en fonction de la méthode d'analyse employée. Ces valeurs sont issues de publications scientifiques.

Tableau 1 : Exemple de résultats de mesure de l'oxydation obtenus sur différentes matières premières ou viandes fraîches par différentes méthodes. Les valeurs suivies d'un astérisque sont des approximations faites à partir des graphiques présents dans les publications citées.

Publication	Méthode	Produit	Valeur
Pegg et Shahidi, 2000	TBARS	Cru sans nitrites	1.52 mg/kg
		Cru avec nitrites	0.85 mg/kg
Pegg et Shahidi, 2000	TBARS	Cru après 2 jours de stockage	2.48 mg/kg
		Idem avec nitrites	1.42 mg/kg
Broncano <i>et al</i> , 2009	TBARS (extraction)	Iberian pig <i>L. dorsii</i> cru	0.26 mg/kg
Guillevic <i>et al</i> , 2009	TBARS (dynamique)	Côtes de porc (J0)	0.1 mg/kg*

* Approximation d'après les graphiques de la publication citée.

Tableau 2 : Exemple de résultats de mesure de l'oxydation obtenus sur différents produits et par différentes méthodes. Les valeurs suivies d'un astérisque sont des approximations faites à partir de graphiques présents dans les publications citées.

Publication	Méthode	Produit	Valeur
Broncano <i>et al</i> , 2009	TBARS extraction	<i>L. dorsii</i> grillé	0,86 mg/kg
		<i>L. dorsii</i> frit	1,19 mg/kg
		<i>L. dorsii</i> cuisson micro-ondes	1,03 mg/kg
		<i>L. dorsii</i> roti	1,35 mg/kg
Pegg et Shahidi, 2000	TBARS	Cuit sans nitrites	1,83 mg/kg
		Cuit avec nitrites	0,72 mg/kg
Pegg et Shahidi, 2000	TBARS	Cuit après 2 jours de stockage	7,85 mg/kg
		Idem avec nitrites	1,64 mg/kg
Ganhão <i>et al</i> , 2011	TBARS extraction (20h à 24°C) <i>Idem</i> (45min à 100°C)	Steak haché de porc	0,6 mg/kg*
			0,8 mg/kg*
Ganhão <i>et al</i> , 2011	TBARS extraction (20h à 24°C) <i>Idem</i> (45min à 100°C)	Steak haché conservé	1,4 mg/kg*
		12jours	1,6 mg/kg*
Ganhão <i>et al</i> , 2011	TBARS distillation (20h à 24°C) <i>Idem</i> (45min à 100°C)	Steak haché de porc	0,4 mg/kg*
			0,3 mg/kg*
Ganhão <i>et al</i> , 2011	TBARS distillation (20h à 24°C) <i>Idem</i> (45min à 100°C)	Steak haché conservé	1,1 mg/kg*
		12jours	1,2 mg/kg*
Tikk <i>et al</i> , 2008	TBARS extraction	Boulette viande <i>L. dorsii</i>	1.4 mg/kg*
		Id <i>M. amembranosus</i>	1.4 mg/kg*

Publication	Méthode	Produit	Valeur
Guillevic <i>et al</i> , 2009	TBArs	Poitrine fumé	0.2 mg/kg*
Vestergaard <i>et al</i> , 1999	TBArs	Gras de jambon sec (12 mois)	5,5 mg/kg
	Indice peroxyde COPs (7-keto)		8.1 m _{éq} O ₂ /kg 1,1 mg/kg
Vestergaard <i>et al</i> , 1999	TBArs	Gras de jambon sec (24 mois)	2,0 mg/kg
	Indice de peroxyde		7,9 m _{éq} O ₂ /kg

* Approximation d'après les graphiques de la publication citée.

1.3. Synthèse et recommandations d'utilisation

L'oxydation des lipides est fortement liée aux autres procédés d'oxydation qui se déroulent au cours de la durée de vie d'un produit : l'oxydation de la myoglobine responsable de l'altération de la couleur du produit et de l'oxydation des protéines.

La mesure des composés issus de l'oxydation primaire des lipides n'est pas réalisable sur tous les types de produits carnés. En effet, les **hydroperoxydes** sont des composés transitoires qui sont ensuite transformés en d'autres composés dans les étapes suivantes de l'oxydation. Ils sont détruits en cours de cuisson. La détermination de l'indice de peroxyde n'est donc possible que pour des viandes fraîches ou des graisses, produits pour lesquels l'oxydation n'est pas avancée (Ganhão, 2010). Cette technique n'est pas utilisable pour des produits transformés.

TBArs : une technique simple largement appliquée sur les viandes mais à utiliser avec précaution sur les charcuteries :

Cette méthode permet d'avoir une vision relative de l'état d'oxydation du produit analysé. Différents protocoles ont été établis pour préparer l'échantillon avant analyse : extraction, distillation, analyse directe...

La détermination de l'indice TBArs a cependant les inconvénients de manquer de précision, de sensibilité, et de surestimer l'état d'oxydation du produit. Lorsque le protocole mis en place comporte une étape de chauffage, une oxydation peut avoir lieu au cours de celle-ci, ce qui entraînera une surestimation lors de la mesure. Ganhão *et al* (2011) ont comparé les résultats de tests TBArs obtenus sur des steaks hachés de porc selon différents protocoles : préparation des échantillons par extraction ou par distillation ; température et durée d'incubation après ajout du réactif (TBA). D'après leurs résultats, la méthode par extraction avec chauffage surestime les résultats obtenus du fait de l'apparition de composés colorés interférant qui durant l'étape de chauffage.

Le test TBArs par extraction ne peut pas être utilisé pour des échantillons comportant de fortes doses d'anthocyanine ou d'autres pigments provenant de fruits. Les molécules interférentes peuvent être éliminées, selon certains auteurs, par une extraction en phase solide, mais cette étape allonge le temps nécessaire pour obtenir le résultat et n'est pas envisageable en routine. Ganhão *et al* (2011) ont également étudié les méthodes de distillation pour tester leur efficacité à réduire les interférences présentes lors des tests par extraction. Dans le cas de présence de molécules interférentes, les différences de protocoles sur la température d'analyse (utilisation d'un bain-marie ou analyse à température ambiante) donnent d'après cette étude des résultats comparables.

Le malondialdéhyde peut réagir avec les nitrites présents dans les produits transformés à base de viande. Toutefois, après formation du complexe Malondialdéhyde-TBA, ce dernier reste stable malgré la présence de nitrite d'après Raharjo et Sofos (1993).

Des méthodes TBARS dynamiques peuvent être utilisées pour mesurer le potentiel d'oxydabilité des produits (fragilité oxydative). Ces méthodes consistent en la réalisation de plusieurs mesures TBARS à différents temps et au suivi de l'évolution de la concentration des substances réactives à l'acide thiobarbiturique au cours du temps.

D'après Tikk *et al* (2008), les résultats obtenus par la méthode TBARS et l'analyse sensorielle sont corrélables. Toutefois, l'indice TBARS augmente dans la viande de porc réchauffée en conséquence du temps de stockage au froid (développement de WOF : warmed over flavor). La même étude montre une corrélation significative et positive entre les résultats de l'analyse par le nez électronique, les qualificatifs utilisés par le panel au cours de l'analyse sensorielle et les concentrations de produits secondaires de l'oxydation des lipides.

Selon Raharjo et Sofos (1993), les méthodes TBARS sont souvent critiquées pour leur manque de spécificité et de sensibilité. L'utilisation d'une étape d'extraction en phase solide permet d'améliorer la spécificité et la limite de détection. Ces méthodes sont toutefois préférées du fait de leur simplicité de mise en œuvre. Les valeurs TBARS obtenues sont corrélables avec les autres méthodes de quantification du malondialdéhyde comme la chromatographie ou l'analyse sensorielle (Raharjo et Sofos, 1993 ; Ross et Smith, 2006 ; Tikk *et al*, 2008).

Les techniques de chromatographie en phase gazeuse ou liquide.

Elles présentent l'avantage de détecter des composés volatils présents même en faible concentration. Selon Ross et Smith (2006), ces techniques ont une haute sensibilité. L'analyse de l'espace libre statique rend possible la détermination de molécules à faible poids moléculaire. L'absence de gaz porteur demande d'attendre la mise en place d'un équilibre entre la matrice et l'espace gazeux qui sera analysé. L'utilisation d'un gaz porteur (analyse dynamique) offre un taux de récupération des composés volatils supérieur mais nécessite plus de temps pour un coût plus élevé. Les étapes de préparations des échantillons contiennent des étapes de chauffage ou d'extraction qui peuvent influencer sur leur statut oxydatif en entraînant la disparition de certains composés volatils ou une oxydation supplémentaire. La mesure des composés volatils est appropriée pour les matières premières et les viandes fraîches ainsi que pour les produits transformés.

L'**analyse sensorielle** peut être utilisée quelque soit le type de produit : viande fraîche, produits transformés... Cette méthode offre une description du produit du point de vue consommateur. Elle nécessite cependant un entraînement long et coûteux des membres du panel dans le cas d'études descriptives précises (évaluation de l'intensité des paramètres).

Le **choix de la méthode de mesure** de l'oxydation des lipides à utiliser doit donc être fait en fonction du type d'échantillon (figure 5) : La détermination des composés volatils et l'analyse sensorielle sont réalisables sur tous les produits ; A contrario, l'indice de peroxyde se mesure uniquement sur des graisses ou sur les fractions lipidiques et les TBARS sur des viandes fraîches et des matrices plus complexes (maigre et gras non dissociés, produits transformés (charcuteries...)).

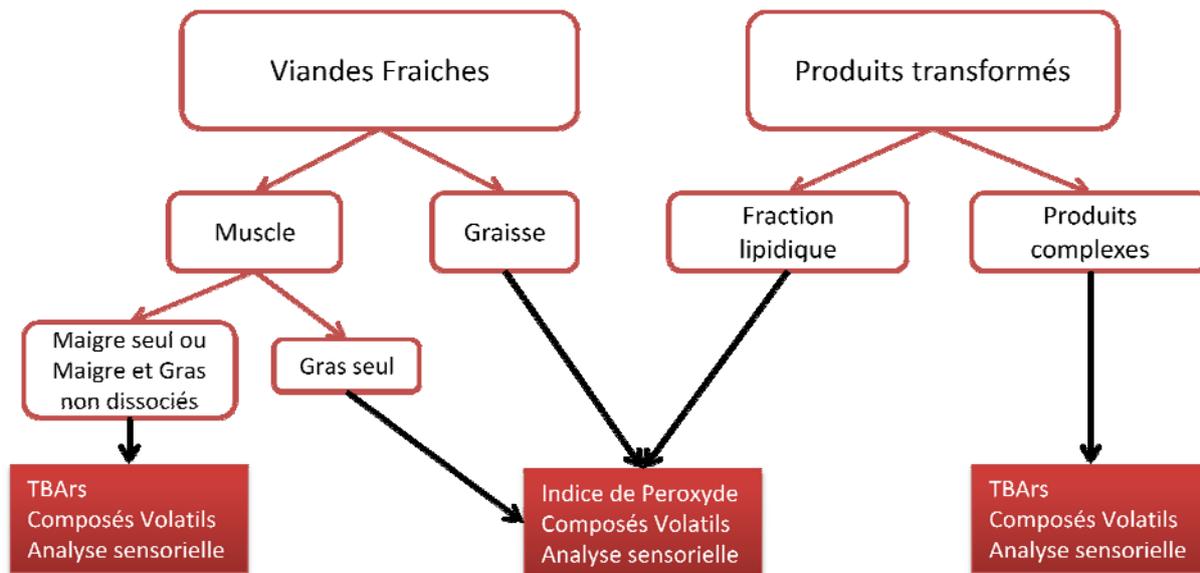


Figure 7 : Diagramme de choix de la méthode d'analyses en fonction du produit à analyser.

2. Evaluation de l'oxydation des protéines

2.1. Inventaire des méthodes

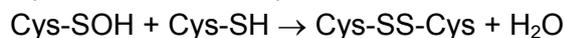
2.1.1. Taux de thiols libres

Principe :

La myosine contient environ 42 groupements thiols (SH), qui ont été démontrés comme étant très réactifs en présence des substances réactives à l'oxygène (ROS). En conditions oxydantes :

-l'oxydation des groupements thiols donne lieu à une série de réactions complexes aboutissant à la formation de différents produits oxydés en fonctions de la ROS impliquée :

Par exemple, en présence de peroxyde d'hydrogène, la cystéine peut être oxydée en acide sulfénique (Cys-SOH). L'acide sulfénique peut réagir avec une autre cystéine pour former une cystine (Cys-SS-Cys) à partir d'un pont disulfure :



Deux cystéines peuvent également en présence d'oxygène former une cystine :



- la méthionine est oxydée en méthionine sulfone et métonine sulfoxyde.

La perte des groupements SH libre dans les protéines musculaires est souvent utilisée comme un indicateur de l'oxydation des protéines (Mercier et al 1998, Morzel et al 2006, Haak et al 2006, Lund et al 2008, Gatellier et al 2010, Jia et al 2012).

La méthode originale développée par Ellman (1959) a été modifiée, les grandes lignes sont les suivantes :

Les protéines musculaires sont dissoutes dans un tampon tris-HCl contenant du SDS (dodécylsulfate de sodium), de l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) et parfois de l'urée (Morzel et al 2006). Un aliquote de la solution est incubée avec une solution d'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DNTB ou réactif d'Ellman). Le DTNB réagit avec le groupe thiol de la cystéine ou de la méthionine en formant un pont disulfure et en libérant l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) qui présente un pic d'absorbance à 412 nm. La mesure est réalisée à 412 nm avec un coefficient d'extinction de $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Jia et al 2012). Les conditions de mesure doivent être adaptées en présence de dénaturant comme l'urée. Par exemple Morzel et al proposent une mesure à 386 nm avec un coefficient d'extinction de $14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La formation de chaque molécule de TNB correspond à un groupement thiol présent initialement dans l'échantillon. La quantité de TNB formé permet ainsi d'évaluer le nombre de groupements thiols présents.

Les résultats sont exprimés en nano-moles de thiols libres par mg de protéines.

Intérêts

Méthodes faciles à mettre en œuvre. Données disponibles sur quelques produits carnés.

Limites

La réaction est sensible au pH, à l'oxydation et à la température. Elle doit être réalisée à pH neutre, à température fixe et parfois dans des conditions d'anaérobiose.

Par ailleurs il est nécessaire de prendre en compte la sensibilité du TNB aux différents ions des solutions tampons, à la présence d'agents dénaturants comme l'urée ou la guanidine et donc adapter le coefficient d'extinction aux conditions de réaction pour calculer le taux de thiols.

Les procédures figurant dans la littérature présentent des différences.

2.1.2. Teneur en carbonyles totaux

2.1.2.1. Méthode à la DNPH

Principe :

La méthode à la DNPH est une procédure de routine qui permet de quantifier la teneur totale en carbonyles d'un échantillon protéique. Les résultats sont fréquemment utilisés comme un index général de l'oxydation des protéines des viandes et des produits carnés. (Estevez et al 2008, Lund et al 2011).

Le principe de cette méthode est basé sur la réaction entre la 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) et les composés carbonyles pour former de la 2,4 dinitrophényl (DNP) hydrazone, complexe de couleur jaune qui présente un pic d'absorbance maximum à environ 370 nm. La procédure intègre la détermination simultanée de la teneur en protéines et de la teneur en carbonyles de l'échantillon. La concentration en DNP hydrazone est mesurée par spectrophotométrie sur la base d'une absorption de 21,0 M-1cm-1 (par fois 22,0) à 370 nm. La concentration en protéines est mesurée dans un échantillon de contrôle, sans ajout de DNPH, à 280 nm par rapport à un standard de sérum albumine bovine (BSA). Les résultats sont exprimés en nmol de DNP hydrazone par mg de protéine.

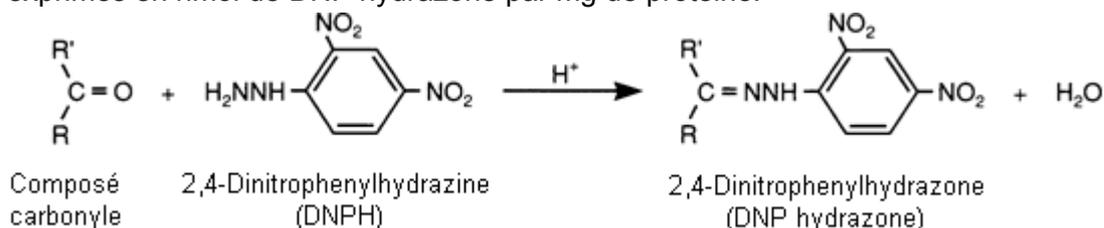


Figure 8 : Réaction mise en jeu pour le dosage des carbonyles totaux par la méthode au DNPH.

Les méthodes utilisées sont essentiellement basées sur celle décrite par Oliver et al en 1987 modifiée par Mercier et al 1998, ou Fagan et al 1994, ces derniers auteurs pour améliorer les performances de la méthode intègrent des lavages supplémentaires des culots de centrifugation avec une solution acétone – acide chlorhydrique pour éliminer les substances chromophores (hémoglobine, myoglobine) qui peuvent interférer avec les résultats. Traore (2011) et Gatellier (non publiée) pour éviter les artefacts réalisent le dosage des protéines et des groupements carbonyles sur la même quantité aliquote (cf. annexe 4)

Intérêts

Protocole simple et commode qui a permis une large diffusion de la méthode pour estimer l'oxydation des protéines.

Estevez et al (2008) estime que la méthode au DNPH est intéressante pour réaliser des études descriptives qui s'intéressent à l'occurrence de l'oxydation des protéines dans les produits carnés, dès lors que des techniques complémentaires comme la diminution des groupements thiols, la formation de cross-links, l'oxydation du tryptophane ... sont également mises en œuvre.

La méthode au DNPH a été utilisée dans de nombreuses études sur l'occurrence de la carbonylation des protéines en cours de procédé et du stockage des viandes et de produits carnés variés, permettant ainsi de disposer de nombreux résultats.

Limites

La teneur en carbonyles ne reflète pas avec précision l'étendue de l'oxydation des protéines dans la mesure où l'oxydation des protéines n'aboutit pas toujours à la formation de composés carbonyles. De plus, des composés carbonyles peuvent être présents dans des protéines via des mécanismes qui ne font pas intervenir l'oxydation des résidus d'acides aminés.

Ainsi, la méthode au DNPH sous-estimerait les dommages liés à l'oxydation des protéines et surestimerait la quantité des carbonyles. Par ailleurs, cette méthode manque de spécificité puisqu'elle ne s'intéresse pas à la nature exacte des produits d'oxydation. (Estevez et al 2008).

A la vue des résultats d'études, les traitements thermiques pratiqués pour la fabrication de la majorité des produits à base de viande ne devraient pas modifier les teneurs en carbonyles.

2.1.2.2. Méthode par chromatographie liquide – ionisation electrospray – spectrométrie de masse

Principe :

Compte tenu des limites de la méthode aux DNPH, des méthodes plus spécifiques ont été récemment envisagées, en particulier le dosage de l'acide glutamique γ -semialdéhyde (GGS, $\text{HOOC}-\text{HC}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}$) et l'acide α -aminoadipique semialdéhyde (AAS, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$), dérivés respectivement de l'oxydation de l'arginine et de la lysine.

Les standard GGS et AAS sont synthétisés in-vitro suivant la méthode décrite par Akagawa et al (2006), les GGS et AAS des échantillons sont dosés par chromatographie liquide – ionisation electrospray – spectrométrie de masse (LC-ESI-MS) après dérivatisation (Akagawa et al 2006, Estevez et al 2009).



Figure 9 : Formation des dérivés de l'oxydation de l'Arginine et de la Lysine

Armenteros et al (2009) ont appliqué cette méthode et comparé les résultats au dosage de DNPH sur de la viande hachée, du jambon sec, de la longe sèche, de la saucisse sèche, de la saucisse cuite et du pâté de foie. La méthode au DNPH a fourni des résultats par excès

dépendant de la teneur en lipides de l'aliment et de sa structure. Les dosages de AAS et GGS n'étaient pas dépendant de la composition ou de la structure des produits. L'ensemble AAS et GGS représenteraient environ 70% du total des composés carbonyles formés dans les protéines animales oxydées.

Ces auteurs concluaient que le GGS en particulier pourrait être utilisé comme un indicateur de l'oxydation des protéines.

La méthode (LC-ESI-MS) a également été mis en œuvre avec succès par Fuentes et al (2010) pour évaluer l'impact de traitement par haute pression et d'un stockage au froid sur du jambon sec.

2.1.3. Détermination de cross-links entre protéines (liaisons intermoléculaires covalentes)

La formation de ponts covalents entre acides aminés appartenant à différentes protéines et l'un des effets les plus marquants de l'oxydation des protéines. Trois méthodes sont particulièrement intéressantes pour l'évaluation de cross-links entre protéines dans les produits carnés :

- la détermination des ponts disulfures
- l'estimation de formation de bityrosine
- l'évaluation de la formation de cross-links de chaînes lourdes de myosine (CL-MHC).

2.1.3.1. Détermination des ponts disulfures

La méthode est basée sur la quantification de 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB) formé par la réaction de 2-nitro-5-thiosulfobenzoate (NTSB) avec des disulfures en présence d'un excès de sulfite de sodium. La solution de NTSB pour essai est préparée en traitant le réactif d'Ellman (DTNB) avec un excès de sulfite de sodium. La quantité de dérivé chromogène formé est déterminée par une mesure d'absorbance à 412 nm en utilisant un coefficient d'extinction de $13\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Cette méthode surestime la présence de ponts disulfures car le NTSB réagit également avec des groupements thiols libres. Pour améliorer la précision, le taux de groupements thiols est déterminé (en utilisant le réactif d'Ellman par exemple cf. dosage des thiols libres) et le résultat obtenu soustrait au précédent (Liu et al 2000). Une dénaturation préalable des protéines musculaires en utilisant un sel de guanidine est conseillée afin d'améliorer l'accessibilité des ponts disulfures (Estevez et al 2008).

Intérêts

Cette méthode est sensible, quantitative et facilement réalisable.

Limites

Le NTB réagit à la lumière d'où une rapide disparition de l'absorbance à 412 nm, par conséquent le développement à l'obscurité est conseillé.

Pas d'étude disponible sur des produits carnés.

2.1.3.2. Estimation de formation de dityrosine

L'oxydation de deux tyrosines proches conduit à la formation de dityrosine (Tyr-O-O-Tyr), sa détection est considérée comme un marqueur approprié pour l'estimation de l'oxydation des protéines dans les produits carnés (Morzel et al 2006). L'identification et la quantification de la dityrosine dans les hydrolysats de protéines musculaires sont en général réalisées par HPLC. Des essais ont été faits en mesurant la fluorescence par spectrofluorophotométrie à 420 nm après une excitation à 325 nm (Morzel et al 2006).

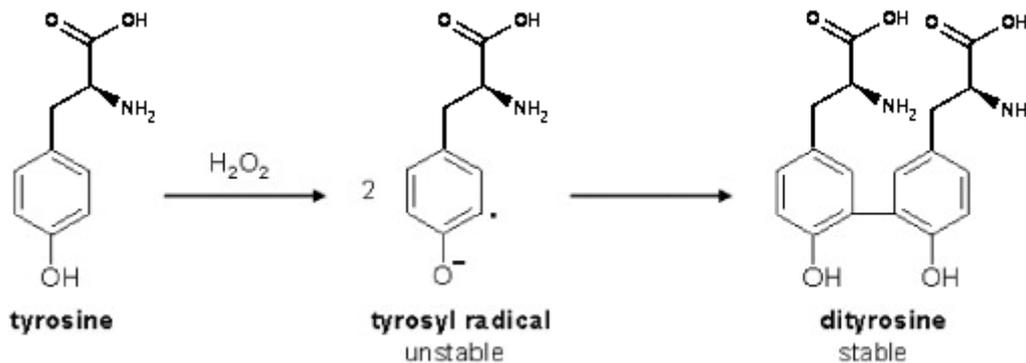


Figure 10 : Formation de Dityrosine

Limites

Peu d'études disponibles

2.1.3.3. Evaluation de la formation de cross-links protéiques par électrophorèse SDS-PAGE et Western Blot

La formation de cross-links entre protéines peut être évaluée par détection des chaînes lourdes de myosine avec cross-link (CL-MHC) par électrophorèse. Par électrophorèse SDS-PAGE, les protéines oxydées apparaissent sur une bande correspondant à un poids moléculaire supérieur à 500kDa. Cette bande a été identifiée à des CL-MHC par spectroscopie de masse, elle est en général attribuée à la formation de ponts bisulfures (Lund et al 2007). Traore et al (2012) ont également mis en œuvre une électrophorèse SDS-PAGE et Western Blot pour détecter et quantifier la myosine oxydée et l'actine oxydée après extraction des protéines myofibrillaires extraites de *longissimus thoracis* de porc cru ou cuit à 100°C à 10 ou 30 min. Ils ont mis en évidence une augmentation significative de la quantité de myosine oxydée résultant de la cuisson et de la durée de la cuisson.

Limites

Peu d'études disponibles pour le moment, sur viande crues ou cuites.

Pas d'étude sur les produits à base de viandes.

Nécessité d'une extraction préalable de myofibrilles.

2.2. Résultats d'études

Tableau 3 : Résultats de mesure de l'oxydation des protéines sur différentes matrices. Les résultats de dosages des carbonyles sont exprimés en nmol de DNPH / mg de protéine.

Publication	Technologie / roduit	Méthode	Valeur
Mercier et al 1998	Origine muscle M pectoralis, M sartorius de dinde Régime alimentaire , avec ou sans Vitamine E	Carbonyles Oliver et al 1987, modification originale	A 9 jours : Effet régime alimentaire huile de soja > 3,2 , huile de colza <1,4
		Groupement thiols méthode originale	Effet positif ($p < 0,05$) d'une supplémentation en vit E pour le M. sartorius
			Effet régime alimentaire huile de soja > 119,8, huile de colza <95,1
Lund et al 2008	Viande de porc hachée Durée de conservation	Carbonyles - Fagan et al 1994	Pas d'effet sur le taux de carbonyles 0,72 à 0,93 le jour de la fabrication et de 0,77 à 0,95 a 7 jours de conservation
		Groupement thiols méthode de Ellman 1959	
Jia et al 2012	Viande de porc hachée (sel, avec ou sans antioxydant) Formulation Durée de conservation	Carbonyl Levine et al 1990	Augmentation pendant la durée de stockage entre 1 et 9 jours, l'incorporation d'extrait de cassis a 10 et 20 g/ kg diminue la teneur en carbonyles par rapport au témoin à 6 et 9 jours de conservation, $p < 0,05$
		Groupement thiol Ellman's 1959	Diminution avec l'incorporation de cassis, mais $p = NS$.

Publication	Technologie / produit	Méthode	Valeur
Utrera et al 2011	Burger (haché) (Longissimus dorsi, bardière, eau, sel) Cuisson 170°C, 18 min four ventilé Cuisson et conservation 15 j à 4°C	Carbonyls Oliver et al 1987 modifiée – DNPH Dérivatisation, HPLC et mesure par fluorescence acide glutamique γ -semialdéhyde GGS) acide alpha aminoadipique (AAS) semialdéhyde, carbonyles estimés par leur somme	Cru : 1,31±0,34 Cuit : 1,87±0,32 Cuit et conservé : 3,42±0,66 p < 0,01 Cru : 0,4±0,07 Cuit : 1,14±0,20 Cuit et conservé : 1,68±0,22 p < 0,01 somme des 2 acides représente env. 70% des carbonyles
Ganhao 2011	Burger (haché) cuisson four ventilé 18 min à 170°C pour atteindre 73°C Durée de conservation	Carbonyles Oliver et al 1987 modifiée	Sans antioxydant : - J1 : 3,68 - J4 : 5,70 - J8 : 6,30 - J12 : 9,52 p<0,05
Gatellier et al 2008	Longissimus Thoracis de bœuf Cuisson 0 à 5 minutes à 90°C ou 150°C	Carbonyles DNPH Oliver et al 1987 modifiée par Mercier et al 1998 Thiols libres (Winterbourn 1990)	Cuisson à 90°C le taux de carbonyles reste d'environ 3 jusqu' à 5 min p=NS Cuisson, à 150°C il augmente à partir de 3 min – env 5 et dépasse 14 à 5 min p<0,001 Thiols : effet significatif (p<0,05) du temps de cuisson, pas d'effet de la température de cuisson
Gatellier et al 2010	Muscle de bœuf Cuisson (temps température)	Carbonyles Oliver et al 1987 modifiée par Mercier et al 1998 Acides aminés aromatiques Gatellier et al 1998 (phe, try, tyr) Thiols libres. DNTB Ellmann modifiée Morzelle et al 2006	2* sur muscle cru 2 – 3* avec cuisson de 65°C ou 96°C, temps de cuisson de 30 à 300 s ; Supérieur à 8* avec cuisson de 123-207°C p<0,001 Try, Phe : NS Tyrosine p<0,001 Thiol : NS

Publication	Technologie / produit	Méthode	Valeur
Traore et al 2012a	Longissimus thoracis de porc myofibrilles isolées Cuisson Cru vs cuit	Carbonyles Oliver et al 1987 modifiée par Mercier et al 1998 Western Blot méthode originale Agrégation des protéines –méthode original Hydrophobie de surface des protéines Chelh et al 2006	Cru : 1,52c±0,06, Cuit 10mn : 2,20b±0,06 Cuit 30 mn : 2,78a±0,09 P : 0 ,0001 Augmentation de la quantité de myosine oxydée cru>cuit 10 mn>cuit 30 mn Agrégats protéiques Cru 178a±37 Cuit 10 mn : 792b±27 Cuit 30 mn : 820b±23 P : 0,0001
Traore et al 2012 b	Longissimus thoracis de porc 3 classe de pouvoir de rétention en eau (<2,6, <4%, ≥4%) Cuisson (5 g 100°C , 30 min	Carbonyles Oliver et al 1987 modifiée par Mercier et al 1998 Western Blot méthode originale : agrégats oxydés	En fonction de la classe de pouvoir de rétention en eau (faible moyenne et haute) Cru : 2,02±0,8 / 1,96±0,06 / 1,99±0,09 p : NS Cuit : 3,27±0,31 / 4,41±0,36 / 6,17±0,35 p < 0,05 p < 0,01
Ventanas et al 2006	Longissimus dorsi Séchage – maturation	Carbonyles - Oliver et al 1987 modifiée	LD frais 1,03-1,56 LD séché mûré 1,38-2,43
Sun et al 2011	Protéines sarcoplasmiques de saucisses cantonaises Etapas du procédé Etuvage, fermentation	Carbonyles Oliver et al 1987, modifiée Agrégation des protéines – méthode originale Digestibilité in vitro par trypsine et α- chymotrypsine– méthode Santé Loutheillier 2007 modifiée Protéolyse	Témoin : 0,97 Début de fabrication : 1,09 Fin de fabrication 5,16 p<0,05 p<0,05 p<0,05 p<0,05

Publication	Technologie / produit	Méthode	Valeur
Etsevez et Cava 2004	Pâté de foie Génétique Hachage , cuisson, conservation froid 0, 30, 60, 90 jours	Carbonyles - Oliver et al 1987 modifiée-	porc standard : entre 0 et 90 j on passe de 5,6 à 22,5 et porc ibérique de 2,88 à 22,49 sur la même période. Augmentation surtout entre 60 et 90 jours p<0,05
Estevez et al 2007	Saucisse de Francfort (Broyage, Cuisson) Durée de conservation Génétique, système d'élevage	Carbonyles - Oliver et al 1987 modifiée	Augmentation des carbonyles entre 0 et 60 jours - suivant l'origine des matières premières 3,7 à 5,4 ; 5,5 à 6,5 ; 3,2 à 4,8 p<0,05
Armenteros et al 2009	Produits carnés du marché Jambon sec Longe séchée Saucisse sèche Viande hachée Saucisse cuite Pâté de foie	Carbonyles méthode de Oliver et al 1987 modifiée par Lund et al 2007) Analyse de AAS et GGs par LC-ESI-MS	Jambon sec : 8* Longe séchée : 8* Saucisse sèche : 9* Viande hachée : 3* Saucisse cuite : 13* Pâté de foie : 7* AAS ; GGS Jambon sec : 22* ; 150* Longe sec. : 22* ; 115* Saucis. Sèc. : 20* ; 120* Viande hachée : 28* ; 28* Saucisse cuite : 28* ; 52* Pâté de foie : 25* ; 75*

* Les valeurs sont des approximations faites à partir des histogrammes présents dans les publications citées

2.3. Synthèse

L'oxydation des protéines du muscle peut intervenir pendant le stockage ou les étapes de fabrication des produits à base de viande, elle résulte de l'action des différents facteurs pro-oxydants tels que les produits d'oxydation des lipides, les espèces réactives à l'oxygène, les cations métalliques, la chaleur.

Les acides aminés cibles sont en particulier ceux contenant un noyau hétérocyclique ou un groupement OH-, S- ou N-, notamment la cystéine et la méthionine.

Les dommages oxydatifs peuvent avoir comme résultats la polymérisation ou l'agrégation par des liaisons covalente ou non-covalentes des protéines myofibrillaires, la formation de groupements carbonyles, l'oxydation des groupements thiols, l'hydroxylation des acides aminés aromatiques.

Les méthodes d'estimation de l'oxydation des protéines sont applicables sur la viande, les préparations de viande et les produits à base de viande, en revanche les différentes méthodes disponibles ne mettent pas en évidence les mêmes modifications (cf. Tableau 4)

Tableau 4 :Méthodes de détection des modifications résultantes de l'oxydation des protéines

Modifications recherchées	Méthodes	Références
Origine muscle M pectoralis, M sartorius de dinde Régime alimentaire , avec ou sans Vitamine E	Carbonyles Oliver et al 1987, modification originale	A 9 jours : Effet régime alimentaire huile de soja > 3,2 , huile de colza <1,4
Dégradation groupements thiols	Thiols libres	Ellman 1959 modifiée par Morzel <i>et al</i> 2006
Formation Groupements carbonyles	DNPH	Oliver <i>et al</i> 1987 modifiée par Mercier <i>et al</i> 1998
Cross links entre protéines - pont disulfure - dityrosine - chaînes lourdes de myosine	- quantification NTB - HPLC, mesure de fluorescence - électrophorèse SDS-PAGE et Western blot	- Liu <i>et al</i> 2000 - Morzel <i>et al</i> 2008 - Lund <i>et al</i> 2007, Troare <i>et al</i> 2012
Semi-aldéhydes GGS et AAS (acide glutamique γ -semialdéhyde ; α -aminoadipique semialdéhyde)	LC-ESI-MS (chromatographie liquide, ionisation electrospray et spétrométrie de masse)	Armenteros <i>et al</i> 2009

3. Moyens de maitrise de l'oxydation tout au long de la chaine de fabrication des produits carnés :

3.1. Maitriser l'oxydation des matières premières.

Au niveau de l'abattoir et des salles de découpe, des mesures simples peuvent être mises en place de façon à maitriser le risque d'oxydation des viandes.

Par une réduction de l'exposition à l'oxygène de l'air et à la lumière dès que les viandes sont découpées et que les protections naturelles sont éliminées, les réactions d'oxydation peuvent être ralenties. Il convient donc de protéger le muscle et le gras tout au long de sa chaine d'approvisionnement :

- Les pièces découpées doivent être conservées au froid et à l'abri de la lumière ;
- Les opérations de désossage et d'épluchage des muscles sont à réaliser au plus près de la chaine de fabrication des produits transformés. Si cette condition n'est pas réalisable, les muscles et les gras doivent être protégés dans un film protecteur qui empêche le passage de l'oxygène et de la lumière pour les opérations de stockage et de transport précédant la mise en fabrication des charcuteries.

Les produits de désinfection utilisant l'oxydation comme principe actif (peroxydes, hypochlorite de sodium) sont très agressifs pour les viandes. Il convient de porter attention à la bonne réalisation des opérations de rinçage des surfaces pouvant être en contact avec les viandes et les gras (les supports de découpe et de manutention) afin d'éviter tout contact entre le produit de désinfection et les matières premières ou les produits en cours de transformation.

L'utilisation des viandes et matières carnées finement divisées est à proscrire si les conditions et temps de stockage et de procédé de préparation sont inconnues. Des mesures de taux d'oxydation peuvent être effectuées sur ces matières premières le cas échéant.

La durée de conservation des produits congelés dépend de trois critères principaux (PPP) : le Produit en lui-même, le Procédé de transformation mis en œuvre et le Packaging (Bogh-Sorensen, 1984). D'autres critères interviennent sur l'oxydation des produits au long de leur conservation : la température d'entreposage, le type de muscle (rouge vs blanc), l'effet espèce animale...

Dans le cas particulier de l'utilisation de conditionnement sous atmosphère modifiée (MAP), ceux-ci présentent un avantage sur la couleur des produits mais peuvent être responsable d'une augmentation des TBARS (le seuil de 1mg/kg est plus vite atteint), d'un blocage des protéines de tendérisation de la viande ou de pertes plus rapide de la vitamine E.

3.2. Réduire l'oxydation lors de la transformation des viandes

Pour prévenir l'oxydation, la préparation des charcuteries doit se faire dans des conditions limitant l'exposition à l'oxygène et à la lumière.

Les opérations de mélange, de hachage et de cutterage doivent être réalisées de façon à introduire le moins possible d'oxygène dans les mêlées (en travaillant sous vide ou sous gaz neutre).

Les produits doivent être le mieux protégé possible de l'oxygène et de la lumière lors des opérations de cuisson (par un conditionnement en film plastique sous vide ou boyau notamment).

Les stockages de matière dans des bacs non protégés doivent être évités, en particulier pour les matières finement divisées pour leurs effets sur la dessiccation de surface mais aussi sur l'oxydation. Ces produits de report doivent si possible être stabilisés par ajout d'antioxydants dans les recettes (ascorbate ou erythorbate).

La saumure doit être complétée d'ascorbate ou d'erythorbate à hauteur de 300ppm au minimum.

Le nitrite permet de stabiliser l'hème de l'hémoglobine qui est un oxydant présent au cœur des viandes. Pour garantir la maîtrise de l'oxydation, il faut donc vérifier que le procédé de fabrication permet d'atteindre un taux de nitrosylation d'au moins 65%. Il convient également de maîtriser la pression partielle en oxygène de l'emballage de façon à limiter le contact de celui-ci avec les produits.

3.3. Maîtriser l'oxydation des produits transformés.

Les mesures de maîtrise de l'oxydation doivent garantir des conditions de conservation protectrices vis-à-vis de l'oxydation tout au long de la durée de vie du produit.

Pour les produits en libre service, l'emballage joue un rôle important de protection. Il doit être opaque aux UV et imperméable à l'oxygène durant toute la durée de vie des produits. Le gaz de conservation doit être non oxydant (azote ou CO₂). L'utilisation d'oxygène pour améliorer la couleur est à proscrire absolument.

Des emballages actifs peuvent être utilisés de façon à contrôler la présence d'oxygène dans les produits conditionnés : couche de polymères absorbeurs d'oxygène, film à perméabilité contrôlée vis-à-vis de l'oxygène (l'EVOH, Ethylène-alcool vinylique, qui est imperméable à l'oxygène par exemple), emballage multicouche permettant de jouer sur la perméabilité du conditionnement à différents gaz (essentiellement O₂ et CO₂)... Ces différents outils ont comme objectif de réduire voire d'éliminer les échanges gazeux entre l'environnement de production et l'espace gazeux situé à l'intérieur de l'emballage.

Les indications sur l'étiquette doivent bien informer le consommateur qu'un stockage du pré emballage ouvert dans le réfrigérateur est déconseillé. Le cas échéant, les produits doivent être réemballés dans un film plastique ou une feuille d'aluminium afin de les protéger. Certes les antioxydants présents jouent leur rôle et protègent les produits mais leur action est limitée dans le temps.

Pour les charcuteries à la coupe, il est important de sensibiliser le personnel aux bonnes pratiques de préservation de la qualité. Les produits entamés doivent être protégés au mieux de la lumière et de l'oxygène sur leur zone sensible. Le tranchage des portions doit se faire au fur et à mesure de la demande et pas à l'avance. En cas de nécessité, les tranches préparées doivent être protégées de la lumière et de l'oxygène de l'air.

Le frais emballé doit répondre également aux conditions de protection des emballages du libre service : l'absence d'oxygène dans les emballages, une bonne gestion des produits entamés, une information consommateur sur l'étiquetage, et une durée de vie très courte.

La bonne application de ces mesures de maîtrise tout au long de la chaîne de transformation (sur les matières premières, au cours des opérations de fabrication et sur les produits

transformés) doit permettre de réduire l'oxydation des produits de charcuterie tout au long de leur cycle de vie.

Conclusion

Les viandes de porc et les produits transformés à base de viande de porc sont sensibles à l'oxydation du fait de leur richesse en molécules oxydables (acides gras insaturés, protéines, pigments...) et de la présence de molécules oxydantes en leur sein (fer hémique notamment) ou dans leur environnement direct (O₂...).

Les réactions d'oxydation provoquent le développement de molécules qui impactent directement ou indirectement la fonctionnalité des protéines et les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des lipides. Ces réactions chimiques peuvent avoir lieu sur des viandes (fraîches ou congelées), au cours des processus de fabrications, ou encore lors du stockage et de la conservation des produits.

Les techniques analytiques développées dans ce document sont des outils utiles pour suivre la fragilité ou la dégradation oxydatives des matières premières et des produits finis. Elles permettent également de mesurer l'effet des différentes opérations unitaires sur l'oxydation des viandes et des produits de charcuterie/salaison tout au long de leur chaîne de fabrication et de leur durée de vie.

Les mesures réalisées permettront d'améliorer la connaissance des produits en termes d'oxydation et donc d'évaluer les moyens d'amélioration.

Pour **l'évaluation de l'oxydation des lipides**, plusieurs méthodes sont utilisables en fonction du produit à analyser :

- la détermination de l'indice de peroxyde sur les graisses et les fractions lipidiques ;
- les méthodes TBARS pour les viandes et produits transformés ;
- l'analyse sensorielle et la mesure des composés volatils par chromatographie ou spectrométrie de masse pour tous types de produit.

Pour **déterminer le stade d'oxydation des protéines**, différentes stratégies sont envisageables :

- la détermination des groupements thiols libres ;
- la mesure des carbonyles totaux par méthode à la DNPH ou par chromatographie liquide, ionisation electrospray, spectrométrie de masse (LC-ESI-MS) ;
- la recherche des cross-links entre protéines : ponts disulfures, formation de dityrosine, électrophorèse SDS-PAGE et Western-blot.

Pour mesurer l'oxydation des lipides et/ou des protéines, le choix de la méthode d'analyse à utiliser doit être fait en fonction du type de produit à analyser et de la précision de résultat souhaitée et en tenant compte des intérêts et limites de la méthode à retenir.

La mise en place de plans d'action au niveau industriel pour prévenir les réactions d'oxydation des viandes et produits carnés est nécessaire : protection des viandes et produits transformés vis-à-vis de la lumière et de l'oxygène de l'air ; rinçage des supports de découpe et de manutention afin d'éviter tout contact avec des désinfectants oxydants.

Les conditions de préparation des charcuteries sont à contrôler de façon à incorporer le moins d'oxygène possible dans les produits (travail sous vide ou sous gaz neutre).

Les procédés de fabrication des charcuteries bénéficient d'ingrédients réducteurs permettant de protéger les produits de l'oxydation lors des procédés et pendant toute la durée de vie des produits.

Bibliographie

ACTIA (2005), Guide pratique pour l'évaluation de l'oxydation des lipides, Paris : ACTIA, 99 pages.

Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y., Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K., et al. (2006). New methods for the quantitative determination of mayor protein carbonyls, α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes: Investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 1059–1065.

Armenteros M., Heinonen M., Ollilainen V. Toldrá F., Estévez M. (2009) Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS). *Meat Science*, 83, 104-112

Bogh-Sorensen (1984), The TTT-PPP concept, Thermal processing and quality of foods, Londres : Elsevier applied science publishers, 511-521.

Broncano J. M., Petrón M. J., Parra V., Timón M. L. (2009), Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in *Latissimus dorsi* muscle of Iberian pigs, *Meat Science*, 83, 431-437.

Buckley D.J., Morrissey P.A., Gray J.I. (1995), Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat, *Journal of Animal Science*, 73, 3122-3130.

Dieffenbacher A., Pocklington W.D. (1992), Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 1st published in 1987, 1st supplement issued in 1992, Blackwell scientific publications.

Estevez M., Cava R. (2004) : Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté *Meat Science* 68 , 551–558

Estevez M., Ventanas S.Cava R. (2006) : Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pâté. *Meat Science* 74 (2006) 396–403

Estevez M., Ventanas S., Cava R. (2007) : Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chemistry* 100 55–63

Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2008). Determination of oxidation. In L.M. L. Mollet, & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of processed meat and poultry analysis*, 141–162. Boca Raton FL, USA: CRC Press

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.

Estevez M. (2011) : Protein carbonyls in meat systems : A review. *Meat Science*, 89, 259–279.

Ganhão R. (2010), Mediterranean wild fruits as enhancers of the oxidative stability in porcine burger patties, thesis doctoral, Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Departamento producción animal y ciencia de los alimentos, Cáceres, Extremadura, España.

Ganhão R., Morcuende D., Estévez M. (2010) : Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage . *Meat Science*, Volume 85, 402-409

Ganhão R., Estevez M., Morcuende D. (2011), Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials, *Food Chemistry*, 126, 772-778.

Gatellier P., Kondjoyan A., Portanguen S., Santé-Lhoutellier V. (2010) : Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. *Meat Science*, Volume 85, p 645-650

Gatellier, P., Yoon, K., Greve, E., Portanguen, S., Kondjoyan, A., Santelhoutellier, V. (2008) : Effet de la cuisson de la viande sur l'oxydation des proteines, 12^e JSMTV, 81-82

Guillevic M., Kouba M., Mourot J. (2009), Effect of a linseed diet on lipid composition, lipid peroxidation and consumer evaluation of French fresh and cooked pork meats, *Meat Science*, 81, 612-618.

Guillevic M. (2009), Effets des acides gras n-3 sur la construction de la qualité nutritionnelle de la viande de porc et sur le métabolisme des lipides, thèse de doctorat présentée à Agrocampus Ouest, Rennes, Bretagne, 428 pages.

Haak L., Raes K., Smet K., Claeys E., Paelinck H., De Smet S. (2006) : Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Science*, 74, 476-486.

ITERG - CTSCCV (2006), Evaluation de l'oxydation des lipides dans les produits carnés et les produits de la pêche : harmonisation de la méthode de mesure des srTBA (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) en vue de sa normalisation, Rapport final d'étude, ACTIA 2003 - projet03-25, 27 pages.

Izumimoto M., Onyango C.A., Darmadji P. (1997), Comparison of distillation and extraction methods in TBARS determination of cured meat, *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University*, volume 86, 55-59.

Jia N., Kong B., Liu Q., Diao X., Xia X. (2012) Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage *Meat Science* 91, 533–539

Juncher D., Vestergaard C. S., Søltoft-Jensen J., Weber C. J., Bertelsen G., Skibsted L. H. (2000), Effects of chemical hurdles on microbiological and oxidative stability of a cooked cured emulsion type meat product, *Meat Science*, 55, 483-491.

Liu G, Xiong Y. L., Butterfield D. A. (2000), Chemical, physical, and gel-forming properties of oxidized myofibrils and whey- and soy-protein isolates. *Journal of food science*, 65, 811-818

Lund M., Lametsch R. Hviid M., Jensen O., Skibsted L. (2007) High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat Science*, 77, 295-303

Lund M. N., Hviid M. S., Claudi-Magnussen C., Skibsted L. H. (2008) : Effects of dietary soybean oil on lipid and protein oxidation in pork patties during chill storage . *Meat Science* 79, 727–733.

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.

Mercier Y., Gatellier P., Viau M., Remignon H., Renerre M. (1998), Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage, *Meat Science*, 48, 301-318.

Metrohm, Application bulletin, Stabilité des huiles et graisses à l'oxydation – méthode Rancimate, No. 204/1 f.

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

Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., & Stadtman, E. R. (1987). Aged-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488–5491.

Pegg R.B. et Shahidi F. (2000), The N-Nitrosamine problem and nitrite alternatives, *Nitrite curing of meat*, Food and nutrition press, 65-93.

Pegg R. B. (2001), Spectrophotometric measurement of secondary lipid oxidation products, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, D2.4.1-D2.4.18.

Petron M.J., Garcia-Regueiro J.A., Martin L., Muriel E., Antequera T. (2003), Identification and quantification of cholesterol oxidation products in different types of Iberian hams, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5786-5791.

Raharjo S. & Sofos J. N. (1993), Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review, *Meat Science*, 35, 145-169.

Ross C.F., Smith D. M. (2006), Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5, 18-24.

Sun W., Zhao M. Yang B., Zhao H, Chun Cui C. (2011) : Oxidation of sarcoplasmic proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and in vitro digestibility. *Meat Science* 88 , 462-467

Tarladgis B. G., Watts B. M., Younathan M. T., Dugan L. Jr. (1960), A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods, *Journal of American Oil Chemistry Society*, 37, 44-48.

Tarladgis B. G., Pearson A. M., Dugan L. Jr. (1964), Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. II. Formation of the TBA malonaldehyde complex without acid heat treatment, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15, 602-607.

Tikk K., Haugen J.-E., Andersen H. J., Aaslyng M. D. (2008), Monitoring of warmed-over flavor in pork using the electronic nose – correlation to sensory attributes and secondary lipid oxidation products, *Meat Science*, 80, 1254-1263.

Traore S. , Aubry L., Gatellier P., Przybylski W., Jaworska D., Kajak-Siemaszko K., Santé-Lhoutellier V. (2012a) Effect of heat treatment on protein oxidation in pig meat. *Meat Science* 91 14–21

Traore S. , Aubry L., Gatellier P., Przybylski W., Jaworska D., Kajak-Siemaszko K., Santé-Lhoutellier V. (2012b) Higher drip loss is associated with protein oxidation. *Meat Science*, 90, 917-924

Utrera, M., Morcuende, D., Rodríguez-Carpena, G. & Estévez, M.(2011) Fluorescent HPLC for the detection of specific protein oxidation carbonyls – α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes – in meat systems. *Meat Science* 89, 500-506

Ventanas S., Estevez M., Juan Florencio Tejeda J.F., Ruiz J (2006). Protein and lipid oxidation in *Longissimus dorsi* and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science* 72, 647–655

Vestergaard C.S., Parolari G. (1999), Lipid and cholesterol oxidation products in dry-cured ham, *Meat Science*, 52, 397-401.

Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.H., Smith D.M., Sporns P. (2005), *Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes and Carbohydrates*, Wiley, 784 pages.

Xiong, Y. L.(2000): Protein oxidation and implications for muscle foods quality, in *Antioxidants in Muscle Foods*. Decker, E. A., Faustman, C., and Lopez-Bote, C. J., Eds., Wiley, New York, NY

Zipser M.W., Watts B.M. (1962), A modified 2-thiobarbituric acid (TBA) method for the determination of malonaldehyde in cured meats, *Food Technology*, 16, 102-104.

Annexes

Annexe 1 :

Précisions sur les différents protocoles TBARS de mesure de l'oxydation.

Exemple de protocole de la méthode d'extraction en milieu aqueux acide (d'après Tarladgis et al, 1964).

- prise d'essai : 12 g
- mise en suspension de l'échantillon dans 35 mL d'acide perchlorique à 3,86%
- homogénéisation (turax) 1 minute
- centrifugation (300 rpm pendant 3 minutes)
- filtration
- ajustement du volume de filtrat obtenu à 50 mL par ajout d'acide perchlorique
- division du filtrat en aliquotes de 2 mL et ajout d'une solution de TBA 0,02M préparée dans de l'acide perchlorique
- incubation au bain marie 100°C pendant 45 minutes à l'obscurité
- refroidissement et centrifugation (300 rpm pendant 2 minutes)
- mesure de l'absorbance à 532 nm.

Variations du protocole de mesure :

Selon Pegg (2001), l'extraction peut également être conduite par une solution d'acide trichloracétique et d'acide phosphorique. Une aliquote de l'extrait obtenu est filtrée et placée en présence de TBA en excès avant incubation 35 minutes dans un bain-marie porté à ébullition puis refroidissement (10 minutes sous l'eau du robinet ou 5 minutes dans la glace) et mesure de l'absorbance.

L'étape de chauffage de l'échantillon peut entraîner une surestimation due à une auto-oxydation possible de l'échantillon pendant l'analyse. Pour pallier cet inconvénient, Ganhão et al (2011) suggèrent une incubation plus longue (20h) à température ambiante.

Exemple de protocole de la méthode par distillation (d'après Ganhao et al, 2011)

- Prise d'essai : 12 g
- mise en suspension de l'échantillon dans 35 mL d'acide perchlorique à 3,86%
- centrifugation (300 rpm pendant 3 minutes)
- filtration
- ajustement du volume de filtrat obtenu à 50 mL par ajout d'acide perchlorique
- distillation : collecte des 50 premiers millilitres de distillat
- division du filtrat en aliquotes de 2 mL et ajout d'une solution de TBA 0,02M préparée dans de l'acide perchlorique
- incubation au bain marie 100°C pendant 45 minutes à l'obscurité
- refroidissement et centrifugation (300 rpm pendant 2 minutes)
- mesure de l'absorbance à 532 nm.

Variations du protocole de mesure

Pegg (2001) utilise l'acide chlorhydrique à la place de l'acide perchlorique et prépare le blanc « réactif » avec de l'eau distillée et non d'un mélange réactif TCA (acide trichloroacétique) et eau.

Exemple de protocole de méthodes directes

Les méthodes directes de détermination de l'indice TBARS sont utilisables sur les huiles, les graisses ou les fractions lipidiques.

La méthode Bligh-Dyer peut être utilisée pour extraire les lipides des aliments. Une aliquote de la solution obtenue est placée en présence de TBA pour former le composé coloré. Cette méthode permet d'éliminer la présence des protéines, peptides, acides aminés ou pigments présents dans les aliments et pouvant interférer sur la réaction (Wrolstad *et al*, 2005). La méthode a cependant l'inconvénient de ne pas permettre l'extraction du malondialdéhyde lié. De plus, une oxydation (avec formation de malondialdéhyde) peut avoir lieu pendant l'étape de chauffage.

Méthodes dérivées des techniques TBARS

Méthode TBARS dynamique

Les méthodes dynamiques offrent une vision de la fragilité oxydative des produits.

Guillevic (2009) propose une méthode de mesure de TBARS dynamique. Les échantillons sont préparés à partir d'une prise d'essai de 1g de tissu dilué dans 9ml de KCl (1,15%). 100µl de cet homogénat est placé à 37°C en présence de tampon Tris-phosphate (80mM à pH 7,4) avec 5mM de FeSO₄ dans un volume final de 1ml. Le rôle du FeSO₄ est de catalyser la réaction d'oxydation des lipides. Aux temps fixés (ici 0, 60, 120, 200 et 300 minutes), un prélèvement de la solution précédemment décrite est ajouté à 2ml d'une solution de TCA-TBA-HCl préalablement préparée, homogénéisé et chauffé pendant 15 minutes, puis centrifugé pendant 15 minutes. Une mesure de l'absorbance est alors réalisée sur le surnageant à 535nm contre un blanc (contenant les réactifs sans l'homogénat). Cette méthode qui contient une étape d'oxydation forcée permet de tester la stabilité oxydative du produit à analyser en accélérant son vieillissement.

Méthode prenant en compte la turbidité de l'échantillon

Juncher *et al* (2000) ont modifié la méthode par extraction pour prendre en compte la turbidité de la solution due à l'échantillon : 10g d'échantillon sont homogénéisés avec 30ml de solution de TCA (7,5%) avec 0,1% de propylgallate et 0,1% d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), sel disodique et 1 ml de solution de sulfanilamide par centrifugation à 13500 rpm pendant 45 secondes. La solution est alors filtrée. 5ml de l'extrait sont ajoutés à 5ml de TBA. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 30 minutes puis refroidi dans l'eau glacée pendant 5 minutes pour stopper les réactions. L'absorbance est ensuite mesurée à 532nm et 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Modifications des méthodes TBARS

Lynch et Frei (1993) utilisent la méthode suivante : 0,5 ml d'échantillon sont incubés dans de l'acide 2-thiobarbiturique à 1,0% (poids/volume). 0,25 ml de NaOH 50mM et 0,25 ml d'acide

trichloroacétique à 2,8% sont ajoutés. L'échantillon est ensuite placé dans un bain marie porté à ébullition pendant 10 minutes. Après refroidissement à température ambiante, une extraction dans 2 ml de n-butanol a lieu. L'absorbance de la solution est alors mesurée à 535 nm, ce qui permet de déterminer la concentration de substances réactives à l'acide thiobarbiturique en présence par comparaison avec une gamme étalon préalablement préparée pour des concentrations de tetramethoxypropane allant de 0 à 8 μ M. Les résultats sont exprimés en mg MDA/kg de viande (unités TBArS).

Mercier *et al* (1998) ont adapté la méthode TBArS développée *in vitro* sur matrice viande. 1 g d'échantillon sont placés dans 10 ml de KCl 0,15M et BHT 0,1 mM puis homogénéisés pendant une minute (Polytron à vitesse moyenne). L'analyse suit alors le protocole précédemment utilisé par Lynch et Frei (1993).

Dieffenbacher et Pocklington (1987) utilisent également une méthode directe pour des échantillons d'huiles et de graisses animales ou végétales. Ils utilisent un réactif TBA préparé à partir de 200mg d'acide thiobarbiturique dissous dans 100ml d'une solution de butanol pure (ne contenant pas plus de 0.5% d'eau). L'échantillon également dissous dans du butanol pur est mis en contact avec un volume équivalent de réactif TBA. Après avoir homogénéisé la solution obtenue, celle-ci est placée au bain-marie à 95°C pendant environ 120 heures. L'échantillon est refroidi à température ambiante et son absorbance est mesurée à 530nm contre un blanc (réactifs sans l'échantillon).

Annexe 2 :

Détermination de l'indice TBArS à partir de la valeur de l'absorbance mesurée

Une constante K qui correspond à chaque expérimentation doit être calculée dans un premier temps afin de déterminer l'indice TBArS (Pegg, 2001 ; Ganhão *et al*, 2011). Cette constante est calculée par la formule suivante pour chaque échantillon :

$$K = \frac{1}{\text{pente courbe d'étalonnage}} \times M_{MDA} \times \text{facteur de dilution} \times 10^6 \times \frac{1}{m_{\text{éch}}}$$

où M_{MDA} est la masse molaire du malondialdéhyde ($72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; 10^6 convertit les résultats en mg de malondialdéhyde par kg d'échantillon, $m_{\text{éch}}$ est la masse de l'échantillon exprimée en g.

La valeur d'absorbance mesurée est alors multipliée par la constante K correspondante pour obtenir la valeur TBA. Par ce calcul, le résultat sera exprimé en mg d'équivalent MDA par gramme d'échantillon.

Le calcul de la constante K varie en fonction de la méthode de mesure des TBArS utilisées. La formule ci-dessus correspond à une analyse par méthode directe. Si l'échantillon a été préparé suivant une étape d'extraction, il convient de déterminer tout d'abord le pourcentage de récupération du malondialdéhyde. Ce pourcentage est évalué par ajout de TEP (1,1,3,3 tetraméthoxytetraéthoxypropane) aux extraits d'échantillon à analyser. La formule suivante est alors appliquée :

$$\% \text{ récupération} = 100 \times \frac{A_{SP}}{A_{TEP}}$$

où A_{SP} correspond à l'absorbance de l'échantillon corrigé en malondialdéhyde et A_{TEP} correspond à l'absorbance de la solution de TEP correspondante.

Dans ce cas (méthode par extraction), la formule permettant de déterminer K devient :

$$K = \frac{1}{\text{pente courbe d'étalonnage}} \times M_{MDA} \times \text{facteur de dilution} \times 10^6 \times \frac{100}{\% \text{ récupération}} \times \frac{1}{m_{\text{échantillon}}}$$

De la même façon, dans le cas d'une mesure réalisée par la méthode par distillation, la formule citée ci-dessus pour le calcul de K s'applique également.

Selon la méthode AOCS, la valeur TBA est déterminée par la formule :

$$\text{indice TBA} = \frac{50 \times A_{532}}{m}$$

Le facteur 50 de la formule AOCS est basé sur l'utilisation d'une fiole de 25 ml et d'une cuve de mesure d'un centimètre de trajet optique. La formule est valable uniquement dans ces conditions. A_{532} correspond à l'absorbance de la solution testée (valeur corrigée par rapport au blanc) et m correspond à la masse de l'échantillon testé.

Annexe 3 :

Analyse des composés volatils. Techniques de spectrométrie de masse (SM) et de chromatographie en phase gazeuse (GC).

La spectrométrie de masse :

Le principe de la spectrométrie de masse est de séparer les constituants d'un produit en fonction de leur masse moléculaire et de leur charge.

Un spectromètre est composé :

- d'une source d'ionisation qui permet d'ioniser les différents constituants d'un produit ;
- d'un analyseur de masse m/z qui sépare les analytes en fonction de leur poids et de leur charge ;
- d'un système de détection qui convertit le courant ionique obtenu en courant électrique ;
- d'un module de traitement du signal qui représente les données sous la forme d'un spectre de masse.

Différents types d'analyseur existent : quadripôle, piège à ions, secteur magnétique couplé à un secteur électrique, le temps de vol, résistance cyclotronique ionique... Deux analyseurs sont parfois utilisés en tandem.

Le spectre de masse représente des pics correspondants aux espèces présentes dans l'échantillon : plus le pic (le signal reçu) est élevé, plus les ions de l'analyte correspondant sont nombreux.

La chromatographie en phase gazeuse :

Le principe de la chromatographie en phase gazeuse est de faire passer dans une colonne un échantillon sous forme liquide, à l'aide d'un gaz porteur chauffé à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon.

La séparation des composants a lieu dans la colonne en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire par le phénomène de rétention chromatographique. Un détecteur est placé en sortie de colonne permettant le calcul du temps de rétention de chaque soluté par envoi d'un signal électronique vers un enregistreur.

Un chromatogramme est obtenu. Il représente le temps de rétention et l'intensité de chaque signal (pic) envoyé par le détecteur.

Différents types de colonnes peuvent être utilisées en fonction des solutés à séparer : la phase stationnaire peut être un liquide ou un solide absorbant.

Annexe 4 :

Protocole de détermination des carbonyles

Exemple de protocole de dosage des carbonyles et des protéines (Traore 2011, Gatellier non publié)

Pour éliminer la source de variabilité liée au traitement en parallèles des 2 aliquotes, ces auteurs réalisent la mesure des DO à 280 et 370 nm sur la même quantité aliquote

- prise d'essai 3 g de produit
- homogénéisation – extraction : broyage de 3 g de viande dans 30 ml de tampon phosphate 40mM à pH6,5 + BHT (antioxydant)
- précipitation des protéines : ajout de 135 µg de TCA à 50% à 300 µg d'extrait brut
- centrifugation : 15', à 4000 rpm et à 4°C,
- élimination du surnageant, récupération du culot de centrifugation sur papier absorbant
- fixation du DNPH aux groupements carbonyles (fixation mole à mole) pour former des hydrazones protéiques : culot + 500 µL de DNPH à 0,2 % (P/V) dans HCl 2N
- incubation : 1 h à température ambiante en agitant régulièrement (Vortex)
- centrifugation : 15', à 4000 rpm et à 4°C
- élimination du surnageant, récupération du culot de centrifugation sur papier absorbant
- lavages au solvant :
 - o ajouter sous hotte de 1mL solvant éthanol-acétate d'éthyle (1/1)
 - o agiter
 - o centrifuger : 15', à 4000 rpm et à 4°C
 - o éliminer le surnageant, récupérer culot de centrifugation sur papier absorbant
 - o procéder à 3 lavages successifs
- séchage : après le dernier lavage, laisser sécher (35 min) les culots en les retournant sur du papier absorbant
- solubilisation : mettre le culot dans 2 mL de guanidine 8M dans du tampon phosphate à pH6,5, et agiter 30 min
- centrifugation : 15', à 4000 rpm et à 4°C
- mesure des DO : déposer 200 µL d'échantillon sur microplaque UV et faire la lecture à 370 nm (DNPH fixé) et 280 nm (teneur en protéines) et 370nm (DNPH fixé).
- Faire un blanc à la guanidine 8M dans du tampon phosphate à pH6,5

Les résultats sont exprimés en nanomoles de DNPH fixés par mg de protéines (nmol DNPH/mg de protéines) :

$$\text{Taux de carbonyles} = \frac{DO_{370 \text{ nm}} \times DO \text{ (BSA)}_{280 \text{ nm}} \times 10^3}{DO_{280 \text{ nm corrigée}} \times 21,0}$$

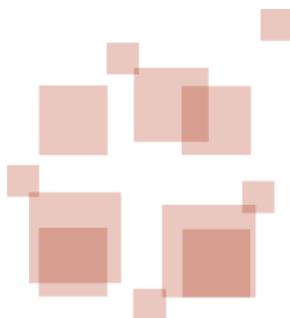
Avec :

- $DO_{280 \text{ nm corrigée}}$: la DO due au DNPH à 370 nm augmente la DO lue à 280nm, cette augmentation est prise en compte en corrigeant la DO à 280 nm d'un facteur de 0.29 qui a été déterminé expérimentalement. La DO corrigée à 280 nm est obtenue par la formule :

$$DO_{280 \text{ corrigée}} = DO_{280} - 0,29 DO_{370 \text{ nm}}$$

- $21,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: coefficient d'absorption de la phényl hydrazone à 370 nm

- DO (BSA) absorbance à 280 nm de la sérum albumine bovine à 1mg/ml dans la guanidine 8M (= 0,65)



Antenne Maisons-Alfort
7, avenue du Général de Gaulle – 94704 MAISONS-ALFORT
Tél. : + 33 (0)1 43 68 57 85 - Fax : + 33 (0)1 43 76 07 20

Antenne Rennes
La Motte au Vicomte B.P. 3 - 35651 LE RHEU Cedex
Tél. : + 33 (0)2 99 60 98 20 - Fax : + 33 (0)2 99 60 93 55
ifip@ifip.asso.fr - www.ifip.asso.fr

Antenne Toulouse
34 bd de la Gare - 31500 TOULOUSE
Tél. : + 33 (0)5 62 16 61 70 - Fax : + 33 (0)5 61 54 32 63

Etude financée par Inaporc

