

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM)
Équipe Procédés Alimentaires et Physico-Chimie (PAPC)
(AgroSup Dijon – Université de Bourgogne Franche-Comté)

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences des Aliments

présentée par

Simone SCUSSAT

Le 29 avril 2016

(Manuscrit Confidentiel – Soutenance Publique)

Identification des marqueurs repérables par des capteurs spectroscopiques et significatifs des étapes clés de la cuisson de viande et poisson

Directeur de thèse : P^r. Philippe CAYOT

Co-encadrante de thèse : D^r. Camille LOUPIAC

Jury

D ^r . Sylvie Clerjon (Ing.Rech., HDR, INRA, Clermont-Ferrand)	Rapporteur
D ^r . François Mariette (Dir.Rech., HDR, IRSTEA, Rennes)	Rapporteur
D ^r . Bruno Wacogne (Dir.Rech., HDR, UMR 6174 (UBFC–CNRS–FEMTO-ST), Besançon)	Examineur
D ^r . Serge Pin (Dir.Rech., NIMBE, CEA Saclay)	Examineur
D ^r . Marie-Pierre Ellies (MCF, HDR, Bordeaux Sciences Agro, Bordeaux)	Examineur
D ^r . Luc Delmotte (Ing.Rech.1, HDR, Institut de Science des Matériaux de Mulhouse, Mulhouse)	Invité
M ^f . Jean-Marc Brun (TGCP-Bonnet-Thirode, Poligny)	Invité
M ^f . Sébastien Volatier (Groupe SEB, Selongey)	Invité
D ^r . Philippe Cayot (Professeur, UMR PAM-PAPC (UBFC–AgroSup Dijon), Dijon)	Directeur de thèse
D ^r . Camille Loupiac (MCF, UMR PAM-PAPC (UBFC–AgroSup Dijon), Dijon)	Co-encadrante de thèse

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'équipe *PAPC*, Procédés Alimentaires et Physico-Chimie (UMR PAM, Procédés Alimentaires et Microbiologiques à AgroSup Dijon - Université de Bourgogne Franche-Comté) et au sein du *Laboratoire Léon Brillouin* (UMR 12 CEA-CNRS au CEA de Saclay), grâce au créateur du projet *Open Food System* (Groupe SEB) et grâce aussi aux supports financiers de l'État français et de la Région Franche-Comté dans le cadre du "Programme d'Investissements d'Avenir" géré par Bpifrance.

Avant tout, je tiens à remercier très chaleureusement le Dr. *Camille Loupiac*, ma co-encadrante, pour avoir développé ce projet de thèse, pour m'avoir patiemment suivi, guidé, conseillé pas-à-pas pendant ces trois années. Merci également de m'avoir permis de participer à plusieurs congrès et conférences en France et en Europe. Je veux remercier le Pr. *Philippe Cayot*, directeur de cette thèse, pour ses remarques et ses précieux conseils.

Pour moi, cela a été un énorme plaisir de travailler avec vous : merci beaucoup pour l'opportunité que vous m'avez offert !

J'adresse mes plus vifs remerciements aux Dr. *Sylvie Clerjon* et Dr. *François Mariette* pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger mon travail. Je tiens à exprimer ma gratitude envers les Dr. *Marie-Pierre Ellies*, Dr. *Serge Pin*, Dr. *Luc Delmotte*, Mr. *Jean-Marc Brun* et Mr. *Sébastien Volatier* qui ont accepté de siéger dans ce jury de thèse et envers le Dr. *Bruno Wacogne* qui en a accepté la présidence.

Je souhaite également remercier les participants de mes comités de thèse, les Dr. *Marie-Pierre Ellies*, Dr. *Serge Pin* et Dr. *Elias Bou-Maroun*, me permettant de prendre du recul sur mon travail et de faire émerger de nouvelles idées.

Un grand merci à *Bernadette "Bernouch" Rollin* pour son précieux support moral et technique à ne pas être dans deux endroits différents au même temps, vu que "un Simone c'est assez !" (cit.: *Maman*). Cela me manquera d'entendre : "Simone ! Tu peux venir une seconde, j'ai un petit souci avec l'ordinateur !" Un grand merci à *Marta Lant* qui, pendant son stage ERASMUS, m'a aidé à développer une partie de ma thèse. Merci pour ta compagnie, tes sourires et ta bonne humeur. Dans ce contexte, je veux également remercier aussi le Pr. *Christine Fant* pour son aide précieuse sur l'analyse statistique de mes données.

Un grand remerciement va également à la direction de l'équipe *PAPC* pour avoir mis à ma disposition tout le matériel et les outils nécessaire à la réalisation de cette recherche et ainsi qu'à la direction du *Laboratoire Léon Brillouin*, le Dr. *Christiane Alba-Simionesco*, pour m'avoir accueilli pendant ma deuxième année de thèse au sein de ses structures. Mes remerciements vont également au Dr. *Frédéric Ott*.

Je tiens à remercier le Dr. *Olivier Gaiffe* de l'institut *FEMTO-ST* (Besançon) pour son expérience et son aide précieuse, ses compétences et son expérience à la réalisation des mesures

spectroscopiques couplées au four et à l'imagerie de neutrons. Je remercie également les Dr. *Luc Delmotte* et Dr. *Cyril Vaultot* de l'*Institut de Science de Matériaux de Mulhouse (IS2M)* pour l'accueil dans leur structure et le temps qu'ils ont dédiés à l'étude des échantillons de viande par RMN-bas champ, ainsi que le traitement des données.

Je remercie les Dr. *Hassina Bilheux* et Dr. *Jean Christophe Bilheux* du centre de recherche *Oak Ridge National Laboratory* (Tennessee, USA) pour l'accueil qu'ils m'ont réservé lors de mon arrivée dans le centre et la patiente formation en matière de traitement des images sous MatLab.

Je remercie *Arnaud Hélyary* pour sa gentillesse et sympathie, pour son aide dans l'élaboration du four pour les expériences "couplage four, imagerie de neutrons et spectroscopie", ainsi que pour la création de l'environnement échantillon aluminium-quartz.

Je remercie le Pr. *Frédéric Debeaufort* pour les heures d'enseignement qui m'ont été accordées à l'IUT Génie Biologique de Dijon et que j'ai pu partager, avec un énorme plaisir, avec Mme *Isabelle Vialet*. Je remercie le Pr. *Dominique Champion* pour m'avoir confié des heures d'enseignement à AgroSup Dijon : cela a été une super expérience ! Dans ce contexte, je tiens à remercier aussi le Dr. *Muriel Denayrolles* pour m'avoir invité à tenir un cours aux élèves ingénieurs, à Bordeaux Sciences Agro.

Un grand merci à l'ensemble des doctorants, stagiaires avec qui j'ai partagé ce parcours de recherche et qui sont devenus pour moi des amis : Filippo, Aline, Kevin, Koï, Yanis, Elio, Roberta, Giulia, Christophe, Jeancarlo, Julie L., Nicolas. Merci pour votre gentillesse, sympathie et soutien. Un merci particulier va aussi à :

- *Ann*, Supuksorn, pour avoir été très très patiente après toutes mes blagues et tous les surnoms que je t'ai donné ; merci pour tes sourires et ta bonne humeur, pour ton petit cours de langue et cuisine thaïlandais...
Merci pour m'avoir préparé et emmené le dîner au laboratoire, à 20 h, après être rentrée chez toi et cuisiné pour moi. Merci Bubu !.
- Bérangère, ma correspondante "numérique". Merci pour tes pensées, ton soutien et tes mots d'encouragement. Ils m'ont vraiment fait du bien au moral.
- Coralie, pour tes appels d'encouragements et ta douceur.

Enfin, une énorme pensée à toute ma famille pour leur soutien inconditionnel, leur aide et leurs encouragements. Merci à *zio Bröss* et *zia Dany* pour m'avoir hébergé chez eux pendant les retours en Italie et un énorme merci à *Mamma Rita* et à *Papà Renato* pour m'avoir aidé aussi à réaliser un *spectaculaire pot de thèse*.

Table des matières

REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIERES	VII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIX
LISTE DES ABREVIATIONS	XXI
<i>INTRODUCTION</i>	1
INTRODUCTION	3
<i>CHAPITRE 1</i>	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	11
Partie 1 : Composition et structure du muscle	11
Composition chimique	11
L'architecture du muscle	13
Fibres musculaires et myofibrilles	14
Myosine	15
Hémoglobine	17
Collagène	18
Partie 2 : Cuisson et impact de la température sur les protéines du muscle	21
Partie 3 : Outils d'observation	27
Échelle Macroscopique	27
Texture, couleur et analyse sensorielle	27
Échelle Moléculaire	28
Spectroscopie infrarouge	28
Viande	29
Myosine	32
Hémoglobine	33
Spectroscopie de fluorescence	34
Viande	34
Myosine	36
Hémoglobine	37
Collagène	38
Échelle Microscopique	39
Spectroscopie RMN bas champ	39
Imagerie de larges objets	44
<i>CHAPITRE 2</i>	49
MATERIELS ET METHODES	51
Système de cuisson	51
Four Opticook	51
Partie 1 : Échelle moléculaire	57

Matrices utilisées et protocoles de cuissons	57
Préparation des échantillons	58
Méthodes d'analyse	59
Calorimétrie	59
Spectroscopie dans le visible (VIS)	59
Spectroscopie dans le moyen infrarouge (FTIR)	60
Analyse statistique des spectres obtenus dans le moyen infrarouge	60
Spectroscopie de fluorescence	62
Protocole de purification de la myosine	64
Électrophorèse	65
Chromatographie liquide à exclusion de taille	67
Calorimétrie	67
Observation macroscopique de la dénaturation de la myosine	67
Spectroscopie de fluorescence	67
Protocole de purification de l'hémoglobine	67
Spectroscopie de UV-VIS	68
Partie 2 : Échelle microscopique	69
Préparation des échantillons	69
Cuisson	69
Teneur en eau	71
RMN bas champ	71
Séquence d'impulsions RMN en système homogène	71
Séquence CPMG	71
Séquences de l'écho de Hahn et de l'écho de Solide	73
Configuration "gradient de champ"	77
Tomographie de neutrons	78
Traitements des données de tomographie de neutrons	79
Reconstruction des images 3D	79
Analyse des images 3D reconstruites	79
Partie 3 : Couplage, suivi microscopique-analyse moléculaire	83
Échantillons	83
Préparation des échantillons	83
Porte échantillon adapté pour les mesures couplées dans le four Opticook	83
Couplage Four Opticook-Spectroscopies	84
Couplage Four Opticook-Imagerie de Neutrons	85
Mesures préliminaires : cuissons offline et en ligne.	85
Calibration de la station d'imagerie <i>Imagine</i>	87
Traitement des images de neutrons	88
Couplage Four Opticook-Spectroscopie-Imagerie de Neutrons	88
Traitement des données de spectroscopie	89
Traitement des images de neutrons	90
CHAPITRE 3	93
RESULTATS	95
Partie 1 : Échelle moléculaire Signatures spectroscopiques du degré de cuisson de la viande et du poisson	95
Système complexe	96
Analyses préliminaires : évaluation et validation des protocoles de cuisson	96
Analyses spectroscopiques	107
Système modèle	117
Résumé des principaux résultats et schéma de synthèse	122
Partie 2 : Échelle microscopique Contraction des fibres et libération du jus selon les degrés de cuisson étudiées par RMN et tomographie de neutrons	123
Résumé des principaux résultats et schéma de synthèse	135

Partie 3 : Couplage moléculaire et microscopique Suivi de la cuisson en ligne avec le couplage de l'imagerie neutronique et de la spectroscopie	137
<i>Imagerie de neutrons</i>	137
Expériences offline	139
Expériences online	142
Four Modèle	142
Four Opticook : couplage neutrons et spectroscopies	145
Résumé des principaux résultats et schéma de synthèse	157
<i>DISCUSSION</i>	161
DISCUSSION	163
CONCLUSIONS TECHNIQUES ET SCIENTIFIQUES	171
PERSPECTIVES	173
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	177
BIBLIOGRAPHIE	179
<i>ANNEXES</i>	195
ANNEXE 1	197
ANNEXE 2	199
ANNEXE 3	201
ANNEXE 4	203
ANNEXE 5	205
ANNEXE 6	207
ANNEXE 7	209
ANNEXE 8	211
ANNEXE 9	215
ANNEXE 10	219
RESUME	224
ABSTRACT	224

Liste des figures

Figure 1 : a) Architecture du muscle squelettique du tendon liant le muscle à l'os, aux faisceaux jusqu'aux fibres musculaires. b) Image détaillée d'une portion de muscle mettant en évidence les trois grands niveaux de structure : l'épimysium qui englobe la masse musculaire entière, le périmysium qui regroupe les faisceaux musculaires, puis l'endomysium qui correspond aux fibres musculaires. Person Éducation.	13
Figure 2 : Images de l'architecture du sarcomère. Vision latérale avec les filaments épais de myosine (rouge) et leurs têtes qui assurent les liaisons avec les filaments d'actine ; les filaments d'actine (bleu) ; les filaments de titine (jaune) assurant élasticité et structure au sarcomère ; les disques Z et la ligne M assurant la structure du sarcomère. Vision transversale du sarcomère. Person Education.	14
Figure 3 : Schéma d'auto-réassemblage de monomères de myosine en fonction de la force ionique de la solution (concentration de chlorure de potassium). La myosine reste sous forme monomérique quand la concentration de chlorure de potassium est supérieure à 300 mM ; en diluant la solution, les queues de myosine tendent à s'auto-réassembler en filaments de tailles plus importantes ; à la concentration de 100-200 mM, la myosine forme des petits filaments, <i>minifilaments</i> , de dizaines de molécules, qui s'agrandissent par l'ajout de monomères, lorsque la force ionique de la solution diminue ; à très faible concentration de chlorure de potassium (≈ 50 mM), des filaments synthétiques de myosine d'une centaine de molécules sont formés : les queues forment une zone centrale, alors que les têtes de la myosine sortent du filament.	15
Figure 4 : Structure de la myosine. En haut, la myosine représentée dans sa totalité sous forme d'hétérohexamère avec en jaune, les 4 chaînes légères et en rouge, les deux chaînes lourdes, composées par deux têtes (moteur moléculaire) et deux longues queues. En bas, le détail de la tête de la myosine mettant en évidence les liaisons avec les deux chaînes légères, présentées en jaune et orange (Protein Data Bank).	16
Figure 5 : Fragments obtenus suite à la digestion enzymatique de la myosine. Ces fragments sont produits par action enzymatique de la papaïne et de la trypsine. La papaïne coupe la myosine au niveau de la jonction entre la tête et la queue, en libérant la queue (a) et les deux têtes (sous-fragments S1) (b) . La trypsine coupe la myosine au milieu de la queue, en produisant les deux fragments de méromyosine : la méromyosine légère (c) et lourde (d) ; modifié de Offer 1996 (Offer et Knight, 1996).	17
Figure 6 : Thermogramme du muscle de lapin entier après le rigor-mortis; 11,9 mg, DSC II Perkin-Elmer, vitesse de balayage $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, intervalle de température entre 6-106 $^{\circ}\text{C}$ (Wright et al., 1977).	21
Figure 7 : Thermogrammes des protéines du muscle isolées : à gauche, le thermogramme des protéines sarcoplasmiques du muscle de lapin, DSC II Perkin Elmer, vitesse de balayage $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Wright et al., 1977; Rodger et Wilding, 1990) ; à droite, les thermogrammes des protéines du tissu conjonctif de bœuf : les courbes (a) et (c) correspondent au muscle entier ; la courbe (b) correspond au tissu conjonctif du périmysium et la courbe (d) correspond au tissu conjonctif de l'épimysium (Rodger et Wilding, 1990).	22
Figure 8 : Thermogrammes des protéines myofibrillaires de lapin isolées : a) courbe de la myosine (1,4 mg) dans 40 mM de chlorure de potassium (KCl) et 3 mM de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), à pH 7 ; b) courbe de l'actine (2,5 mg) dans 1 mM de chlorure de potassium (MgCl_2) et 17 mM de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), pH 7. DSC II Perkin Elmer, vitesse de balayage $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Wright et al., 1977).	22
Figure 9 : Thermogrammes de la myosine en fonction du pH (de 5,5 à 8) et de la force ionique (de 0,05 à 1 μ) : (a) 12mM de chlorure de potassium (KCl), 0,5 mM de dithiothréitol (DTT), 50 mM de tampon phosphate ($I = 0,05\ \mu$) ; (b) 212 mM de chlorure de potassium, 0,5 mM de DTT, 50 mM de tampon phosphate ($I = 0,25\ \mu$) ; (c) 962 mM de chlorure de potassium, 0,5 mM de DTT, 50 mM de tampon phosphate ($I = 1\ \mu$). Les barres verticales représentent $0,02\ \text{mcal}\cdot\text{s}^{-1}$ (Wright et Wilding, 1984).	23
Figure 10 : Thermogrammes montrant l'élimination séquentielle des pics endothermiques après l'application de quatre températures finales pendant 5 minutes sur le muscle <i>semimembranosus</i> de bœuf : A, viande crue ; B, C et D cuisson à 57, 70 et 81 $^{\circ}\text{C}$ (Findlay et Barbut, 1990).	24
Figure 11 : Thermogrammes du muscle de bœuf <i>sternomandibularis</i> en fonction de la longueur du sarcomère. L'expérience a été réalisée sur 12 échantillons de 10 mg chacun, dans un tampon phosphate à pH 5,4 ; la vitesse de chauffage était de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Findlay et Stanley, 1984).	24
Figure 12 : Force nécessaire pour couper un échantillon de viande en fonction du temps de cuisson, en fonction de la méthode de cuisson (grill, losanges noirs et bain d'eau, carrés gris), à une température cible (57 $^{\circ}\text{C}$). La force (Warner-Bratzler Peak Shear Force, WBPSF) correspond à la force nécessaire pour couper l'échantillon (Obuz et al., 2003).	27
Figure 13 : Schéma de Jablonski adapté aux spectroscopies du proche (PIR) et moyen (MIR) infrarouge. Dans la partie droite du schéma, l'électron (petit point noir), en absorbant de l'énergie dans le spectre du moyen infrarouge (MIR), peut s'exciter jusqu'au premier niveau rotationnel, alors que dans le cas du proche infrarouge (PIR) (partie gauche du schéma), l'électron peut s'exciter jusqu'au deuxième, troisième, quatrième, ... niveaux vibrationnels, en dépassant le premier.	29
Figure 14 : Spectres visible-proche infrarouge de morceaux de blanc de poulet après cuisson à 150 $^{\circ}\text{C}$, en fonction du temps de cuisson, de 3 à 18 minutes. L'indication I/R signifie l'inverse de la réflectance (Liu et al., 2000).	30

Figure 15 : (a) Spectres de réflectance obtenus dans le proche infrarouge (intervalle 750-1100 nm) sur des morceaux de bœuf ; les longueurs d'onde indiquées sont associées à la texture étudiée par analyse sensorielle et par la méthode de Warner-Bratzler (Byrne et al., 1998). (b) Spectres de réflectance obtenus dans le proche infrarouge (intervalle 1100-2500 nm) sur des morceaux de bœuf présentant différentes valeurs de tendreté mesurées avec la méthode de Warner-Bratzler (Park et al., 1998).	30
Figure 16 : Spectres FTIR d'échantillons standards de viandes contenant différentes quantités de lipides et de protéines : A : 2,632 % de lipides et 2,264 % de protéines ; B : 1,650 % de lipides et 1,453 % de protéines ; C : 1,384 % lipides et 2,401 % protéines (Dion et al., 1994).	31
Figure 17 : Spectres infrarouge des échantillons de viande de bœuf pure et adultérées (Al-Jowder et al., 2002).	31
Figure 18 : Dérivées secondes des spectres infrarouge de la viande pour 10 températures différentes (Bertram et al., 2006a).	32
Figure 19 : Effet d'un chauffage isotherme de 30 minutes sur les spectres infrarouge de la myosine : a) native ; b) 45 °C ; c et d) 55°C ; e) 65 °C ; f) 75 °C (Wang et Smith, 1994).	33
Figure 20 : Diagramme de Jablonski expliquant le phénomène de la fluorescence. Les niveaux électroniques sont indiqués avec des traits noirs foncés : S ₀ (état fondamental) S ₁ (premier niveau excité) et S ₂ (deuxième niveau excité). Les niveaux vibrationnels (0, 1, 2 et 3) sont indiqués avec des traits gris. Les conversions internes et les émissions sont indiquées avec des flèches noires et colorées, respectivement (Lakowicz, 2006).	34
Figure 21 : Représentation de l'anisotropie de fluorescence du collagène après un chauffage à 60°C pendant 0, 20 et 60 minutes. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence utilisées étaient de 380 et 450 nm (Clerjon et al., 2008; Damez et Clerjon, 2008).	35
Figure 22 : Images de la sous-unité S1 de la myosine du muscle lisse présentant les positions des résidus des tryptophanes. Les positions indiquées (29, 36, 441, 512, 546, 597, 625) ne correspondent pas toutes aux positions des tryptophanes de la myosine d'un muscle squelettique (114, 132, 441, 511, 596, 830, 832). Les deux myosines, par contre, exposent les résidus de tryptophanes au solvant externe, en ayant une longueur d'onde d'émission d'environ 340 nm (Yengo et al., 1998).	36
Figure 23 : Schéma du dimère d'hémoglobine : $\alpha_1\text{-}\beta_2$. Positionnement spatial des résidus de tryptophane : chaîne α , Trp-14 en position externe ; chaîne β , Trp-15 en position externe et Trp-37 en position interne (cercles rouges). Les groupements hémique des deux sous-unités sont aussi visibles (cercles jaunes) (Hu et Spiro, 1997).	37
Figure 24 : Spectres de fluorescence des différentes formes d'hémoglobine (excitation à 296 nm). a) Spectres d'émission de l'oxy-Hb, la déoxy-Hb, carboxy-Hb et la ligne de base obtenue à partir du tampon ; b) Spectres d'émission de la met-Hb en absence de IHP (inositol hexaphosphate) (Hirsch et Nagel, 1981).	38
Figure 25 : Structures de la lysine (a) et de l'hydroxylysine (b) constituant la liaison croisée pyridinoline. c) Structure de la pyridinoline de masse molaire d'environ 428,44 g·mol ⁻¹ (Robins, 1983).	38
Figure 26 : Schéma présentant la séquence CPMG. a) Schéma montrant les pulses constituant la séquence : le premier à 90° est suivi par une série de pulses de 180° qui refocalisent les spins des protons ; b) les pulses génèrent un signal, écho, de plus en plus petit, à cause du déphasage des spins ; les chiffres dans les cercles correspondent aux étapes "de la course" présentées dans la figure c ; c) les spins des protons peuvent être imaginés comme des coureurs : (1) les coureurs partent avec un pulse de 90°. Après plusieurs tours, ils se sont distancés (2 et 3). Un deuxième pulse de 180° est déclenché (4 et 5), les coureurs font demi-tour et retournent vers la ligne de départ. Les plus rapides ont la distance la plus longue à parcourir et tous arrivent au même moment, s'ils courent à la même vitesse (6a). Si la vitesse n'est pas la même, les coureurs arrivent les uns après les autres (6b). Le processus de retournement des spins est répété plusieurs centaines de fois pendant une expérience et, à chaque retournement, le signal d'écho diminue. La vitesse de décroissance donne le temps de relaxation T ₂ (Kenyon et al., 1995).	41
Figure 27 : Distribution des temps de relaxation T ₂ pour du porc à 28 °C (cru, trait plein) et 80 °C (cuit, pointillé). (Bertram et al., 2006a).	42
Figure 28 : Schéma des pulses de l'écho de Hahn. Après un premier pulse de 90° sur le plan horizontal (x, y), un deuxième pulse de 180° est appliqué sur le même plan (x, y) (Fuchs et al., 2010).	44
Figure 29 : Images de RMN d'un échantillon de viande en fonction de la température. Les images montrent la déformation de l'échantillon qui se contracte en laissant un espace pour le jus (contours en rouge) sortant de la matrice, en fonction de la température de chauffage (Bouhrara et al., 2011).	45
Figure 30 : Image optique d'un morceau de viande (a) et image térahertz correspondante (absorbance à 1 THz) (b) du muscle de porc (Hoshina et al., 2009).	46
Figure 31 : Images relatives à la distribution d'eau autour d'une racine de lupin cultivée dans du sable (à gauche) et de la distribution d'oxygène (à droite), en fonction du temps de croissance (Rudolph et al., 2012).	46
Figure 32 : a) Schéma du four "Opticook" utilisé par tous les partenaires du projet pour réaliser les cuissons de viande et poisson selon l'application de plusieurs barèmes de cuisson ; b) bandeau de commande du four avec les boutons de réglage de la température, du mode de cuisson, de la durée et de la puissance.	51
Figure 33 : Schéma du four Opticook en utilisant le logiciel de conception assisté SolidWorks. Cette représentation met en évidence les personnalisations que nous avons demandé pour réaliser les expériences couplées : deux hublots à gauche et à droite du four pour permettre le passage du faisceau de neutrons à travers le four ; un hublot sur le dessus pour permettre l'arrivée d'une fibre optique.	52

Figure 34 : Images des sondes de températures utilisées pendant les cuissons : a) sonde installée dans la cavité du four mesurant la température de l'environnement de cuisson ; thermosondes utilisées pour mesurer les températures à cœur de la plupart des viandes (à l'exception du blanc de poulet) (b) et des poissons (c)	52
Figure 35 : Schéma électrique de la thermosonde viande à 3 points : le premier point de mesure est sur la pointe ; le deuxième est à 15 mm de la pointe ; le troisième est à 30 mm de la pointe.	53
Figure 36 : Schéma du support utilisé pour enfoncer à cœur les thermosondes. L'objectif de ce support est de positionner la sonde toujours au même endroit, donc de rendre l'expérience la plus répétable possible. a) exemple d'utilisation du support ; b) positionnement des trous, petits et grands, qui correspondent à la position de la sonde poisson et viande, respectivement.	53
Figure 37 : Interface graphique du logiciel Opticook qui gère l'enregistrement des données des sondes installées dans le four et positionnées dans l'échantillon.	54
Figure 38 : Exemple de spectre obtenu dans l'infrarouge moyen d'échantillon de bœuf.	60
Figure 39 : Exemple de spectre dérivés et lissés avec la méthode de <i>Savitzky-Golay</i> , en prenant une fenêtre de 30 points.....	61
Figure 40 : Exemple de spectre d'émission de fluorescence obtenu pour la matrice "rond parisien" en fonction du degré de cuisson suite à une excitation à 291 nm.....	63
Figure 41 : Exemple de spectre d'émission de fluorescence avec les déconvolutions. Le spectre enregistré (noir) peut être décomposé en deux composantes, pic 1 (magenta, centré vers 320 nm) et pic 2 (bleu, centré vers 340 nm). La courbe rouge correspond à l'ajustement du spectre expérimental grâce à ces deux composantes.	64
Figure 42 : Aspect de l'échantillon avant (a) et après (b) la cuisson. Les thermocouples ont été placés à la surface et au cœur de l'échantillon.....	69
Figure 43 : Graphiques des gradients de température des échantillons : a) SC, b) TC, c) TTC. La figure met en évidence a) 10 °C de différence pour l'échantillon SC, entre la surface et le cœur ; b) 5 °C de différence pour l'échantillon TC, entre la surface et le cœur ; c) Pas de différence de température entre la surface et le cœur de l'échantillon TTC.....	70
Figure 44 : Exemple de courbe RMN obtenue en utilisant la séquence CPMG (τ de 500 μ s) sur un échantillon de viande de bœuf.	71
Figure 45 : Comparaison des déconvolutions des courbes RMN. Modélisation à une exponentielle décroissante. Le tableau de l'ajustement est présenté en annexe 7.....	72
Figure 46 : Comparaison des déconvolutions des courbes RMN. Modélisation à deux exponentielles décroissantes. Le tableau de l'ajustement est présenté en annexe 7.....	72
Figure 47 : Comparaison des déconvolutions des courbes RMN. Modélisation à trois exponentielles décroissantes. Le tableau de l'ajustement est présenté en annexe 7.....	73
Figure 48 : Exemples de courbes RMN obtenues en utilisant la séquence des échos de Hahn (a) et de Solide (b) (τ 9.5 μ s). La courbe noire représente l'échantillon Cru, la rouge l'échantillon Sous Cuit, la bleue l'échantillon Trop Cuit, la magenta l'échantillon Trop Trop Cuit.....	74
Figure 49 : Partie de la courbe de l'écho de Hahn analysée. La courbe présente une pente évidente, indiquée par la flèche et identifiée comme la composante la plus mobile (celle qui relaxe plus lentement).	74
Figure 50 : Ajustement de la fraction de protons la moins rigide de l'écho de Hahn réalisé en utilisant l'équation de Weibull (16). Cet exemple met en évidence une valeur proche de 2 du paramètre de forme <i>b</i> , indice de rigidité de cette fraction de protons. Le tableau de l'ajustement est présenté en annexe 7.....	75
Figure 51 : Ajustement de la composante la moins rigide de l'écho de Hahn : ajustement en utilisant l'équation d'une gaussienne (bleu) qui se superpose parfaitement à l'ajustement réalisé par l'équation de Weibull (rouge). Les tableaux des ajustements sont présentés en annexe 7.....	76
Figure 52 : Intervalle d'intérêt de l'écho de Solide. Les données ont été soustraites des composantes obtenues avec la séquence de l'écho de Hahn.....	76
Figure 53 : Ajustement gaussien (rouge) de la fraction (0-0,1 ms) du spectre de l'écho de Solide soustrait de l'écho de Hahn correspondant à la fraction de protons en forte interaction dipolaire.....	77
Figure 54 : Reconstruction 3D d'images obtenues par tomographie de neutrons. a) échantillon Cru, b) échantillon Sous Cuit, c) échantillon Trop Cuit, d) échantillon Trop Trop Cuit.....	80
Figure 55 : Représentation graphique 3D (SolidWorks) du porte échantillon (a) et du positionnement du four Opticook à côté de la camera (la boîte noire) (b).....	83
Figure 56 : Représentation graphique 3D (SolidWorks) de la position de l'échantillon pendant les mesures couplées (spectroscopie et imagerie) dans le four Opticook.....	84
Figure 57 : Microspectromètre (USB4000, Ocean Optics) composé par (1) l'entrée de la fibre optique, (4) et (6) deux miroirs qui dirigent le signal vers le prisme (5) et puis vers le détecteur (6), une puce CCD, où un pixel correspond à une longueur d'onde.....	84
Figure 58 : Équipements utilisés pour les expériences de spectroscopie de fluorescence et visible. On peut voir sur cette photographie : l'ordinateur qui pilote le logiciel d'acquisition des spectres ; la source de lumière blanche (l'objet cylindrique	

bleu), le générateur du laser à 405 nm (sous cette lampe) ; les fibres optiques dédiées aux mesures de fluorescence (jaune et orange) et aux mesures dans le four (fibres incluses dans une gaine métallique) pour les deux configurations (fluorescence et visible) ; les filtres optiques ; le spectromètre (USB4000 UV-VIS, Ocean Optics) qui est branché à l'ordinateur via un port USB.....	85
Figure 59 : Photographie d'un échantillon de viande de bœuf dans le porte échantillon en aluminium. La taille de l'échantillon était de 5 cm x 3 cm et de 2 mm d'épaisseur. Une sonde de température était placée dans l'échantillon pour suivre la température de cuisson.....	86
Figure 60 : Photographie du four modèle utilisé pour le premier essai de cuisson en ligne, couplé avec l'imagerie de neutrons.....	86
Figure 61 : Four modèle : vision intérieure de l'enceinte et positionnement de l'échantillon. L'échantillon était debout sur le bord de la plaque chauffante en platine, le plus près possible du détecteur.....	87
Figure 62 : Photographie présentant l'ensemble du dispositif utilisé pour les expériences de couplage. On peut voir : la fin du collimateur (tube bleu), le four et la caméra (caché dans une boîte en graphite), l'ordinateur pour piloter l'acquisition des spectres du visible, le spectromètre et la source de lumière blanche, la fibre optique métallique entrant sur le côté gauche du four et le boîtier pour l'acquisition des températures.....	89
Figure 63 : Histogramme du profil sensoriel établi pour les échantillons de bœuf en fonction du degré de cuisson (Sous Cuit (SC), Bien Cuit (BC) et Trop Cuit (TC)). Les expériences ont été réalisées par SEB : un panel sensoriel composé par 15 juges qualifiés à l'analyse sensorielle de la viande a été utilisé. Deux séances ont été organisées pendant lesquelles les juges évaluaient à la fois certaines caractéristiques de l'aspect en observant l'échantillon, et certaines caractéristiques de la texture en goûtant l'échantillon. L'analyse des données a été réalisée par l'analyse de la variance à 2 facteurs (les cuissons et les juges). L'analyse a montré que le panel sensoriel est bien entraîné et performant, car les interactions (cuisson*sujet) de chaque paramètre ne sont pas significativement différentes. La répartition des échantillons en groupes a été réalisée en utilisant le test <i>post-hoc</i> de <i>Newman-Keuls</i> . Les lettres désignent les groupes d'appartenance des échantillons (SC, BC, TC) avec un seuil de significativité de 5 %. La définition des descripteurs selon la norme ISO 5492 de 2008 (ISO 5492:2008) est la suivante : Brillant : qualifie l'aspect d'une surface faisant apparaître des reflex lumineux ; Couleur à cœur : changement de la couleur d'une teinte rouge à une teinte marron ; Couleur en surface : changement de la couleur d'une teinte rouge à une teinte marron ; Fibrosité : particules de forme allongée, orientée dans le même sens ; Granulosité : propriété géométrique de texture qualifiant la perception de la dimension et de la forme des particules d'un produit ; Jutosité : propriété de la texture qualifiant la perception de la quantité d'eau dégagée par un produit ; Tendreté : propriété mécanique de texture liée à la cohésion et en relation avec la dureté d'un produit solide afin de le rendre prêt à être avalé.....	96
Figure 64 : Histogramme du profil sensoriel établi pour les échantillons de blanc de poulet en fonction du degré de cuisson (Sous Cuit (SC), Bien Cuit (BC) et Trop Cuit (TC)). Les expériences et le traitement des données ont été réalisés par SEB, selon les mêmes protocoles que ceux utilisés pour l'échantillon de bœuf. La définition des descripteurs, selon la norme ISO 5492 de 2008 (ISO 5492:2008), est présentée dans la légende de la figure 63.....	97
Figure 65 : Histogramme du profil sensoriel établi pour les échantillons de dos de cabillaud en fonction du degré de cuisson (Sous Cuit (SC), Bien Cuit (BC) et Trop Cuit (TC)). Les expériences ont été réalisées par PFI Nouvelles Vagues : un panel sensoriel composé par 10 juges qualifiés pour l'analyse sensorielle du poisson a été utilisé. Deux séances ont été organisées pendant lesquelles les juges évaluaient à la fois certaines caractéristiques de l'aspect en observant l'échantillon, et à la fois certaines caractéristiques de la texture en goûtant l'échantillon. L'analyse des données a été réalisée par l'analyse de la variance à 2 facteurs (les cuissons et les juges). L'analyse a montré que le panel sensoriel était bien entraîné et performant, car les interactions (cuisson*sujet) de chaque paramètre ne sont pas significativement différentes. La répartition des échantillons en groupes a été réalisée en utilisant le test <i>post-hoc</i> de <i>Fisher (LSD)</i> . Les lettres désignent les groupes d'appartenance des échantillons (SC, BC, TC) avec un seuil de significativité de 5 %. La définition des descripteurs selon la norme ISO 5492 de 2008 (ISO 5492:2008) est la suivante :.....	98
Figure 66 : Tendances des indices de teinte (h_{ab}) et de saturation (C^*_{ab}) (a) ; Différence globale de couleur (ΔE) (b) en fonction du degré de cuisson pour la matrice rond parisien.....	101
Figure 67 : Tendances des indices de teinte (h_{ab}) et de saturation (C^*_{ab}) (a) ; différence globale de couleur (ΔE) (b) en fonction du degré de cuisson pour la matrice blanc de poulet.....	102
Figure 68 : Tendances des indices de teinte (h_{ab}) et saturation (C^*_{ab}) (a) ; différence globale de couleur (ΔE) (b) en fonction du degré de cuisson pour la matrice dos de cabillaud.....	103
Figure 69 : Thermogrammes obtenus pour la matrice bœuf "rond parisien" : la courbe rouge correspond au degré de cuisson Sous Cuit (SC), 45 °C à cœur ; la courbe verte, au degré de cuisson Bien Cuit (BC), 52 °C à cœur ; la courbe bleue, au degré de cuisson Trop Cuit (TC), 68 °C à cœur. Les expériences ont été réalisées entre 25 et 100 °C, en appliquant une rampe de T° de 0,5 °C·min ⁻¹	103
Figure 70 : Thermogrammes obtenus pour la matrice blanc de poulet : rouge, le degré de cuisson Sous Cuit (SC), 56 °C à cœur ; vert, le degré de cuisson Bien Cuit (BC), 66 °C à cœur ; bleu, le degré de cuisson Trop Cuit (TC), 76 °C à cœur. Les expériences ont été réalisées entre 25 et 100 °C, en appliquant une rampe de T° de 0,5 °C·min ⁻¹	105
Figure 71 : Thermogrammes obtenus pour la matrice dos de cabillaud : rouge, le degré de cuisson Sous Cuit (SC), 50 °C à cœur ; vert, le degré de cuisson Bien Cuit (BC), 60 °C à cœur ; bleu, le degré de cuisson Trop Cuit (TC), 80 °C à cœur. Les expériences ont été réalisées entre 25 et 100 °C, en appliquant une rampe de T° de 0,5 °C·min ⁻¹	106

Figure 72 : Exemples de spectres obtenus par réflectance dans le visible d'échantillons de bœuf aux différents degrés de cuisson.	108
Figure 73 : Évolution du rapport d'intensité (580 nm/ 544 nm) en fonction du degré de cuisson pour les matrices rond parisien (a), blanc de poulet (b) et dos de cabillaud (c). Les lettres correspondent aux groupes auxquels les échantillons appartiennent et ont été déterminées par un test de Tukey ($\alpha = 5\%$). Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$).	109
Figure 74 : Exemples de spectres obtenus dans l'infrarouge moyen d'échantillons de bœuf aux différents degrés de cuisson.	110
Figure 75 : Exemple de représentation graphique de l'analyse en composantes principales à partir des spectres FTIR : projection des 30 variables (nombres d'onde les plus représentatifs) sur le plan des facteurs 1 et 2.	111
Figure 76 : Représentation graphique, issue de l'analyse en composantes principales, de la projection des 14 variables restantes sur le plan (facteurs 1 et 2).	111
Figure 77 : Zoom centré sur les coordonnées (0,0) de la projection des 14 variables sur le plan (facteurs 1 et 2) représenté en figure 76.	112
Figure 78 : Représentations graphiques de l'analyse en composantes principales à partir des spectres FTIR des différentes matrices selon leur degré de cuisson : projection des individus sur le plan des facteurs 1 et 2 pour la matrice rond parisien. Les ellipses représentent la région de confiance ($\alpha = 0.05$). Le graphique présente la matrice groupée selon les 3 degrés de cuisson. Dans les cas du rond parisien, l'analyse a mis en évidence que les échantillons SC sont différents par rapport aux BC et TC, par contre ces deux autres degrés de cuisson sont similaires entre eux (superposition des ellipses).	112
Figure 79 : Représentations graphiques de l'analyse en composantes principales à partir des spectres FTIR des différentes matrices selon leur degré de cuisson : projection des individus sur le plan des facteurs 1 et 2 pour la matrice blanc de poulet. Les ellipses représentent la région de confiance ($\alpha = 0.05$). Le graphique présente la matrice groupée selon les 3 degrés de cuisson. Dans les cas du blanc de poulet, l'analyse a mis en évidence que les échantillons SC sont différents par rapport aux BC et TC, par contre ces deux autres degrés de cuisson sont similaires entre eux (superposition des ellipses).	113
Figure 80 : Représentations graphiques de l'analyse en composantes principales à partir des spectres FTIR des différentes matrices selon leur degré de cuisson : projection des individus sur le plan des facteurs 1 et 2 : pour la matrice dos de cabillaud. Les ellipses représentent la région de confiance ($\alpha = 0.05$). Le graphique présente la matrice groupée selon les 3 degrés de cuisson. Les trois degrés de cuisson (SC, BC et TC) sont similaires dans le cas du dos de cabillaud (superpositions des individus).	113
Figure 81 : Exemples de spectres d'émission de fluorescence obtenus pour la matrice "rond parisien" en fonction du degré de cuisson suite à une excitation à 291 nm.	115
Figure 82 : Représentation des intensités maximales (c et d) et des longueurs d'ondes correspondantes (a et b) des deux bandes détectées, en fonction du degré de cuisson pour les trois matrices étudiées. Les barres représentent l'intervalle de confiance calculé en prenant en compte 9 répétitions et 5 % comme degré de confiance (α).	116
Figure 83 : a) Thermogramme de la myosine purifiée (courbe noire) et du muscle de poulet frais (courbe rouge). b) Thermogramme de l'hémoglobine purifiée (courbe noire) et du muscle de porc (courbe rouge). Les expériences ont été réalisées par micro-DSC : 25-100 °C, 0,5 °C·min ⁻¹ .	117
Figure 84 : Photographies de tubes contenant des suspensions d'hémoglobine (0,62 % des protéines totales) en fonction de la température de chauffage (de 40 à 90 °C), suspensions chauffées dans un bain d'huile à 100 °C. L'expérience a été répétée trois fois.	118
Figure 85 : Photographies de tubes contenant des suspensions de myosine (10 g·L ⁻¹) en fonction de la température de chauffage (de 40 à 90 °C), les tubes ont été chauffés dans un bain d'huile à 100 °C. L'expérience a été répétée trois fois.	118
Figure 86 : Photographies de tubes contenant des suspensions du mélange myosine-hémoglobine (ratio environ 30:1) en fonction de la température de chauffage. Le chauffage a été réalisé dans un bain d'huile à 100 °C. L'expérience a été répétée trois fois.	119
Figure 87 : Exemples de spectres de fluorescence de la myosine collectés avant et après avoir chauffé l'échantillon à différentes températures. La figure montre qu'en augmentant la température, l'intensité maximale tend à diminuer. En particulier, la courbe de la myosine à 25 °C est la plus intense (courbe bleue), puis la myosine à 30 °C (courbe verte claire). Ensuite, la courbe verte foncée, orange et magenta, correspondent aux suspensions de myosine chauffées à 40, 50 et 60 °C. Les dernières courbes représentent la myosine chauffée à 70, 80 et 90 °C, courbes noire, rouge et bleue foncée, respectivement.	119
Figure 88 : Évolution de l'intensité de fluorescence des échantillons de myosine en fonction de la température atteinte par la suspension.	120
Figure 89 : Évolution de l'intensité de fluorescence des échantillons du mélange myosine-hémoglobine (ratio 30:1) en fonction de la température de la suspension de mélange myosine-hémoglobine.	121
Figure 90 : Schéma de synthèse : techniques spectroscopiques utilisées pour observer à l'échelle moléculaire la dénaturation des protéines et rendre compte des observations macroscopiques (changement de couleur, de tendreté et de jutosité) selon le degré de cuisson de viande et de poisson.	122

Figure 91 : Thermogrammes obtenus sur des échantillons de viande de bœuf : Cru (noir), Sous Cuit (SC, rouge), Trop Cuit (TC, vert), Trop Trop Cuit (TTC, magenta).....	124
Figure 92 : Teneurs en eau des échantillons de viande selon le degré de cuisson. L'analyse a été réalisée par séchage en étuve (température 104 °C). 33 échantillons par degré de cuisson ont été analysés.....	125
Figure 93 : Exemples de courbes RMN obtenues en utilisant la séquence CPMG (τ de 500 μ s). La courbe noire représente l'échantillon Cru, la rouge l'échantillon Sous Cuit, la bleue l'échantillon Trop Cuit, la magenta l'échantillon Trop Trop Cuit.....	126
Figure 94 : Représentation des temps de relaxation T_2 (a) et de leurs magnitudes (b) des deux populations de protons en fonction du degré de cuisson, suite aux traitements des courbes obtenues par la séquence CPMG. On trouve en vert, la population de protons la plus mobile et en rouge, la population de protons la moins mobile.....	126
Figure 95 : Exemples de courbes RMN obtenues en utilisant la séquence des échos de Hahn (rouge) et de Solide (noir) (τ 9.5 μ s) en fonction du degré de cuisson : (a) Cru ; (b) Sous Cuit ; (c) Trop Cuit ; (d) Trop Trop Cuit. La différence entre la courbe rouge et la courbe noire correspond à la fraction la plus rigide, c'est à dire à la fraction des protons en forte interaction avec la matrice. Cette différence semble évoluer selon le degré de cuisson.....	127
Figure 96 : Représentation des temps de relaxation T_2 (a) et des magnitude (b) des trois populations de protons obtenues après les expériences des échos de Hahn et de Solide en fonction du degré de cuisson.....	128
Figure 97 : Représentation du nombre de protons des séquences RMN de CPMG (noir), des échos de Hahn et de Solide (ensemble, rouge) et issu de la matière sèche (bleu) en fonction du degré de cuisson.....	129
Figure 98 : Représentation de l'évolution du coefficient de diffusion, D ($m^2 \cdot s^{-1}$), en fonction du degré de cuisson d'échantillons de viande de bœuf. Les lettres indiquent l'appartenance de l'échantillon au groupe a ou b, d'après l'ANOVA à 1 facteur et le test de comparaison des moyennes de Tukey ($\alpha = 0.05$; taille de l'échantillon : trois répétitions). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance.....	130
Figure 99 : Échantillons de viande reconstruits en 3D (a Cru, b Sous Cuit, c Trop Cuit, d Trop Trop Cuit). Les images montrent la visualisation en couleurs des défauts présents dans les échantillons, grâce à l'analyse d'images 3D réalisée avec le logiciel AVIZO. En effet, à partir de paramètres rentrés dans le <i>Wizard</i> , ce logiciel a rempli les défauts avec des "pièces" de pixels de plusieurs couleurs pour les séparer les uns des autres.....	131
Figure 100 : Représentation de tranches des échantillons de viande reconstruites et analysées par AVIZO. La première ligne présente les tranches en échelle de gris, alors que la deuxième ligne présente les mêmes tranches avec les défauts remplis par des pixels colorés, après l'analyse des défauts. a) Cru, b) Sous Cuit, c) Trop Cuit, d) Trop Trop Cuit.....	131
Figure 101 : Le graphique présente l'évolution de la morphologie, perte en volume, en fonction du degré de cuisson. Les valeurs sont présentées en pourcentage et les étiquettes expriment le pourcentage de perte. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque degré de cuisson.....	132
Figure 102 : Volume de défauts par rapport au volume total de l'échantillon, en fonction du degré de cuisson. 3 expériences ont été réalisées par degré de cuisson.....	133
Figure 103 : Représentation des allures du nombre de défauts en fonction de leur taille et en fonction du degré de cuisson. Les défauts inférieurs à 0,075 % sont indiqués en noir et en rouge ceux qui sont supérieurs à 0,075. Le choix de ce seuil a été fait en observant que les changements de taille se vérifient entre le seuil 0,05 et 0,1 %. Le choix du seuil (0,075) a été fait à partir d'une étude préliminaire qui a considéré plusieurs autres seuils (de 0 à 2) qui ont indiqué que des changements de taille se vérifient en fonction de la température entre le seuil 0,05 et 0,1.....	134
Figure 104 : Représentation des allures de défauts en surface et à l'intérieur de l'échantillon. La figure montre l'évolution des tailles des défauts (gros et petits) des morceaux de viande en fonction du degré de cuisson et en fonction de leur localisation : à la surface (lignes noir et rouge (a)) et l'intérieur du morceau (lignes bleu et magenta (b)). La représentation des défauts de surface et internes, gros et petits, est présentée en pourcentage par rapport au contenu total, moyen, de défauts en fonction du degré de cuisson.....	134
Figure 105 : Schéma de synthèse des événements observables au niveau microscopique lors de la cuisson. Orange : filaments épais de myosine ; Noir : filaments minces d'actine ; Bleu foncé : eau en forte interaction avec les fibres ; Bleu clair : eau en faible interaction avec les fibres. a) présentation (vue frontale, gauche, et latérale, droite) de la structure d'une myofibrille à température ambiante : organisation très régulière des filaments de myosine et d'actine et de l'eau à l'intérieur de la structure myofibrillaire ; b) présentation de l'effet de la cuisson à température moyenne : la dénaturation de la myosine (42-55 °C) provoque la contraction latérale des myofibrilles (46-63 °C) et la sortie de l'eau vers les espaces intermyofibrillaires ; c) présentation de l'effet de la cuisson à haute température : la contraction du collagène, suite à sa dénaturation (57-66 °C) génère des forces longitudinales qui provoque la réduction de la longueur des fibres musculaires (donc des myofibrilles). Les espaces disponibles pour l'eau diminuent et celle-ci tend à sortir vers la matrice extracellulaire. Pour finir, la dénaturation de l'actine se produit à plus haute température (76-80 °C), ce qui favorise la formation de nouvelles interactions, en créant des nouvelles structures. L'eau est alors définitivement exclue du muscle.....	136
Figure 106 : Présentation des données expérimentales de transmittance en fonction de l'épaisseur d'une cuve d'aluminium remplie d'eau (les points noirs) et les ajustements réalisés par les équations (30) (courbe noir) et (25) (courbe rouge), dont les paramètres estimés ont permis de corriger l'effet de la diffusion multiple pour des épaisseurs supérieures à 2 mm.....	138
Figure 107 : Comparaison des images neutroniques (sur la gauche) et des profils de Sigma*Zeta correspondants (sur la droite) du rond parisien en fonction de l'épaisseur des tranches : 1, 2, 3 et 4 mm. Les profils ont été collectés à 36 mm (et 28 mm	

tranche de 2 mm d'épaisseur) (hauteur) des images et représentent le paramètre Sigma*Zeta en fonction de la position à l'intérieur de la cellule d'aluminium. Les valeurs de Sigma*Zeta proches de 0 (noir) sont liées au porte échantillon (en aluminium) alors que, les valeurs proches de 0,45 signifient l'absorption totale des neutrons par l'échantillon. Entre ces deux valeurs, l'absorption des neutrons par l'échantillon dépend de son épaisseur et de sa composition chimique (tissu maigre, tissu gras et teneur en eau).....	139
Figure 108 : Photographie d'un échantillon de viande de bœuf dans le porte échantillon en aluminium. La taille de l'échantillon était de 5 cm x 3 cm et de 2 mm d'épaisseur. Une sonde de température était placée dans l'échantillon pour suivre la température de cuisson.....	140
Figure 109 : Images neutroniques d'un échantillon de bœuf de 2 mm d'épaisseur, a) l'échantillon cru ; b) le même échantillon cuit à 68 °C. Les couleurs correspondent à différentes valeurs d'atténuation (de 0 à 0,5). Le périmètre initial (de l'échantillon cru) est montré par une ligne blanche superposée à l'image de l'échantillon cuit.....	140
Figure 110 : Profils d'atténuation de neutrons pris à différentes positions des images (du haut vers le bas) : échantillon cru (a), échantillon cuit à 68 °C (b).....	141
Figure 111 : Évolutions de la surface des tranches en fonction de la température de cuisson, pour les tranches coupées transversalement (perpendiculairement aux fibres) ou coupées longitudinalement (parallèlement aux fibres).....	142
Figure 112 : Photographie du four modèle utilisé pour la première expérience de cuisson en ligne de la tranche de viande par imagerie de neutrons (à gauche). Positionnement de la cellule en aluminium contenant l'échantillon à l'intérieur du four modèle (à droite).....	143
Figure 113 : Photographie de l'échantillon (a) cru et cartographies neutroniques réalisées sur les tranches : crue (b) et cuite à 106 °C (c). Les contours (lignes jaunes) représentent les niveaux de gris isointensité des valeurs Sigma*Zeta (de 0 à 0,6, par pas de 0,1 unité).....	143
Figure 114 : Représentation des valeurs d'atténuation en fonction de la température de cuisson. Les coordonnées des points (pixel) sont : rouge (35;2,12) ; vert (31,4;8) ; bleu (26,56;16) ; bleu clair (21,72;24) ; magenta (18,04;29,8) ; noir (16,84;32) ; marron (12,04;40) ; bleu foncé (7,12;48).....	144
Figure 115 : Représentation des valeurs d'atténuation en fonction de la température de cuisson (zoom sur les points centraux des images pendant la cuisson en ligne, bleu clair (21,72;24) ; magenta (18,04;29,8) ; noir (16,84;32).....	144
Figure 116 : Images du four équipé avec la cellule échantillon développée pour les mesures couplées a) Positionnement du porte échantillon à l'intérieur de la cavité du four ; b) Positionnement de la viande dans la cellule avec la fibre optique devant la fenêtre en quartz. Une sonde de température est aussi introduite dans l'échantillon.....	145
Figure 117 : Spectres d'émission de fluorescence, après excitation à 405 nm, d'une tranche de poulet de 2 mm. La cuisson et la collecte des données ont été réalisées online, en positionnant la fibre à l'intérieur du four. La température de l'échantillon a été suivie par un thermocouple positionné à l'intérieur de la cellule échantillon dans la tranche.....	146
Figure 118 : Évolution des intensités de fluorescence à 506 nm de la matrice blanc de poulet en fonction de la température en cours de cuisson (tranche de 2 mm).....	146
Figure 119 : Spectres collectés dans le visible en mode réflexion sur une tranche de rond parisien cuite au four. La cuisson et la collecte des données ont été réalisées online, en positionnant la fibre à l'intérieur du four. La température de l'échantillon a été suivie par un thermocouple positionné à l'intérieur de la cellule échantillon dans la tranche.....	147
Figure 120 : Rapport entre les intensités des bandes observées en réflectance à 580 et 540 nm, en fonction de la température de cuisson. Ces mesures ont été répétées trois fois.....	148
Figure 121 : Rampes de température mesurées pour les trois échantillons étudiés. La montée de la température n'est pas linéaire dans tout l'intervalle temporel. Elle peut être subdivisée en trois parties: entre 100 et 400 secondes, la montée de température était de 10,8 °C·min ⁻¹ ; entre 400 et 600 secondes, la rampe était de 4,8 °C·min ⁻¹ ; entre 600 et 900 secondes, 1,2 °C·min ⁻¹	149
Figure 122 : a) Exemple d'image normalisée par le faisceau blanc, et nettoyée (filtre médian) pour enlever les pixels blancs associés aux rayons gamma. La partie de l'image tout en haut, à l'intérieur du demi-cercle est la partie du porte échantillon ouverte (hublot) correspondant à la zone analysée par spectroscopie (entourée en rouge). b) Évolution de la morphologie des trois échantillons étudiés en fonction de la température de cuisson.....	149
Figure 123 : Images d'un échantillon de bœuf à 53 °C (a) et 95 °C (b). Le contour rouge représente le périmètre de l'image initiale à 20 °C.....	150
Figure 124 : Présentation des points choisis sur lesquels l'évolution de l'atténuation a été suivie. Les points noir et jaune foncé sont localisés sur les bords de la tranche ; les points rouge, bleu, magenta, vert, bleu foncé, violet foncé, violet, et rouge foncé représentent les points localisés à l'intérieur de la tranche.....	151
Figure 125 : Représentation des évolutions des valeurs d'atténuation des deux points externes de la diagonale (point 1 et point 10) ,en fonction de la température de cuisson, pour les trois tranches de bœuf considérées.....	152
Figure 126 : Représentations des évolutions de l'atténuation des huit points centraux, en fonction de la température de cuisson. Zoom sur les points centraux des trois tranches considérées.....	153
Figure 127 : Les figures présentent la cartographie 2D de la petite région de l'échantillon sélectionnée, dans la zone ouverte du porte échantillon (hublot dédié aux mesures optiques), la zone explorée par spectroscopie : a) image capturée à 20 °C ; b) image capturée à 51 °C ; c) image capturée à 95 °C. Les images présentent les niveaux d'intensités par des couleurs : 0,2 bleu foncé ;	

0,2-0,3 bleu ; 0,3-0,4, bleu clair ; 0,5 vert ; 0,6 orange ; 0,7 rouge ; 0,8-1 rouge foncé. Les séries de cartographies produites à partir des images enregistrées pendant les cuissons, des trois répétitions, sont présentées dans les annexes 7, 8 et 9. 155

Figure 128 : Évolution du ratio entre les intensités à 580 et 544 nm en fonction de la température pour les trois échantillons. 156

Figure 129 : Schéma de synthèse des résultats obtenus lors des expériences de couplage : cuisson en ligne dans le four Opticook, spectroscopie visible, imagerie de neutrons. On retrouve sur cette figure la corrélation entre le ratio des intensités à 580 et 544 nm (passage des formes oxy- à met- des hémoprotéines) et les images de neutrons, en fonction de la rampe de température. Les graphiques et les images des intensités de neutrons sur les côtés présentent les effets à certaines températures clefs 20, 50 et 90 °C : donc au début, au milieu et à la fin de la cuisson. 158

Figure 130 : Photographies de tubes contenant des suspensions de myosine ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en fonction de la température de chauffage (de 40 à 90 °C), pour les tubes chauffés dans un bain d'huile à 100 °C (a) ou de 25 à 50 °C, pour les tubes chauffés dans un bain d'huile à 65 °C (b). L'expérience a été répétée trois fois. 166

Figure 131 : Exemple d'échantillon cuit dans le tube RMN (a) et de l'eau expulsée de l'échantillon au fond du tube (b)..... 168

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique moyenne d'un muscle typique de mammifère après le rigor-mortis (Lawrie et Ledward, 2006). En gras, les protéines qui seront plus particulièrement étudiées dans cette thèse.	11
Tableau 2 : Tableau récapitulatif du nombre d'ondes relatif aux différents types de structure secondaire des protéines (Dong et Caughey, 1994).	32
Tableau 3 : Caractéristiques du four Opticook.	51
Tableau 4 : Temps nécessaires à l'échantillon pour atteindre la bonne valeur de température à cœur pendant les cuissons, températures finales à cœur et correspondant au degré de cuisson.	58
Tableau 5 : Composition des tampons utilisés pour les expériences d'électrophorèse.	66
Tableau 6 : Composition chimique, moyenne, des trois matrices considérées (% sur matière humide). Les données mettent en évidence les différences en termes de composition en protéines des trois matrices. Pour ce qui concerne la teneur en myoglobine de la matrice dos de cabillaud, la valeur indiquée est celle de la Loquette d'Amérique (<i>Zoarcetes americanus</i>), poisson à chair blanche qui provient de l'atlantique nord comme le cabillaud.	95
Tableau 7 : Valeurs de la perte en eau des échantillons rond parisien, blanc de poulet et dos de cabillaud en fonction du degré de cuisson déterminée par différence de masse avant et après cuisson.	99
Tableau 8 : Valeurs des coordonnées cartésiennes mesurées selon le standard CIE-Lab* (1974) en surface et à cœur des échantillons de rond parisien. Les mesures ont été réalisées grâce à un chromamètre (Chroma Meter CR-410, Konica Minolta), juste après cuisson à la fois sur la surface et à cœur. L'expérience a été réalisée en posant l'outil sur l'échantillon et en collectant trois paramètres du standard Lab* (L, luminosité ; a*, la coordonnée couleur rouge-vert (rouge valeurs positives, vert valeurs négatives) ; b*, la coordonnée jaune-bleu (jaune valeurs positives, bleu valeurs négatives). L'expérience a été répétée une fois.	100
Tableau 9 : Valeurs des coordonnées cartésiennes mesurées selon le standard CIE-Lab* (1974) en surface et à cœur d'échantillons de blanc de poulet. L'expérience a été répétée une fois.	101
Tableau 10 : Valeurs des coordonnées cartésiennes mesurées selon le standard CIE-Lab* (1974) en surface et à cœur des échantillons de dos de cabillaud. L'expérience a été répétée une fois.	102
Tableau 11 : Détail des températures de début de pic et du pic de dénaturation de la matrice bœuf. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de trois répétitions (trois cuissons différentes).	104
Tableau 12 : Détail des températures de début de pic et du pic de dénaturation de la matrice blanc de poulet. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de trois répétitions (3 cuissons différentes).	105
Tableau 13 : Détail des températures de début de pic et du pic de dénaturation de la matrice dos de cabillaud. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de trois répétitions (trois cuissons).	106
Tableau 14 : Résumé des résultats obtenus avec les mesures sensorielles, colorimétriques et calorimétriques. Les annotations indiquent si ces barèmes de cuisson apportent des différences entre les échantillons : ++ : très différents ; + : un peu différents ; - : pas de différence.	107
Tableau 15 : Intensités moyennes des 8 nombres d'ondes utilisés pour l'analyse ANOVA à 1 facteur, en fonction du degré de cuisson appliqué. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de neuf répétitions \pm l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$) de la matrice rond parisien (a), blanc de poulet (b) et dos de cabillaud (c). Les lettres correspondent aux groupes auxquels les échantillons appartiennent et ont été déterminées par un test de Tukey ($\alpha = 5\%$).	114
Tableau 16 : Valeurs d'intensité maximale et de longueur d'onde correspondante en fonction de la température atteinte dans le tube lors d'une immersion en bain d'huile à 100 °C des échantillons de myosine. Les données reportées correspondent aux valeurs moyennes et aux écarts types de 4 répétitions.	120
Tableau 17 : Valeurs d'intensité maximale et de longueur d'onde correspondant à ce maximum, en fonction de la température atteinte dans le tube lors d'une immersion en bain d'huile à 100 °C des échantillons du mélange myosine-hémoglobine. Les données présentées correspondent aux valeurs moyennes et aux écarts types de quatre répétitions.	121
Tableau 18 : Températures de transition (de début du pic de dénaturation et du pic) observées dans la viande après la cuisson. 10 répétitions ont été réalisées pour chaque barème de cuisson appliqué.	124
Tableau 19 : Récapitulatif des protocoles de cuisson Opticook (températures à cœur et temps nécessaire pour que la température à cœur soit atteinte), des mesures de calorimétrie sur les échantillons crus et les résultats de l'analyse sensorielle et de la couleur avec la méthode Lab* de la matrice rond parisien.	163
Tableau 20 : Récapitulatif des protocoles de cuisson Opticook (températures à cœur et temps nécessaire pour que la température à cœur soit atteinte), des mesures de calorimétrie sur les échantillons crus et les résultats de l'analyse sensorielle et de la couleur avec la méthode Lab* de la matrice blanc de poulet.	164
Tableau 21 : Récapitulatif des protocoles de cuisson Opticook (températures à cœur et temps nécessaire pour que la température à cœur soit atteinte), des mesures de calorimétrie sur les échantillons crus et les résultats de l'analyse sensorielle et de la couleur avec la méthode Lab* de la matrice dos de cabillaud.	164

Liste des abréviations

DTT	→	dithiothréitol
DMSO	→	diméthylsulfoxyde
ATP	→	adénosine triphosphate
EDTA	→	acide éthylène diamine tétra-acétique
SDS	→	dodécylsulfate de sodium
TEMED	→	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
IHP	→	inositol hexaphosphate
SC	→	Sous Cuit
BC	→	Bien Cuit
TC	→	Trop Cuit
TTC	→	Trop Trop Cuit
UV	→	ultraviolet
VIS	→	visible
PIR	→	proche infrarouge
MIR	→	moyen infrarouge
FTIR-ATR	→	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à réflectance totale atténuée
G'	→	module élastique
G''	→	module visqueux
RMN-bc	→	Résonance Magnétique Nucléaire – bas champ
M	→	Énergie de magnétisation
M _{xy}	→	Énergie de magnétisation transversal (plan x,y)
B ₀	→	champ magnétique de polarisation (permanent)
B ₁	→	champ magnétique d'excitation
FID	→	Free Induction Decay
T ₁	→	temps de relaxation longitudinale
T ₂	→	temps de relaxation transversale
T ₂ [*]	→	temps de relaxation transversale de la séquence FID
CPMG	→	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
MRI	→	imagerie de résonance magnétique nucléaire
¹ H-MRI	→	imagerie de RMN du proton
²³ Na-MRI	→	imagerie de RMN du sodium 23
WHC	→	water holding capacity
THz	→	imagerie terahertz
oxy-Hb	→	oxy-hémoglobine
désoxy-Hb	→	désoxy-hémoglobine
met-Hb	→	met-hémoglobine
oxy-Mb	→	oxy-myoglobine
met-Mb	→	met-myoglobine
2,3-DPG	→	2,3-diphosphoglycerate
Trp-α-14	→	résidu de tryptophane numéro 14 de la chaîne α de l'hémoglobine
Trp-β-15	→	résidu de tryptophane numéro 15 de la chaîne β de l'hémoglobine
Trp-β-37	→	résidu de tryptophane numéro 37 de la chaîne β de l'hémoglobine

S1	→	sous-unité 1 de la myosine (la tête)
S2	→	sous-unité 2 de la myosine
LMM	→	méromyosine légère (low meromyosin)
HMM	→	méromyosine lourde (heavy meromyosin)
ACP	→	analyse en composantes principales
ANOVA	→	analyse de la variance
I_{\max}	→	intensité d'émission fluorescence maximale
λ_{\max}	→	longueur d'onde à laquelle l'intensité est maximale
T_{pic}	→	température du pic de dénaturation
T_{onset}	→	température de début de dénaturation

Introduction

Introduction

Le projet Open Food System (OFS) est un projet d'innovation technologique dont l'ambition est de changer la façon dont les particuliers et les cuisiniers professionnels voient et utilisent la cuisine, en créant un écosystème de cuisine numérique. L'ambition est de faciliter la vie quotidienne des utilisateurs de cette cuisine du futur, grâce à la création de dispositifs de contrôles automatiques, de recettes digitales modifiables selon les besoins nutritionnels et les goûts des consommateurs, et d'outils connectés entre eux ou à internet.

Ce projet, qui rassemble 25 partenaires provenant du secteur privé ou de la recherche académique est sous-divisé en deux programmes de recherche et de développement :

- le programme “Nos Recettes” porte sur l'innovation dans tous les services digitaux liés à la cuisine du futur. Il est prévu par exemple de développer une plateforme de recettes numériques (leFoodle) associée à un moteur de recommandation basé sur des profils utilisateurs individualisés. Cette plateforme pourrait permettre de diffuser à l'étranger du savoir-faire et du patrimoine culinaire français. De plus, la création d'un écosystème “expérience cuisine”, le LABCOOK, doit faciliter la communication entre les appareils de la cuisine et l'espace numérique pour garantir au consommateur la réussite de la recette.
- le programme “Opticook” est la partie du projet qui vise à innover sur la technologie des fours, grâce au développement de capteurs capables de suivre et de piloter la cuisson de viande et poisson, sans contact avec l'aliment et sans intervention humaine. Plusieurs axes de recherche sont développés dans ce programme qui doivent permettre d'optimiser la cuisson de viande et de poisson, d'identifier les réactions biochimiques qui permettront aux capteurs de suivre la cuisson sans intrusion, de développer ces capteurs et de les intégrer dans les fours. Les capteurs développés seront majoritairement des capteurs spectroscopiques ou des capteurs basés sur l'analyse des composés volatils.

Ma thèse fait partie du programme “Opticook”. Elle porte sur la biochimie et la physico-chimie de la cuisson de viande et de poisson. Elle concerne la dénaturation thermique des protéines du muscle et son suivi en ligne, dans un four, par l'utilisation de capteurs spectroscopiques. L'un de nos objectifs est de montrer que les protéines sont les bons marqueurs spectroscopiques de suivi de la cuisson, capables de rendre compte de l'application de plusieurs barèmes de cuisson. Les principales questions que nous nous sommes posées pendant cette thèse sont :

- à quelle échelle de structure (du moléculaire au microscopique) et grâce à quel(s) outil(s) spectroscopique(s) doit-on observer les protéines de la viande et du poisson pour distinguer (ou discriminer) différents degrés de dénaturation (c'est-à-dire différents degrés de cuisson) ?

- comment rendre compte d'une dénaturation thermique des protéines à l'intérieur d'un morceau de viande en faisant une mesure spectroscopique de surface, l'usage d'une sonde intrusive étant exclu pour supprimer les risques d'hygiène ?

La cuisson de la viande et du poisson est souvent étudiée en sciences des aliments en observant l'évolution de leurs caractéristiques macroscopiques, comme par exemple leur texture et leur couleur, à partir de mesures instrumentales physico-chimiques. Ces mesures sont parfois complétées ou couplées à des mesures réalisées par analyse sensorielle, avec des panels d'experts ou par des tests hédoniques. D'autres études ont cependant montré que les marqueurs spectroscopiques, que nous recherchons et qui nous permettront de suivre la cuisson, sont en partie associés à des modifications de structures des protéines qui constituent le muscle aux échelles moléculaires et microscopiques. Les deux premières parties de la thèse ont donc été consacrées aux observations de l'impact de la température sur les protéines à ces deux échelles de structure : moléculaire dans la première partie et microscopique dans la seconde partie. Dans une troisième partie, nous avons essayé de faire le lien entre ces deux échelles, et de coupler les approches en réalisant des mesures pendant la cuisson de la viande.

Dans un premier temps, nous avons donc recherché les signatures spectroscopiques de la dénaturation thermique des différentes protéines de la viande et du poisson (myosine, hémoprotéines et collagène, échelle moléculaire). Les mesures réalisées sur des échantillons de bœuf, de poulet et de cabillaud dans les domaines du visible et du proche infrarouge, nous ont permis de sonder la structure des hémoprotéines, et plus particulièrement d'observer les changements d'état d'oxydation de l'atome de fer et de ligands au niveau de l'hème, selon le degré de cuisson ou pendant la cuisson. Ces observations à l'échelle moléculaire sont associées à l'échelle macroscopique, à des changements de couleur mesurés par colorimétrie ou par un panel d'experts en évaluation sensorielle sur ce même type d'échantillons.

D'autre part, en utilisant les spectroscopies de moyen infrarouge ou de fluorescence du tryptophane, il est possible de distinguer différents degrés de cuisson d'échantillons de bœuf, de poulet et de cabillaud. Avec ces spectroscopies, ce sont les changements de structures secondaires des protéines que nous pouvons observer suite à l'application de différents barèmes de température. Au niveau macroscopique ces échantillons, correspondant à différents degrés de cuisson, présentent des textures différentes. À l'échelle moléculaire, il est difficile d'attribuer les différences observées par spectroscopies sur ces échantillons complexes à l'une ou l'autre des fractions protéiques. Nous avons approfondi cet aspect en créant un système modèle, constitué de myosine et d'hémoglobine. L'observation de la réorganisation structurale de la myosine à l'échelle macroscopique a été réalisée en évaluant la turbidité des suspensions protéiques après chauffage. Les changements de structure de la protéine (ou des protéines en mélange) à l'échelle moléculaire, c'est-à-dire au niveau de ses résidus de tryptophane, ont été étudiés par spectroscopie de fluorescence, la fluorescence du résidu indole étant influencée par son environnement électronique.

Les changements de structure que subissent ces protéines à certaines températures clés sont aussi associés à des changements à d'autres échelles de structure (microscopique et macroscopique) au travers d'interactions ou d'agrégations. Des phénomènes de gélication des

fibres, de séparation de phase ou de migration de jus sont alors observés d'un point de vue macroscopique. Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'impact des barèmes de cuisson sur les modifications de structure de la matrice, qui impliquent à cette échelle, la contraction des myofibrilles et provoquent la libération du jus. Pour cela, nous avons réalisé des mesures sur des échantillons de bœuf cuits à plusieurs degrés de cuisson en utilisant la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à bas champ et la tomographie de neutrons.

La dernière partie de la thèse a eu pour objectif de coupler les deux approches moléculaires et microscopiques, en effectuant des mesures pendant la cuisson dans le four équipé de capteurs prototypes (fibre optique). Le couplage a donc été réalisé en utilisant trois "acteurs" pendant la cuisson :

- le four du programme Opticook, un four semi-professionnel, utilisé pour réaliser les cuissons, modifié (avec des hublots essentiellement) pour pouvoir faire des mesures spectroscopiques et de l'imagerie de neutrons ;
- l'imagerie de neutrons qui nous a permis de suivre les changements de morphologie, la contraction des fibres et la migration du jus ;
- la spectroscopie qui donne des informations sur le degré de cuisson en sondant la structure des protéines qui constituent la viande.

Ce manuscrit est constitué de plusieurs chapitres. Après cette introduction, nous présentons dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique qui nous a permis de faire des rappels sur les constituants de la viande avec un focus sur les protéines. Nous dressons dans ce chapitre l'état de l'art concernant l'impact de la cuisson sur la viande. Nous avons plus particulièrement cherché à synthétiser quels étaient les outils d'observation utilisés dans les études précédentes pour rendre compte de l'effet de la température sur la structure des protéines. Dans un second chapitre, nous présentons et résumons l'ensemble des matériels et méthodes utilisés dans nos expériences. Le chapitre suivant (chapitre 3) correspond à la présentation des résultats obtenus sur l'approche moléculaire (partie 1), microscopique (partie 2) et le couplage avec les mesures de cuisson en ligne (partie 3). Nous discutons l'ensemble de ces résultats dans le chapitre 3 et terminons par une conclusion et les perspectives du travail.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

Partie 1 : Composition et structure du muscle

Composition chimique

Les muscles sont des unités anatomiques organisées par l'union de milliers de fibres musculaires, de tissus conjonctifs, nerveux et vasculaires. Leur principale activité est d'utiliser l'énergie chimique, stockée sous forme d'ATP, pour produire force, pour structurer, soutenir et réchauffer le corps ainsi que pour générer le mouvement lors du processus de contraction musculaire. Les muscles sont regroupés en trois catégories différentes, selon leur structure, leur propriété contractile et leur mécanisme de contrôle :

- muscle lisse, qui enrobe toutes les cavités des organes ;
- muscle cardiaque ;
- muscle squelettique.

Le muscle squelettique est le plus utilisé comme aliment. Il est composé de 75 % d'eau (m/m), 19 % de protéines, 2,5 % de lipides, 1,2 % de polysides, 3,5 % de substances solubles non-protéiniques comprenant les minéraux et les vitamines (Lawrie et Ledward, 2006). Le tableau 1 récapitule la composition chimique moyenne de la viande sur une base sèche, en pourcentage en masse.

Tableau 1 : Composition chimique moyenne d'un muscle typique de mammifère après le rigor-mortis (Lawrie et Ledward, 2006). En gras, les protéines qui seront plus particulièrement étudiées dans cette thèse.

Classes de Composés	Composition sur Matière Sèche (%)		Catégorie	Composants	Contenu du Composant Fonction de la Catégorie (%)	Références et Notes
Protéines	46,4		Protéines Myofibrillaires	Myosine	50	(Huxley et Hanson, 1957; Asghar et al., 1985; Lawrie et Ledward, 2006)
				Actine	20	
				Autres Protéines Myofibrillaires	30	
	75,8	21,4	Protéines Sarcoplasmiques	Myoglobine	3,8	(Asghar et al., 1985; Lawrie et Ledward, 2006)
				Enzymes Glycolytiques	75,5	
				Hémoglobine + Autres	20,7	
	8,0		Protéines du Tissu Conjonctif	Collagène	50	(Asghar et al., 1985; Lawrie et Ledward, 2006) * <i>Semitendinosus</i> (Bendall, 1967)
				Élastine	2,5 (37*)	
				Autres	47,5	
Lipides	10,1	/		C16:0	22-29	(Cho et al., 2005; Lawrie et Ledward, 2006)
				C18:0	9-22,6	
				C18:1 (Ω9)	47-52	
				C18:2 (Ω6)	1-14	
				C18:3 (Ω3)	0,08-1,4	

Polyosides	4,8	/	Acide Lactique	75	(Lawrie et Ledward, 2006)			
			Glucose + Intermédiaires	16,7				
			Glycogène	8,3				
Mélange de Substances Solubles Non-Protéiniques	6,7	Azotées	Créatine	33,3	(Lawrie et Ledward, 2006)			
			Inosine monophosphate (IMP)	18,2				
			Nucléotides Di-/Tri- Phosphates	6,1				
			Acides Aminés	21,2				
			Carnosine, Anserine	21,2				
	9,3		Phosphore Soluble Total	30,8				
			K ⁺	53,8				
			Na ⁺	7,7				
			Mg ⁺⁺	3,1				
			Ca ⁺⁺ , Zn ⁺ , Autres Métaux	4,6				
2,6	Inorganiques	Fe ⁺⁺	3,1	(Lombardi-Boccia et al., 2005)				
		Thiamine (B1)	0,01-0,9	(Lombardi-Boccia et al., 2005) mg/100 g				
		Riboflavine (B2)	0,09-0,17	(Lombardi-Boccia et al., 2005; Duchène et al., 2010) mg/100 g				
		Niacine (B3)	3,7-6,5	(Duchène et al., 2010) mg/100 g				
		Pyridoxine (B6)	0,3-0,5	(Duchène et al., 2010) µg/100 g				
Vitamines	Traces	/	Cobalamine (B12)	1,2-4,6	(Duchène et al., 2010) µg/100 g			
			Classes de Composés	Composition sur Matière Sèche (%)	Catégorie	Composants	Contenu du Composant Fonction de la Catégorie (%)	Références et Notes

Ce tableau montre qu'il existe trois grandes familles de protéines constitutives du muscle : les protéines myofibrillaires, les protéines sarcoplasmiques et les protéines du tissu conjonctif. La catégorie des myofibrilles, à savoir 61 % des protéines totales, est représentée par la myosine (50 %) et l'actine (20 %). Ce sont les protéines majoritaires du muscle, puisqu'elles composent 70 %, environ, des protéines myofibrillaires totales (Huxley et Hanson, 1957; Asghar et al., 1985; Lawrie et Ledward, 2006). Les protéines sarcoplasmiques, 28 % du total, sont un ensemble de protéines globulaires solubles dans l'eau ou dans des solutions salines à faible force ionique qui sont localisées dans le sarcoplasme (myoglobine et enzymes glycolytiques) ou à l'extérieur de la cellule (hémoglobine) (Hanson et Huxley, 1957; Asghar et al., 1985; Lawrie et Ledward, 2006). Le tissu conjonctif est la troisième famille de protéines constituant le muscle (11 %). Localisé dans la matrice extracellulaire, le tissu conjonctif est composé par le collagène, type IV et type V principalement, une glycoprotéine soluble dans les solutions salines concentrées et acides (Miller et Rhodes, 1982; Light et Champion, 1984; Shoulders et Raines, 2009).

Les valeurs présentées dans le tableau 1 sont des valeurs moyennes, puisque les proportions des composants chimiques sont très variables et dépendent de plusieurs facteurs : de l'animal même,

de son espèce, de sa race et de son âge. Ces valeurs seront aussi fonction de la nourriture, du type d'élevage, des techniques d'abattage et des modalités de conservation et de distribution de la viande.

Par exemple, si l'on considère le paramètre "espèce" entre le muscle de cabillaud, de bœuf et de poulet, la chair qui possède la teneur en eau la plus élevée est celle du cabillaud, avec 80-88 % d'eau (Love, 1960; Stefansson et Hultin, 1994; Thorarinsdottir et al., 2002), par rapport aux muscles de bœuf (66-76 %) (Jeremiah et al., 2003) et de poulet, environ 74-77 % (Wattanachant et al., 2004; Jaturasitha et al., 2008). La teneur en protéines est de 18 % pour le cabillaud, 18-22 % pour le bœuf, et 21-24 % poulet. Pour les lipides, bœuf et poulet sont aussi différents avec 1,5-17 % pour le bœuf et 0,5-2,4 % pour le poulet (Stefansson et Hultin, 1994; Vega-Warner et al., 1999; Suchy et al., 2002; Thorarinsdottir et al., 2002; Bureš et al., 2006; Bogosavljevic-Boskovic et al., 2010). L'âge de l'animal influence aussi cette composition, et les proportions d'eau du tissu gras et du tissu conjonctif changent avec la croissance, en modifiant la consistance de la viande (Offer et Knight, 1988b). La teneur en myoglobine permet de différencier les viandes de différentes espèces en fonction de la couleur : la viande de bœuf rouge, est plus riche en myoglobine, qu'une viande blanche comme celle du poulet.

L'architecture du muscle

Les muscles squelettiques possèdent des formes et des tailles différentes et leur architecture est très complexe. Le muscle est lié aux os grâce aux tendons. La masse musculaire est enrobée par l'épimysium qui a la fonction d'assurer le soutien et la protection du muscle même. En allant vers l'intérieur, le muscle est organisé en plusieurs faisceaux musculaires, qui sont entourés d'une couche de tissu conjonctif, le périmysium. Ces faisceaux sont constitués de fibres musculaires, les cellules du muscle, enveloppées une par une par l'endomysium. Une image détaillée de l'architecture du muscle est présentée en figure 1.

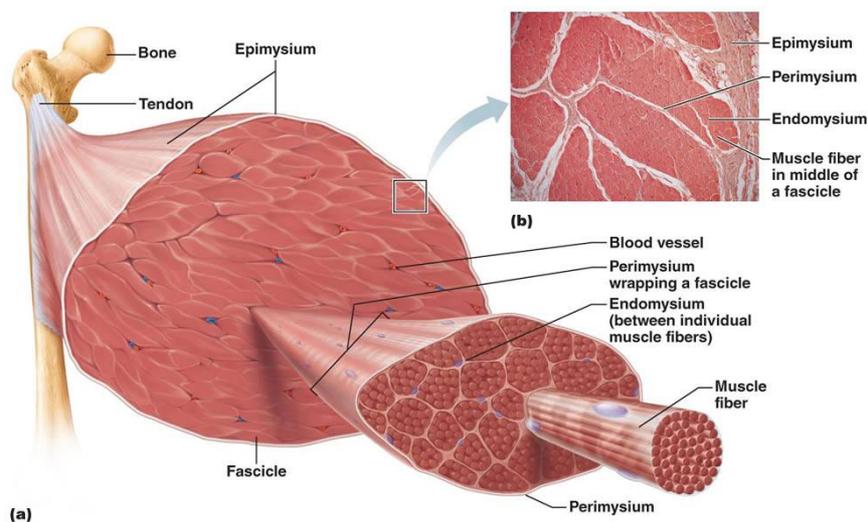


Figure 1 : a) Architecture du muscle squelettique du tendon liant le muscle à l'os, aux faisceaux jusqu'aux fibres musculaires. b) Image détaillée d'une portion de muscle mettant en évidence les trois grands niveaux de structure : l'épimysium qui englobe la masse musculaire entière, le périmysium qui regroupe les faisceaux musculaires, puis l'endomysium qui correspond aux fibres musculaires. Person Éducation.

Fibres musculaires et myofibrilles

Les fibres musculaires, appelées myocytes, sont des cellules polynucléées de forme cylindrique qui se forment pendant le développement grâce à la fusion de cellules mononucléées, les myoblastes. Les myocytes (10-100 μm de diamètre et long de plusieurs centimètres) sont constituées par de longs filaments protéiniques, les myofibrilles ou protéines myofibrillaires, lesquelles sont localisées à l'intérieur de la cellule même, dans le sarcoplasme. Les myofibrilles possèdent un diamètre compris entre 0,25 et 3 μm selon le type de fibre (rouge ou blanche) et de muscle considérés. Leur longueur est très variable, entre 10 et 100 μm , et dépend du muscle et de son état relaxé ou contracté (Aliev et Tikhonov, 2004; Craig et Padrón, 2004; Chien et al., 2008; Rashed et El-Alfy, 2012).

L'unité contractile fondamentale constituant les myofibrilles est le sarcomère, une structure très complexe et caractérisée par la présence de plusieurs types de protéines, avec des fonctions très différentes. Les filaments de myosine et d'actine assurent la contraction. La troponine et la tropomyosine régulent cette contraction (Aliev et Tikhonov, 2004; Craig et Padrón, 2004).

L'observation de la section transversale du sarcomère (figure 2) met en évidence une structure très organisée, où le filament épais de myosine et celui mince d'actine dessinent plusieurs structures. Une double structure hexagonale, où un filament de myosine est entouré par six d'actines, où un filament d'actine est aussi entouré par six de myosine. Une structure triangulaire, où trois filaments de myosine entourent un filament d'actine. Ces microstructures sont régulières et ont été observées par microscopie et par diffraction des rayons-X. La distance entre les filaments de myosine et d'actine est d'environ 45-57 nm (Huxley, 1953; Huxley, 1957; Diesbourg et al., 1988; Brewer, 2004).

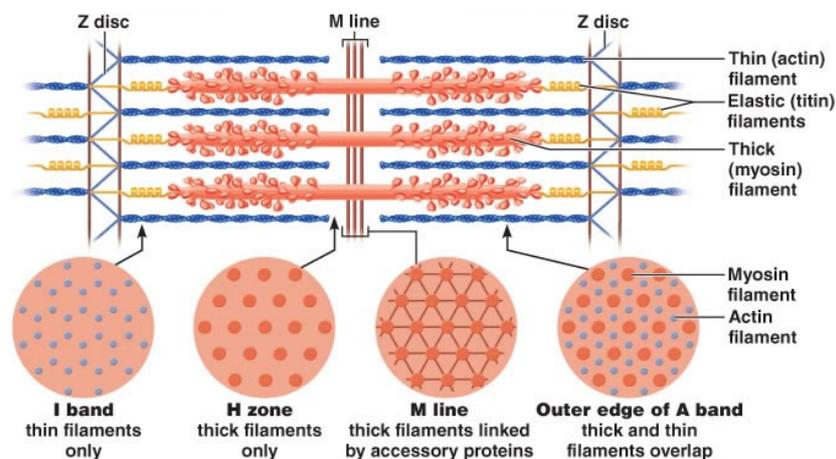


Figure 2 : Images de l'architecture du sarcomère. Vision latérale avec les filaments épais de myosine (rouge) et leurs têtes qui assurent les liaisons avec les filaments d'actine (bleu) ; les filaments de titine (jaune) assurant élasticité et structure au sarcomère ; les disques Z et la ligne M assurant la structure du sarcomère. Vision transversale du sarcomère. Person Education.

L'observation du filament de myosine par microscopie électronique montre que ce polymère est constitué par l'association d'environ 300 molécules de myosine, qu'il a une longueur moyenne de 1,5 μm et un diamètre de 15-26 nm (Huxley, 1963; Aliev et Tikhonov, 2004; Craig et Padrón, 2004). La séparation des myosines de la structure polymérique du filament épais, et des myofibrilles peut être réalisée *in vitro*, en modifiant la force ionique. Dans une solution où la concentration de chlorure de potassium (KCl) est supérieure à 0,3 M, le filament épais se

dissocie en dimères de myosines (Huxley, 1963). Ce processus est réversible. Les monomères de myosines ont la capacité de s'auto-réassembler lorsque la force ionique de la solution est inférieure à 0,2-0,1 M de chlorure de potassium (Kaminer et Bell, 1966; Niederman et Pollard, 1975; Koretz et al., 1982; Niederman et Peters, 1982). Le modèle proposé pour cet auto-assemblage se déroule en plusieurs étapes, qui passent dans un premier temps par l'association des unités dimériques de myosine (Davis et al., 1982), puis par des associations de ces petits assemblages en mini-filaments bipolaires (Reisler et al., 1980; Koretz, 1982), qui peuvent s'unir les uns aux autres en formant le filament épais (Kaminer et Bell, 1966). Un autre modèle proposé par Katsura est l'assemblage des unités dimériques, les unes aux autres, en formant le filament épais synthétique (Katsura et Noda, 1973).

La structure du filament formé est similaire à celle du filament natif : il a une structure rugueuse aux extrémités et une structure lisse au centre. La longueur et le diamètre du filament formé dépendent de la force ionique de la solution ainsi que du pH : plus la dilution est importante (de 0,3 à 0,1 M de chlorure de potassium), plus importantes seront les longueurs et le diamètre des filaments synthétisés. À pH 6 les filaments sont plus longs et épais qu'à pH 8 (Kaminer et Bell, 1966). La figure 3 présente les étapes d'auto-réassemblage de la myosine en fonction de la concentration de chlorure de potassium de la solution.

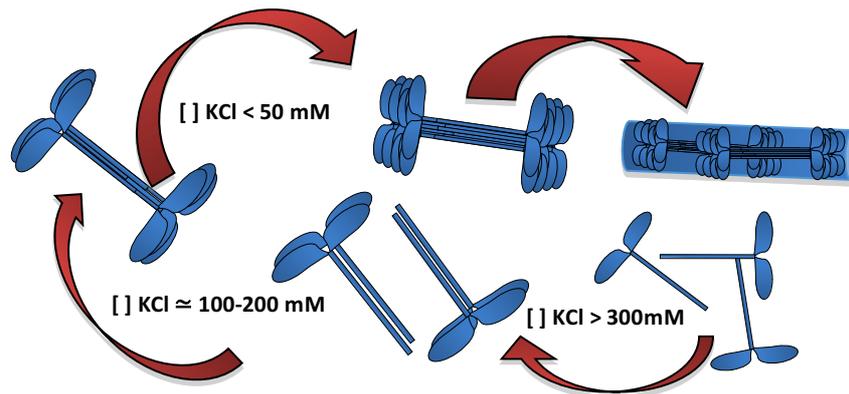


Figure 3 : Schéma d'auto-réassemblage de monomères de myosine en fonction de la force ionique de la solution (concentration de chlorure de potassium). La myosine reste sous forme monomérique quand la concentration de chlorure de potassium est supérieure à 300 mM ; en diluant la solution, les queues de myosine tendent à s'auto-réassembler en filaments de tailles plus importantes ; à la concentration de 100-200 mM, la myosine forme des petits filaments, *minifilaments*, de dizaines de molécules, qui s'agrandissent par l'ajout de monomères, lorsque la force ionique de la solution diminue ; à très faible concentration de chlorure de potassium (≈ 50 mM), des filaments synthétiques de myosine d'une centaine de molécules sont formés : les queues forment une zone centrale, alors que les têtes de la myosine sortent du filament.

Myosine

Dans le muscle squelettique, l'unité formant le filament épais est la myosine de type II. Sa structure se présente sous forme d'un hétérohexamère. Elle est constituée de deux chaînes lourdes (*myosin heavy chains*, MHC) et de quatre chaînes légères (*myosin light chains*, MLC, de masse molaire comprise entre 15 et 22 kDa) (Weeds et Lowey, 1971; Rayment et al., 1993). La structure des chaînes lourdes est assez complexe. Une chaîne lourde est composée par 1939 résidus d'acides aminés (masse molaire d'environ 223 kDa (Maita et al., 1991b)), comprenant une tête globulaire sur son extrémité N-terminale (construite par 837 résidus d'acides aminés (Maita et al., 1987; Maita et al., 1991a) et une queue très longue au niveau de son extrémité C-terminale. La figure 4 présente la structure entière de la myosine type II et le détail de la tête.

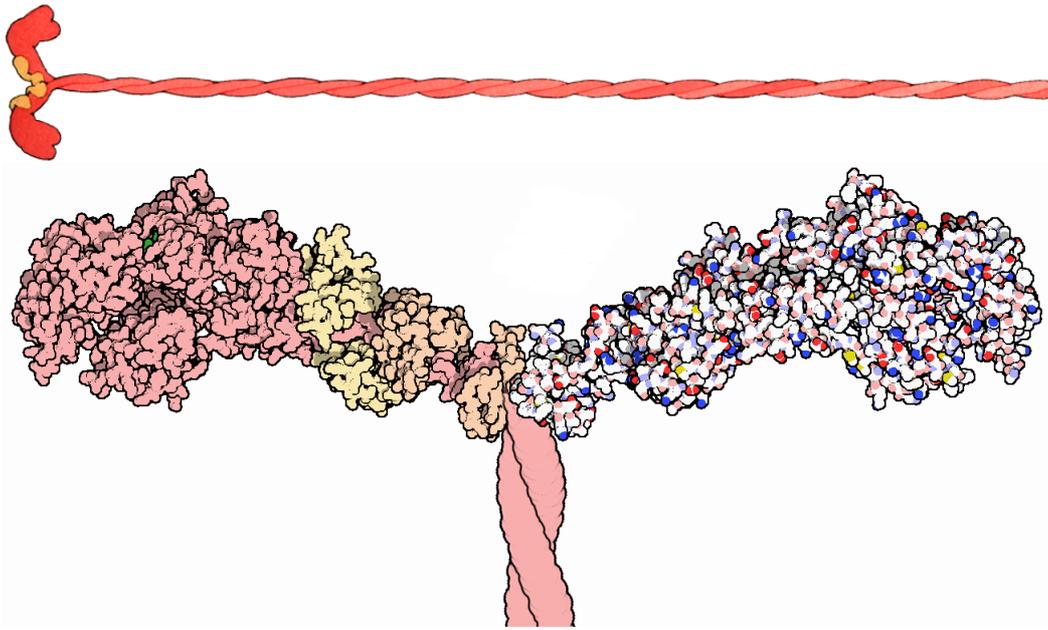


Figure 4 : Structure de la myosine. En haut, la myosine représentée dans sa totalité sous forme d'hétérohexamère avec en jaune, les 4 chaînes légères et en rouge, les deux chaînes lourdes, composées par deux têtes (moteur moléculaire) et deux longues queues. En bas, le détail de la tête de la myosine mettant en évidence les liaisons avec les deux chaînes légères, présentées en jaune et orange (Protein Data Bank).

Ces deux macrostructures sont connectées entre elles au niveau d'une région du dimère dite "le cou", où les chaînes légères sont localisées et associées à travers des liaisons électrostatiques (Dreizen et al., 1967; Weeds et Lowey, 1971). Les deux queues sont longues d'environ 150 nm et s'associent en adoptant une structure de type double α -hélices (Lowey et al., 1969; McLachlan et Karn, 1982). Cette séquence présente une succession de vingt-huit résidus d'acides aminés, dont la majorité sont apolaires (leucine, valine et alanine surtout). Les résidus chargés sont localisés vers l'extérieur de la structure en α -hélice de la queue et à pH 6,5 les charges négatives sont élevées (McLachlan et Karn, 1982; Offer et Knight, 1988b).

La tête de la myosine a une structure globulaire (19 nm de longueur, 5 nm de largeur). Elle est constituée par 3 fragments. Celui de 25 kDa localisé à l'extrémité N-terminale possède le site de liaison de l'ATP. Celui du milieu, de 50 kDa, le plus grand, constitue le domaine moteur, le site de liaison de l'actine. Le fragment de 20 kDa, le plus petit, est localisé vers l'extrémité C-terminale de la tête, dans la région du "cou", reliant la tête à la queue. Il a une structure en α -hélice et il est associé aux deux chaînes lourdes. Il correspond au domaine régulateur de la myosine (Margossian et Lowey, 1973; Winkelmann et al., 1991; Rayment et Holden, 1993; Rayment et Holden, 1994; Dominguez et al., 1998). La polarité de la tête est pH dépendante et, à pH 6,5, la charge est nulle (Offer et Knight, 1988b). Dans la séquence primaire du monomère, 9 résidus de tryptophanes sont présents, dont 7 localisés dans la tête (positions 114, 132, 441, 511, 596, 830, 832) et 2 dans la queue (positions 1374, 1459) (Hayashida et al., 1991; Komine et al., 1991; Maita et al., 1991a; Maita et al., 1991b).

La trypsine est capable de couper le dimère de myosine au milieu de la queue en 2 parties : la queue, appelée méromyosine légère (*low meromyosin*, LMM) longue d'environ 90 nm, et la tête, dite méromyosine lourde (*heavy meromyosin*, HMM) longue d'environ 66 nm, qui est constituée par un morceau de queue, du cou et des deux têtes globulaires. La papaïne, par contre, coupe la myosine au niveau de la jonction tête-queue en libérant les deux têtes, dites sous-unités

S1, longue d'environ 19 nm, et la queue, longue de 156 nm. Le sous-fragment S2, fragment de queue localisé entre les deux sites de clivage, est produit lors de la digestion de la myosine par les deux enzymes (Lowey et al., 1969; Offer et Knight, 1996; Craig et Padrón, 2004). La figure 5 présente les fragments de la myosine qui sont obtenus après la digestion enzymatique.

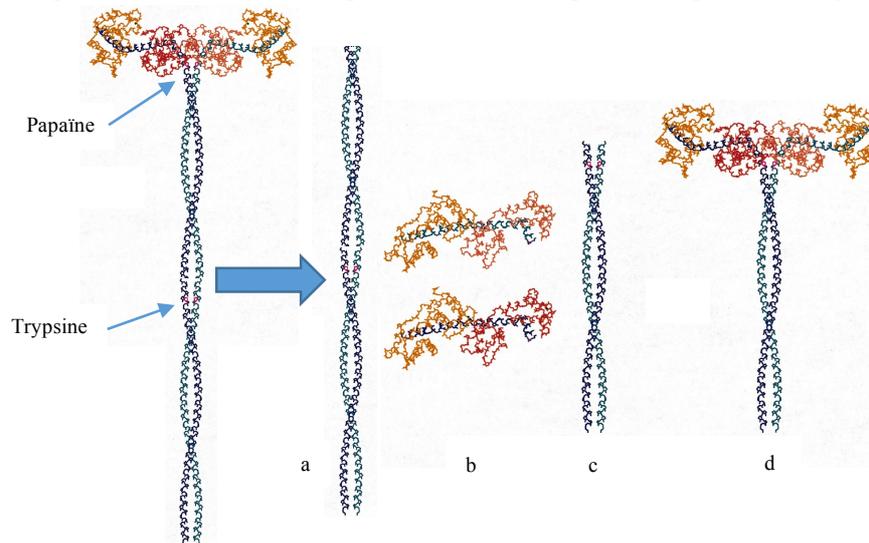


Figure 5 : Fragments obtenus suite à la digestion enzymatique de la myosine. Ces fragments sont produits par action enzymatique de la papaïne et de la trypsine. La papaïne coupe la myosine au niveau de la jonction entre la tête et la queue, en libérant la queue (a) et les deux têtes (sous-fragments S1) (b). La trypsine coupe la myosine au milieu de la queue, en produisant les deux fragments de méromyosine : la méromyosine légère (c) et lourde (d) ; modifié de Offer 1996 (Offer et Knight, 1996).

Hémoglobine

L'hémoglobine est une protéine globulaire composée par quatre sous-unités : deux sous-unités dites α (α_1 et α_2) et deux autres dites β (β_1 et β_2). Chacune des sous-unités α est composée de 141 résidus d'acides aminés et de sept hélices- α (de A à G), alors que les sous-unités β sont composées de 146 résidus et de huit hélices- α (notées de A à H). La masse molaire du tétramère est de 64 kDa et ses dimensions sont de $6,4 \times 5,5 \times 5,0 \text{ nm}^3$ (Muirhead et Greer, 1970; Fermi, 1975; Ward et al., 1975; TenEyck et Arnone, 1976; Baldwin et Chothia, 1979).

Les quatre sous-unités α et β sont associées les unes aux autres à travers des interactions hydrophobes entre les sous-unités α et β , mais aussi par des interactions dipôle-dipôle entre les chaînes α_1 - α_2 et β_1 - β_2 . La stabilité de la structure est assurée surtout par les interactions apolaires entre les structures α_1 et β_1 , où trente-quatre résidus d'acides aminés sont impliqués (hélices B, G et H). L'interface $\alpha_1\beta_2$ est, par contre stabilisée par des interactions de type Van der Waals, c'est-à-dire des interactions électrostatiques (ou force de Keesom), des interactions dipôle permanent-dipôle induit (ou force de Debye) et des interactions dipôle induit-dipôle induit (ou force de London) entre dix-neuf résidus d'acides aminés des hélices C, F et G. Le tétramère d'hémoglobine se dissocie dans ses dimères $\alpha\beta$ (Antonini et Chiancone, 1977).

À l'intérieur de chaque chaîne est présente une cavité hydrophobe qui contient un hème : complexe protoporphyrine IX-fer, le site de fixation de ligands, comme l'oxygène qui donne la couleur rouge à l'hémoglobine. La stabilisation de l'hème est faite par plusieurs résidus d'acides aminés, appartenant aux hélices B, G et H, et à des résidus des hélices E et F. Ce complexe a une structure qui est souvent représentée comme un disque de diamètre de 0,85 nm et 0,47 nm d'épaisseur. Dans l'hémoglobine, les hèmes de deux sous-unités $\alpha\beta$ sont parallèles l'un à l'autre et distants d'environ 0,25 nm, alors que dans les sous-unités $\alpha\alpha$ et $\beta\beta$, les hèmes sont

perpendiculaires l'un à l'autre et la distance entre eux est d'environ 0,33 nm et 0,40 nm. La structure de la porphyrine IX est formée de quatre cycles de type pyrroles qui sont connectés entre eux, ce qui permet de former un anneau au centre duquel, l'atome de fer est ancré au travers de quatre liaisons de coordinence. Il s'agit du site actif de la protéine. L'atome de fer possède deux autres liaisons de coordinence. La cinquième liaison est assurée par l'azote d'un résidu d'histidine de la globine (F₈) dit "proximal". Le sixième site de coordination, du côté du site dit "distal" est "libre" permettant au fer de se lier à un ligand (oxygène, par exemple), en créant une interaction avec l'histidine (E₇) dite "distal".

Le fer peut lier plusieurs types de ligands et modifier son état d'oxydation. Le fer libre de ligand (désoxy-hémoglobine) est un fer II (Fe²⁺, fer "réduit"). La liaison avec l'oxygène (oxy-hémoglobine, oxy-Hb) crée une délocalisation des électrons qui délocalise la charge positive sur le fer III (Fe³⁺O₂⁻) dans le complexe FeO₂ (Pin et al., 1982; Bianconi et al., 1985; Hoy et al., 1986). Cette structure est réversible. Une forme d'hémoglobine où le fer est "oxydé" (Fe³⁺) de façon irréversible existe aussi : la met-hémoglobine (met-Hb). Dans ce cas, le ligand fixé au fer peut être : H₂O, OH⁻, N₃⁻. La liaison du fer avec l'oxygène change la couleur du pigment du rouge pourpre (désoxy-) à rouge brillant (oxy-) ou à brun (met-). (Fox, 1966; Ladikos et Wedzicha, 1988).

Collagène

Le collagène est une glycoprotéine localisée à l'extérieur de la cellule, le principal composant du tissu conjonctif constituant la matrice extracellulaire du muscle. Il présente plusieurs fonctions, biochimiques et physiologiques, en assurant les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, mais aussi structurales et mécaniques, en protégeant les tissus (Gelse et al., 2003). Vingt-huit types de collagène ont été identifiés, caractérisés par des tailles, des fonctions et des structures très différentes et localisés dans plusieurs structures de l'organisme (Shoulders et Raines, 2009). La famille de molécules de collagène possède la même structure de base formée par trois filaments polypeptidiques en hélices gauches, lesquelles s'enroulent les unes dans les autres en formant des hélices- α droites, l'unité formant le collagène (environ 300 nm de longueur). Ensuite, l'association de plusieurs de ces unités forme les microfibrilles (environ 5 nm de largeur) de collagène qui vont constituer les fibres de collagène (environ 500 nm de largeur et 1 cm de longueur) (Shoulders et Raines, 2009).

Une des caractéristiques de la structure des collagènes est la présence de structures répétitives dans leur séquence primaire. La plus présente (10,5 % environ) est constituée par une séquence de trois acides aminés (appelée type-II polyproline), dont le troisième acide aminé est la glycine, alors que les deux autres peuvent être un des vingt acides aminés avec 28 % et 38 % de probabilité de trouver la proline et l'hydroxyproline (Shoulders et Raines, 2009). Cette séquence joue un rôle important dans la stabilité de la triple hélice : la glycine est localisée au centre et permet de réaliser une structure plus serrée et compacte, alors que l'-hydroxyproline forme des liaisons intramoléculaires (Gelse et al., 2003). La structure du collagène est stabilisée par la présence de plusieurs types de liaisons croisées intermoléculaires (Gallop et al., 1972). Un exemple est la pyridinoline, liaison croisée formée grâce aux chaînes latérales de trois résidus d'acides aminés et qui peut être utilisée comme marqueur biochimique pour suivre la dégradation du collagène (Fujimoto et al., 1977; Fujimoto et al., 1978; Robins et al., 1996). En

effet, il est possible d'observer ce groupement par spectroscopie de fluorescence dans le visible (excitation à 325 nm, émission à 400 nm) (Fujimoto et al., 1977; Robins et al., 1996).

Partie 2 : Cuisson et impact de la température sur les protéines du muscle

La cuisson, est la plus ancienne méthode de transformation des aliments utilisant la chaleur. Il faut remonter au Paléolithique, à l'époque de l'*Homo erectus*, pour retrouver les toutes premières preuves de l'utilisation du feu pour cuisiner les aliments (Berna et al., 2012).

Aujourd'hui, dans le domaine des technologies alimentaires, la cuisson est définie comme une opération unitaire capable d'améliorer le statut hygiénique, de modifier les caractéristiques sensorielles de la viande, comme la texture, la couleur, l'aspect, le goût et l'arôme, grâce au déclenchement d'une série de réactions chimiques, comme par exemple la réaction de Maillard entre les composés azotés minoritaires de la viande et les sucres réducteurs (ribose) (Maillard, 1912; Mottram, 1985; Bordas et al., 2004; Aliani et Farmer, 2005; Cerny et Briffod, 2007), ou comme l'oxydation de lipides (Frankel, 1980; Ladikos et Lougovois, 1990) et de protéines (Ganhão et al., 2010; Estévez, 2011) favorisées par la présence de catalyseurs métalliques, les minéraux. Elle est aussi associée à des modifications physicochimiques des constituants de la viande avec par exemple la dénaturation des trois familles de protéines du muscle (myofibrillaires, sarcoplasmiques et du tissu conjonctif). Elle est responsable de la formation de structures gélifiées, ainsi que de la modification de la couleur de la viande (Asghar et al., 1985). Dénaturer une protéine veut dire modifier sa conformation 3D, en altérant les interactions physicochimiques de ses structures secondaires, tertiaires et quaternaires, sans toucher les liaisons peptidiques qui lient les acides aminés entre eux (Tanford, 1968; Dill, 1990).

L'étude du comportement thermique des protéines du muscle a souvent été abordée en étudiant le profil thermique du muscle entier, mais aussi par l'étude de ses fractions protéiques et par l'attribution des pics observés en calorimétrie aux protéines correspondantes. En effet, le thermogramme du muscle entier de lapin montre trois pics de dénaturation, vers 60, 67 et 80 °C (figure 6) (Wright et al., 1977).

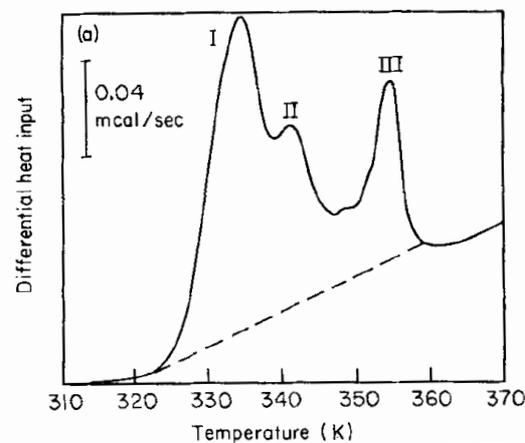


Figure 6 : Thermogramme du muscle de lapin entier après le rigor-mortis; 11,9 mg, DSC II Perkin-Elmer, vitesse de balayage 10 °C·min⁻¹, intervalle de température entre 6-106 °C (Wright et al., 1977).

Le pic du milieu (pic II) a été associé à la famille des protéines sarcoplasmiques et à celles du tissu conjonctif. En effet, malgré leurs structures totalement différentes, leurs caractéristiques thermiques sont similaires. Les protéines sarcoplasmiques, après purification, montrent un double pic avec des maximums vers 63 et 67 °C et un petit pic vers 75 °C (figure 7a) (Wright et al., 1977). Par contre, les protéines du tissu conjonctif ont des températures de dénaturation qui sont tissus spécifiques : celles du pérимыsium ont leur pic de dénaturation vers 65-68 °C, alors que celles de l'épимыsium vers 60 °C (figure 7b) (Rodger et Wilding, 1990).

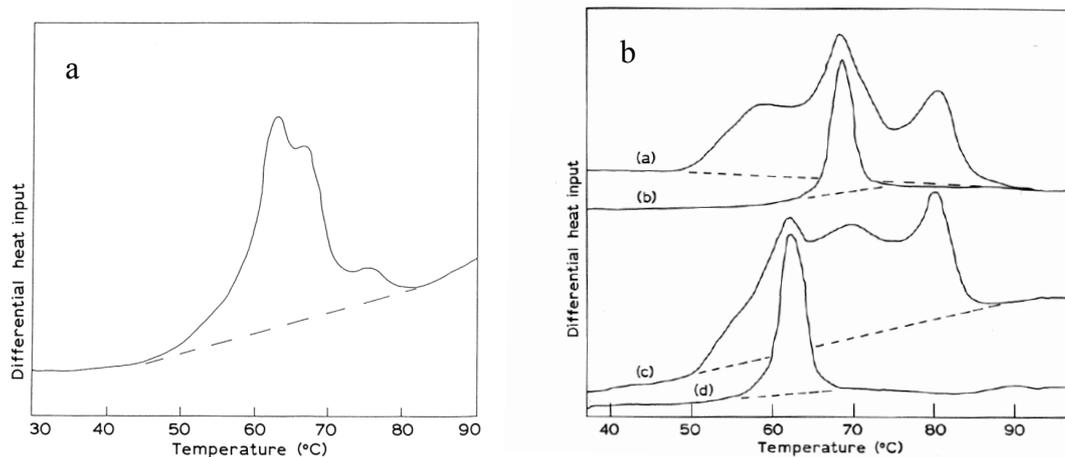


Figure 7 : Thermogrammes des protéines du muscle isolées : à gauche, le thermogramme des protéines sarcoplasmiques du muscle de lapin, DSC II Perkin Elmer, vitesse de balayage $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Wright et al., 1977; Rodger et Wilding, 1990) ; à droite, les thermogrammes des protéines du tissu conjonctif de bœuf : les courbes (a) et (c) correspondent au muscle entier ; la courbe (b) correspond au tissu conjonctif du pérимыsium et la courbe (d) correspond au tissu conjonctif de l'épимыsium (Rodger et Wilding, 1990).

Les deux autres pics observés par calorimétrie à partir du muscle entier sont attribués aux protéines myofibrillaires, la myosine (figure 8a) et l'actine (figure 8b). Wright a isolé, purifié et étudié séparément ces deux protéines, et a ainsi pu associer le premier pic (pic I) à la myosine (température de dénaturation autour de 55 °C) et le dernier (pic III) à l'actine, vers 83 °C (Wright et al., 1977).

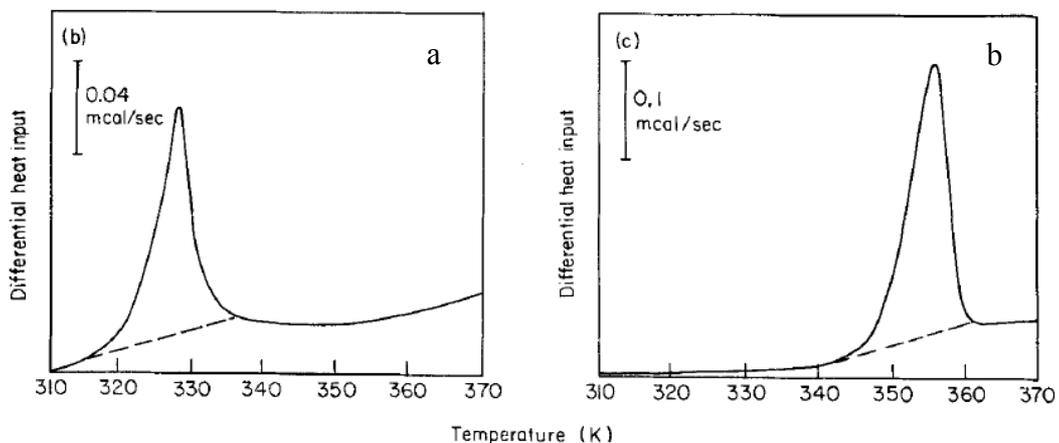


Figure 8 : Thermogrammes des protéines myofibrillaires de lapin isolées : a) courbe de la myosine (1,4 mg) dans 40 mM de chlorure de potassium (KCl) et 3 mM de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), à pH 7 ; b) courbe de l'actine (2,5 mg) dans 1 mM de chlorure de potassium (MgCl_2) et 17 mM de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), pH 7. DSC II Perkin Elmer, vitesse de balayage $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Wright et al., 1977).

Le comportement thermique de la myosine a été étudié plus en détail, en jouant sur des paramètres physicochimiques, comme la force ionique (de 0,05 à 1 μ) et le pH (de 5,5 à 8), en mettant en évidence un deuxième ou troisième pic de dénaturation et des températures de dénaturations légèrement différentes (figure 9).

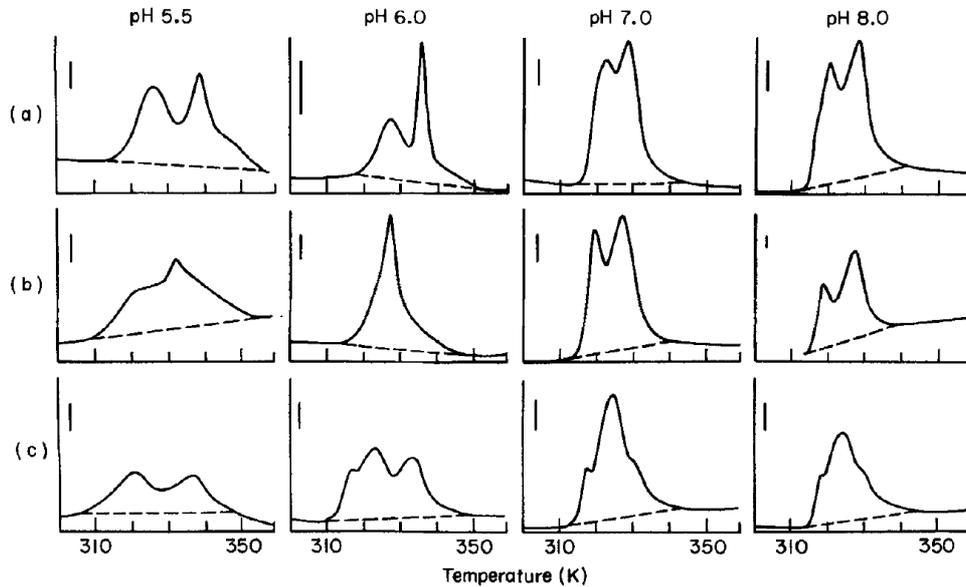


Figure 9 : Thermogrammes de la myosine en fonction du pH (de 5,5 à 8) et de la force ionique (de 0,05 à 1 μ) : (a) 12mM de chlorure de potassium (KCl), 0,5 mM de dithiothréitol (DTT), 50 mM de tampon phosphate (I = 0,05 μ) ; (b) 212 mM de chlorure de potassium, 0,5 mM de DTT, 50 mM de tampon phosphate (I = 0,25 μ) ; (c) 962 mM de chlorure de potassium, 0,5 mM de DTT, 50 mM de tampon phosphate (I = 1 μ). Les barres verticales représentent 0,02 kcal·s⁻¹ (Wright et Wilding, 1984).

Ainsi à pH 6 et à faible force ionique (environ 0,01 μ), la myosine se dénature en deux étapes, vers 55 °C et vers 63 °C, attribuées, respectivement, à la tête (fragment S1, maximum du pic vers 52 °C) et à la queue : pic à 61 °C et une petite bosse vers 65 °C (fragment LMM). À force ionique plus élevée (1 μ), c'est-à-dire là où les conditions de solubilité sont optimales, le processus de dénaturation se déroule en trois étapes, vers 43, 47 et 59 °C : la queue contribue aux pics 1 (fragments LLM et S2) et 3 (fragment S2), respectivement à 43 et 60 °C, alors que la tête contribue au pic du milieu (47 °C). La stabilité de la myosine est influencée aussi par le pH. En effet, à pH basique (pH 8), les températures de dénaturation sont plus faibles de 3 à 6 °C pour le premier pic de dénaturation et de 4 à 12 °C pour le deuxième. La vitesse de balayage influence les températures de dénaturation. Ainsi quand la vitesse est faible (2,5 °C·min⁻¹) les températures observées sont plus faibles de 9 °C (37 et 42 °C respectivement). Elles sont de 42 et 62 °C à la vitesse de 10 °C·min⁻¹ (Wright et Wilding, 1984).

Sur le muscle entier, d'autres expériences de calorimétrie ont été réalisées pour observer l'effet de l'application de différents barèmes de température pendant une certaine durée (figure 10). L'application de la cuisson à plusieurs températures finales avant les mesures par calorimétrie a permis de mettre en évidence la disparition des pics endothermiques correspondant aux différentes familles de protéines. Par rapport à l'échantillon cru (courbe A), l'échantillon cuit à 57 °C (courbe B) a subi la dénaturation de la myosine (pic vers 55 °C) et la réduction en taille du pic du milieu (vers 70 °C), correspondant aux protéines sarcoplasmiques et au tissu conjonctif. L'échantillon cuit à 70 °C (courbe C), montre la disparition du pic endothermique vers 70 °C indiquant la dénaturation du tissu conjonctif et des protéines sarcoplasmiques. Le

chauffage à 81 °C (courbe D) produit un thermogramme plat, signe que toutes les protéines ont été dénaturées (Findlay et Barbut, 1990).

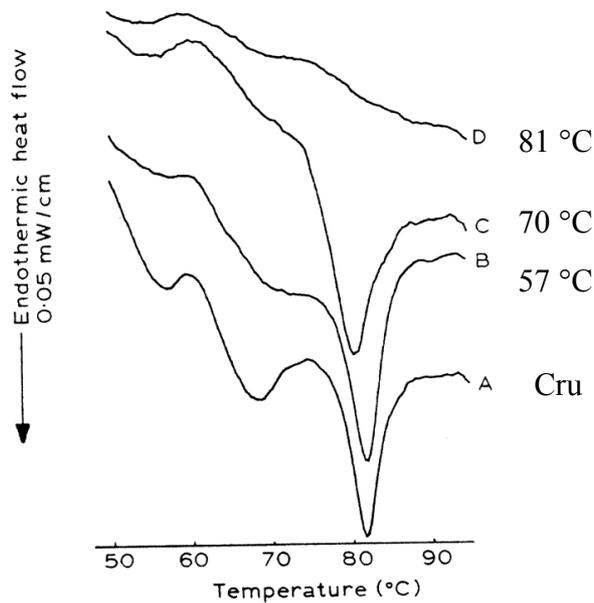


Figure 10 : Thermogrammes montrant l'élimination séquentielle des pics endothermiques après l'application de quatre températures finales pendant 5 minutes sur le muscle *semimembranosus* de bœuf : A, viande crue ; B, C et D cuisson à 57, 70 et 81 °C (Findlay et Barbut, 1990).

Un autre paramètre qui a été pris en considération est la longueur du sarcomère de myofibrilles. La figure 11 montre que le pic de la myosine se déplace de 57 °C à 55,6 °C lorsque la longueur du sarcomère passe de 1,40 à 2,40 μm , et l'énergie de dénaturation augmente de 0,55 à 0,74 $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ (Findlay et Stanley, 1984).

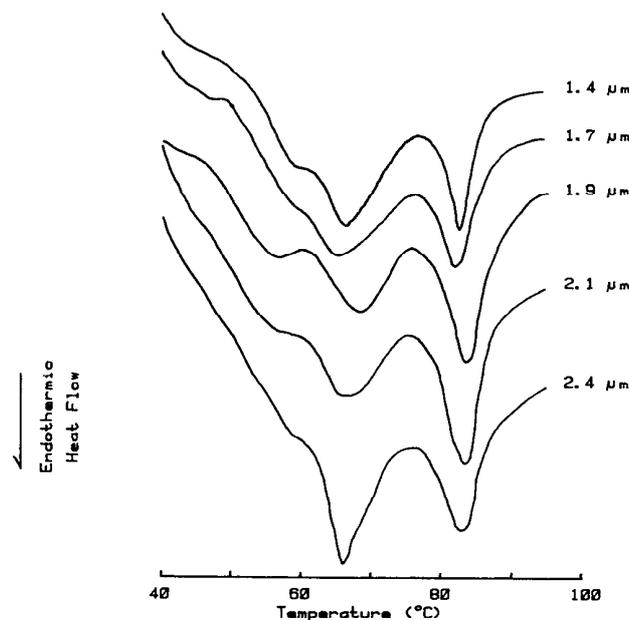


Figure 11 : Thermogrammes du muscle de bœuf *sternomandibularis* en fonction de la longueur du sarcomère. L'expérience a été réalisée sur 12 échantillons de 10 mg chacun, dans un tampon phosphate à pH 5,4 ; la vitesse de chauffage était de 10 °C·min⁻¹ (Findlay et Stanley, 1984).

Pendant la cuisson, le morceau de viande tend à réduire son volume à cause de la dénaturation des différentes protéines qui provoque une agrégation et donc une contraction de l'ensemble protéique et de la perte en eau. Bendall a étudié ces changements par microscopie. L'observation de myofibrilles a montré que le début de la réduction de leur diamètre (contraction transversale) se produit vers 40-42 °C et que le maximum est atteint vers 63 °C (Bendall et Restall, 1983). La contraction longitudinale des fibres est aussi associée à la présence du tissu conjonctif. À partir de 57 °C, la contraction de l'épimysium débute. Elle augmente vers 64-66 °C lorsque le pérимыsium commence à se dénaturer (Rodger et Wilding, 1990; Micklander et al., 2002). La perte en eau, qui en découle, génère de fortes tensions intramusculaires qui contractent les fibres musculaires au niveau transversal (Bendall et Restall, 1983; Offer et Trinick, 1983). Au-delà de 76 °C, les filaments d'actine commencent à se dénaturer (Wright et al., 1977; Palka et Daun, 1999).

Pendant la première étape, l'approche transversale des fibres musculaires fait réduire le diamètre de la cellule d'environ 40-50 %, en faisant sortir environ 48 % d'eau. Pendant la deuxième étape, la fusion puis la dénaturation du collagène réduisent la longueur des fibres d'environ 20 % à 70 °C et de 30 % vers 90 °C. La combinaison des contractions transversales et longitudinales implique une perte de volume d'environ 57 % (Bouton et al., 1976; Bendall et Restall, 1983).

La perte en eau observée pendant la cuisson provoque la réduction de la taille du morceau de viande, mais joue sur d'autres caractéristiques de la viande comme la jutosité et la tendreté (Offer et Trinick, 1983). L'eau est localisée dans plusieurs compartiments du muscle : dans la matrice extracellulaire, dans les espaces intracellulaires, entre les myofibrilles et à l'intérieur des myofibrilles elles-mêmes (Offer et Knight, 1988b). Ces fractions d'eau sont en échange permanent entre elles (Cope, 1969; Hazlewood et al., 1969; Cooke et Wien, 1971; Offer et Knight, 1988b).

La réduction du diamètre des fibres, observée par microscopie, est associée à la myosine. Cette protéine commence à se dénaturer vers 40 °C, en se contractant légèrement (plusieurs nm). À des températures plus élevées, ces protéines forment des agrégats (Dubé et al., 1972; Hegarty et Allen, 1975; Offer et Trinick, 1983; Walker et Trinick, 1986; Walzthöny et al., 1986; Offer et Knight, 1988a). Il a été observé sur une suspension de myosine isolée (pH 6,2) qu'elle devient plus visqueuse à 40 °C sans agrégation. En augmentant la température, vers 45 °C, des agrégats commencent à se former et vers 53 °C l'agrégation des myosines s'accélère (Locker, 1956; Dubé et al., 1972). Dans la matrice complexe, la myosine interagit avec les autres myofibrilles et produit un nouveau type de structure, un gel, capable de garder l'eau dans ses interstices (Hostetler et Landmann, 1968; Offer et Knight, 1988b).

La réduction de la longueur des fibres est aussi associée à des modifications du tissu conjonctif. La modification du collagène par la température a lieu par étape. Dans un premier temps, les liaisons hydrogène intramoléculaires sont rompues ce qui déstabilise les tripes-hélices. La déstabilisation des triple-hélices cause la solubilisation/fusion du collagène. Ensuite, la rupture des liaisons croisées intramoléculaires provoquent la dénaturation du collagène et sa gélatinisation à température plus élevée par rupture des liaisons croisées intermoléculaires (Kopp et al., 1990; Rochdi et al., 2000; Bozec et Odlyha, 2011). Ces trois étapes ont lieu à plusieurs températures : au début du pic de dénaturation, donc vers 55 °C; vers 65 °C, donc au pic de dénaturation ; entre 70-80 °C, étape qui a été associée à une tendreté plus élevée de

l'échantillon de viande (Findlay et al., 1986; Palka et Daun, 1999). À partir de 55 °C la contraction des fibres de collagène démarre. Bouton et Bendall ont observé la contraction longitudinale des fibres musculaires, en associant l'évènement à la contraction du collagène (Bouton et al., 1976; Bendall et Restall, 1983). Lin va plus loin dans l'observation du phénomène en montrant par microscopie et histologie ces changements en fonction du temps de chauffage à la température de 58 °C. L'auteur montre qu'après 1,5 minutes, les fibres de collagène deviennent plus étroites et plus ondulées. Ensuite, les bandes relatives au collagène dénaturé deviennent de plus en plus larges remplaçant les bandes natives. Après 9 minutes, les fibres du collagène ont perdu environ 50 % de leur longueur initiale (Lin et al., 2006).

Par RMN bas champ, Micklander a supposé que lors de la dénaturation de la myosine, autour de 40-42 °C, la population d'eau qui apparaissait était due à la création d'une nouvelle structure à l'intérieur du gel de myofibrilles, puisque le temps de relaxation T_2 est intermédiaire entre les temps assignés à la population de l'eau qui est liée à la structure et à celle libre, fraction qui augmente pendant la cuisson (Micklander et al., 2002). L'auteur a associé la dénaturation du collagène à l'évolution des temps de relaxations déterminés par RMN bas champ. En effet, la réduction des espaces internes à la cellule, suite à la contraction longitudinale des fibres (début vers 57 °C), force l'eau à sortir de la cellule produisant une nouvelle population d'eau. Cette fraction d'eau est expulsée de la cellule et elle tend à relaxer de plus en plus lentement en augmentant la température, vers 66 °C, probablement à cause du début de la gélatinisation du collagène (Micklander et al., 2002).

Partie 3 : Outils d'observation

Échelle Macroscopique

Texture, couleur et analyse sensorielle

Classiquement, en sciences des aliments, les analyses réalisées afin d'étudier un aliment permettent d'observer et de définir ses caractéristiques organoleptiques macroscopiques. Par exemple, dans le cas de la viande, l'une des mesures qui permet de qualifier ses propriétés selon divers paramètres (le pH, le rigor-mortis, la cuisson, l'espèce...) est l'analyse de sa texture (Huff et Parrish, 1993; Szczesniak, 2002; Destefanis et al., 2008).

Des texturomètres peuvent être équipés de sondes spécifiques pour la viande, comme par exemple la lame en "V" de Warner-Bratzler (Warner, 1929; Shackelford et al., 1997; Wheeler et al., 1999; Destefanis et al., 2008) ou un système d'aiguilles multipoints (Dikeman et al., 1972; Bourne, 2002). Elles sont capables de collecter des informations sur la force et l'énergie nécessaires pour couper ou pénétrer l'échantillon ou de fournir des informations sur la cohésion et la résilience de la viande, en mimant la mastication (Palka et Daun, 1999; Veland et Torrissen, 1999; De Huidobro et al., 2005). Ces paramètres rendent compte de la tendreté de la viande et peuvent être étudiés en fonction de son niveau de cuisson. L'étude d'Obuz est un exemple d'utilisation de la sonde de Warner-Bratzler pour suivre la tendreté de la viande en fonction de deux méthodes de cuisson, au grill ou dans un bain d'eau. Cet auteur a observé que la tendreté de la viande évolue de façon différente selon la méthode de cuisson utilisée. En effet, la figure 12 présente des valeurs de force nécessaire pour couper un morceau de viande avec la lame en "V" en fonction du mode de cuisson et du temps de cuisson. Après 15 minutes de cuisson au grill, la force à appliquer pour couper la viande cuite est plus faible que celle à appliquer pour couper la viande cuite à l'eau. La tendreté des viandes devient similaire pour les deux méthodes, après 30 minutes de cuisson.

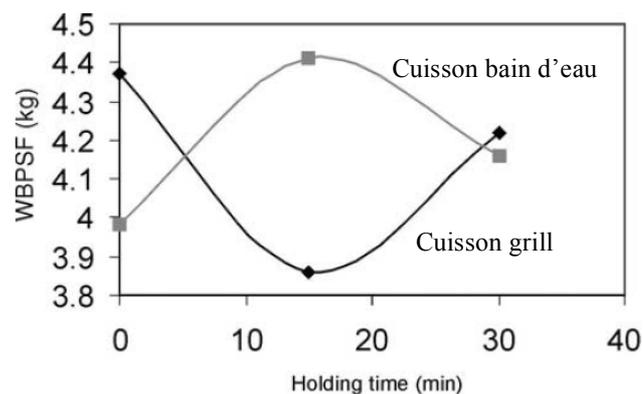


Figure 12 : Force nécessaire pour couper un échantillon de viande en fonction du temps de cuisson, en fonction de la méthode de cuisson (grill, losanges noirs et bain d'eau, carrés gris), à une température cible (57 °C). La force (Warner-Bratzler Peak Shear Force, WBPSF) correspond à la force nécessaire pour couper l'échantillon (Obuz et al., 2003).

Cet effet a été associé à la vitesse de chauffage pour atteindre la température cible (57 °C). La méthode grill est plus rapide par rapport à la méthode cuisson dans l'eau. L'échantillon cuit à

l'eau passe beaucoup plus de temps à des températures inférieures avant d'arriver à la température cible. "Cette lenteur" favorise la dénaturation des myofibrilles et donc la dureté de l'échantillon (Obuz et al., 2003).

Une autre mesure qui permet de suivre les qualités organoleptiques de la viande est l'analyse de sa couleur à l'aide d'un colorimètre, selon le standard CIE Lab* 1971 (CIE, 2004). Dans le cas de la viande, l'évolution de la couleur est suivie grâce à l'indice a^* (rouge) en fonction de la cuisson. Au-delà de 51 °C, l'indice a^* diminue à cause de la dénaturation de la myoglobine, responsable de la couleur rouge de la viande (Hunt et al., 1999).

L'étude d'un produit alimentaire se termine très souvent par une analyse sensorielle. Dans le cas de la viande, plusieurs facteurs influencent son achat par le consommateur. Les plus importants sont : sa fraîcheur très souvent associée à sa couleur rouge, la teneur en gras, son goût et sa texture (Resurreccion, 2003). L'analyse sensorielle peut être faite en utilisant un panel de juges entraînés et "calibrés". L'étude d'Otremba avait pour objectif de comparer les résultats obtenus avec un panel sensoriel entraîné aux descripteurs caractéristiques de la texture de la viande avec ceux obtenus par un panel entraîné mais utilisant des descripteurs non spécifiques à la seule texture. Cinq descripteurs de texture (dont la tendreté et la jutosité) et un olfactif (Otremba et al., 2000) ont été testés sur deux types de muscles et des découpes dans le sens des fibres ou parallèles aux fibres. Les résultats indiquent que pour un certain nombre de paramètres (type de muscles, répétitions) les deux types de panels sont équivalents mais que lorsqu'il s'agit de définir l'orientation des fibres, le panel entraîné spécifiquement aux descripteurs de texture est plus efficace. Boleman (Boleman et al., 1997) a voulu déterminer si des consommateurs non entraînés étaient capables de discriminer plusieurs degrés de tendreté classifiés selon le test de Warner-Bratzler après la cuisson. D'autre part, cet auteur a cherché à savoir s'ils seraient prêts à payer plus cher un steak de meilleure tendreté. Les résultats de cette étude montrent que les consommateurs sont capables de différencier trois degrés de tendreté : bleu, saignant et à point. Ils donnent des notes de jutosité et de coloration rouge plus importantes aux échantillons de steaks saignants. Ils seraient prêts à acheter plus cher des échantillons saignants que des échantillons à point ou bleu. De fait, cette thèse portera sur trois degrés de cuisson.

Échelle Moléculaire

Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une technique qui s'est développée ces dernières années et qui est de plus en plus adaptée et utilisée au niveau industriel dans les domaines du pharmaceutique et de l'agroalimentaire pour le contrôle qualité ou le suivi de procédés (Dufour, 2009). La spectroscopie infrarouge peut être réalisée dans deux intervalles de longueur d'onde : le proche infrarouge (ou PIR) entre 700 et 2500 nm et le moyen infrarouge (ou MIR) entre 4000 et 400 cm^{-1} . L'énergie des rayonnements du domaine infrarouge utilisé permet aux électrons de passer au(x) niveau(x) vibrationnel(s) supérieur(s) en faisant vibrer les molécules entières ou un groupement chimique particulier, selon la fréquence d'excitation envoyée. Un même groupement peut vibrer de plusieurs façons différentes (étirement, cisaillement ou torsion...), et donc absorber à plusieurs fréquences.

Comme le montre la figure 13 la différence entre le MIR et le PIR est le nombre de niveaux vibrationnels que l'électron peut occuper. Dans le domaine du moyen infrarouge, les électrons

ne peuvent passer qu'un seul niveau énergétique (transition fondamentale), alors que dans le domaine du proche infrarouge (le plus proche du visible), plusieurs niveaux énergétiques peuvent être atteints (Siesler, 2007).

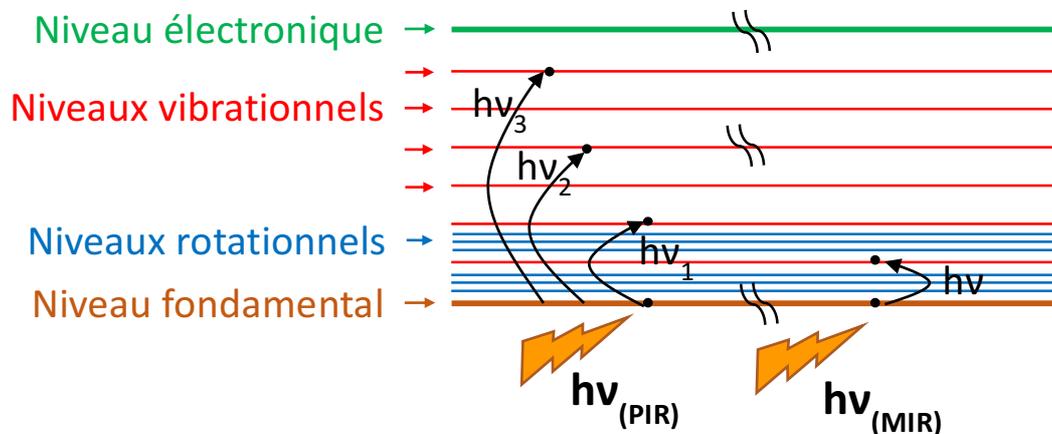


Figure 13 : Schéma de Jablonski adapté aux spectroscopies du proche (PIR) et moyen (MIR) infrarouge. Dans la partie droite du schéma, l'électron (petit point noir), en absorbant de l'énergie dans le spectre du moyen infrarouge (MIR), peut s'exciter jusqu'au premier niveau rotationnel, alors que dans le cas du proche infrarouge (PIR) (partie gauche du schéma), l'électron peut s'exciter jusqu'au deuxième, troisième, quatrième, ... niveaux vibrationnels, en dépassant le premier.

Viande

La spectroscopie PIR est une technique de plus en plus utilisée pour évaluer les attributs qualitatifs de la viande et des produits carnés (Damez et Clerjon, 2008). Des mesures complémentaires réalisées dans le visible sont très souvent associées aux mesures faites dans le PIR pour améliorer la robustesse du modèle prédictif utilisé. De plus, très souvent, dans ces études, des analyses statistiques multivariées mettent en relation les résultats obtenus par spectroscopie aux données des mesures traditionnelles, pour prédire une ou plusieurs caractéristiques de la viande. Cette technique permet par exemple d'évaluer la composition chimique de la viande, en particulier la teneur en matières grasses, en protéines et en eau (Prieto et al., 2011; Riovanto et al., 2012), et de classer la viande selon différents critères de qualité comme par exemple sa tendreté, son pH, sa couleur, sa capacité à retenir l'eau (Prieto et al., 2009).

L'une des caractéristiques suivies par spectroscopie dans le visible et le proche infrarouge est le changement de la couleur de la viande. Il est connu que lors de l'application d'un traitement thermique sur la viande, la myoglobine oxygénée (oxy-Mb) se dénature et se transforme en met-myoglobine (met-Mb). Dans la région du visible (figure 14), cette évolution peut être suivie en observant la diminution de l'intensité des bandes situées aux longueurs d'onde qui correspondent à l'oxy-Mb (445 et 560 nm) et l'augmentation de celles qui correspondent à la met-Mb (475, 520, 585 nm) (Liu et al., 2000; García-Rey et al., 2005; De Marchi et al., 2013). En associant à ces observations dans le visible, des mesures dans le proche infrarouge, Liu montre que ces changements de ligands de la myoglobine sont corrélés à des changements observables au niveau des bandes attribuées aux groupements C-H de l'hème (1655, 1195, and 1360 nm) et à celle des O-H de l'eau (1455 nm) (Liu et al., 2000).

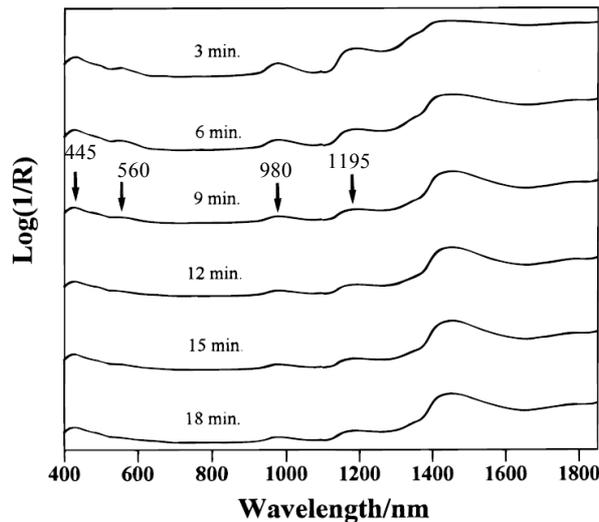


Figure 14 : Spectres visible-proche infrarouge de morceaux de blanc de poulet après cuisson à 150 °C, en fonction du temps de cuisson, de 3 à 18 minutes. L'indication 1/R signifie l'inverse de la réflectance (Liu et al., 2000).

La spectroscopie PIR a aussi été utilisée pour prédire la texture et la tendreté de la viande. Byrne et Park ont corrélé les données de l'analyse sensorielle ainsi que les données de l'analyse de la texture obtenues en utilisant la méthode de Warner-Bratzler, aux spectres d'infrarouge dans deux domaines de longueurs d'ondes différents : 750-1100 nm et 1100-1350 nm, respectivement. Dans ces régions spectrales, les bandes observées sont attribuées principalement à l'eau et aux protéines, comme le montre la figure 15 (Byrne et al., 1998; Park et al., 1998). Cependant, dans une étude plus récente, Prieto met en avant les limites de cette technique dans la prédiction des caractéristiques sensorielles qu'il associe principalement à l'hétérogénéité de la viande et à l'incertitude des juges (Prieto et al., 2009).

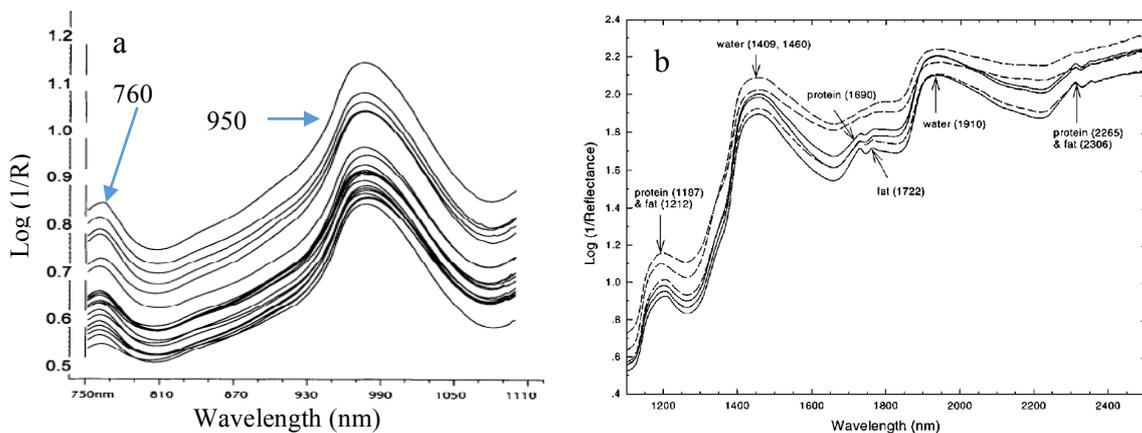


Figure 15 : (a) Spectres de réflectance obtenus dans le proche infrarouge (intervalle 750-1100 nm) sur des morceaux de bœuf ; les longueurs d'onde indiquées sont associées à la texture étudiée par analyse sensorielle et par la méthode de Warner-Bratzler (Byrne et al., 1998). (b) Spectres de réflectance obtenus dans le proche infrarouge (intervalle 1100-2500 nm) sur des morceaux de bœuf présentant différentes valeurs de tendreté mesurées avec la méthode de Warner-Bratzler (Park et al., 1998).

Dans le moyen infrarouge (MIR), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est aussi de plus en plus utilisée pour le contrôle qualité et pour analyser les échantillons de viande. Par exemple, comme le montre la figure 16, il est possible à partir de préparations à base de viande, en observant certaines fréquences typiques des groupements CH et CO (2923 et 1744 cm^{-1} , respectivement) des lipides et des fréquences de la bande amide II des protéines

(1497 et 1548 cm^{-1}), de quantifier leur teneur en lipides et protéines, par comparaison avec les spectres de standards (Dion et al., 1994).

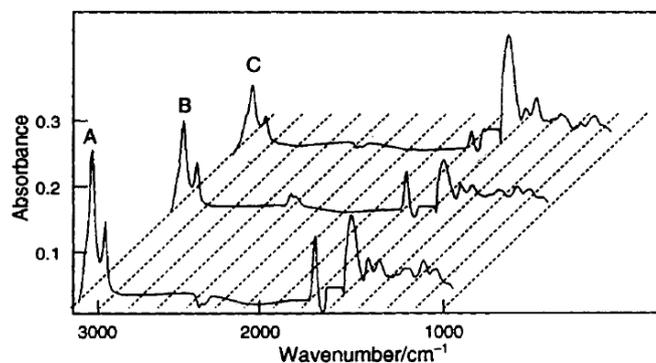


Figure 16 : Spectres FTIR d'échantillons standards de viandes contenant différentes quantités de lipides et de protéines : A : 2,632 % de lipides et 2,264 % de protéines ; B : 1,650 % de lipides et 1,453 % de protéines ; C : 1,384 % lipides et 2,401 % protéines (Dion et al., 1994).

Cet outil peut notamment servir au niveau de la répression des fraudes. Par exemple, il permet de découvrir des produits carnés frauduleux. Ainsi, Al-Jowder a comparé les spectres de viande de bœuf pure avec ceux de viande mélangées à 20 % (m/m), par l'ajout de plusieurs types d'abats (cœur, rognon, foie) moins chers (Al-Jowder et al., 2002). Comme le montre la figure 17, les spectres de la viande de bœuf pure et des produits adultérés sont très semblables.

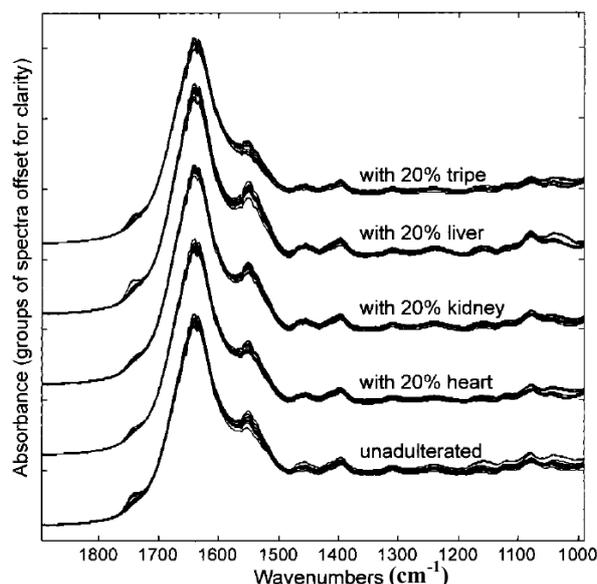


Figure 17 : Spectres infrarouge des échantillons de viande de bœuf pure et adultérées (Al-Jowder et al., 2002).

Pour aboutir dans leur analyse de la fraude, les auteurs de cette étude ont utilisé des outils statistiques d'analyse des spectres tels que l'analyse par composantes principales ou la régression des moindres carrés partiels en se focalisant sur certaines bandes, correspondant aux lipides (1725 cm^{-1}), aux protéines (1650 et 1550 cm^{-1}) et à l'eau (1650 cm^{-1}) (Al-Jowder et al., 2002).

Une autre des applications du MIR a été de suivre l'évolution de la viande en fonction de la température, ou du barème de température, en observant (entre autre) la région de la bande

amide I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) (Bertram et al., 2006a; Wu et al., 2007). En effet, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet l'observation au niveau moléculaire de la structure secondaire des protéines (Dong et Caughey, 1994). Des changements structuraux peuvent être observés dans la région de la bande amide I qui correspond aux vibrations des groupements C=O du squelette polypeptidique. Les positions des bandes des structures natives des protéines (feuillet- β , coudes et hélices- α) sont très bien connues (tableau 2).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif du nombre d'ondes relatif aux différents types de structure secondaire des protéines (Dong et Caughey, 1994).

Types de structure secondaire	Positions (cm^{-1})
Hélices- α	1656
Feuillets- β	1625 et 1640 natifs / 1691 agrégés
Coudes	1658-1675
Désorganisées	1640

Bertram a étudié l'impact de la température sur les protéines de la viande de porc et a identifié une température critique vers $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'analyse des dérivées secondes des spectres enregistrés en fonction de la température dans la région de la bande amide I (figure 18) a permis d'observer les changements des structures des protéines, avec l'apparition de nouvelles bandes caractérisant des structures de type feuillets- β agrégés ou structures désorganisées (Bertram et al., 2006a; Wu et al., 2007).

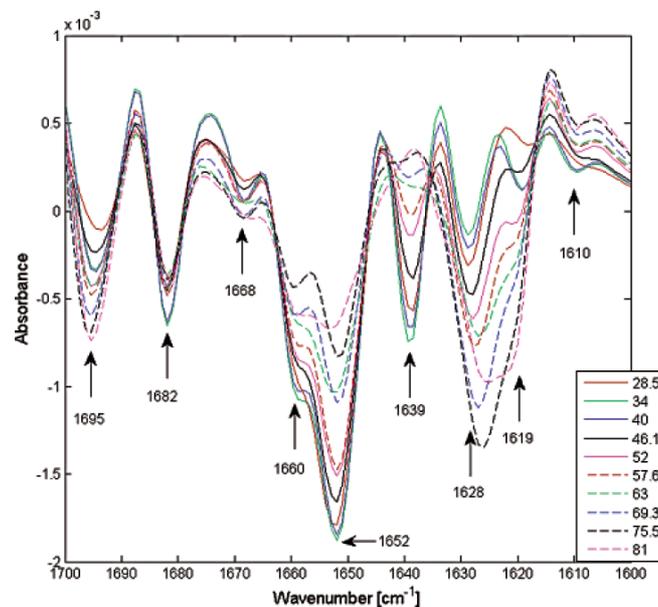


Figure 18 : Dérivées secondes des spectres infrarouge de la viande pour 10 températures différentes (Bertram et al., 2006a).

Myosine

L'évolution de la structure de la myosine sous l'effet de la température (analysée par FTIR dans la figure 19) a été mise en relation avec sa capacité à former des gels (Wang et Smith, 1994). La myosine contient deux têtes globulaires (majoritairement structurée en hélices), et une longue queue constituée de deux chaînes imbriquées en hélices. L'étude par spectroscopie infrarouge de la myosine native permet de détecter plusieurs bandes dans la région de la bande amide I, qui sont relatives aux hélices- α (1651 cm^{-1}), aux feuillets- β (1636 et 1676 cm^{-1}) et aux

coudes (1669 cm^{-1}) de la protéine. Un palier de température à 45 °C pendant 30 minutes n'a pas d'effet très important sur la structure secondaire de la protéine. À 55 °C , les bandes des hélices- α et des feuillets- β diminuent d'intensité, en faveur de structures désorganisées et de l'agrégation intermoléculaire des feuillets- β . À cette température, les valeurs des modules G' (élastique) et G'' (visqueux) obtenus par rhéologie dynamique augmentent et G' devient supérieur à G'' à partir de 55 °C , indiquant la prise en gel du système. La baisse d'intensité des structures natives augmente lorsque la température atteint $65\text{--}75\text{ °C}$. Les gels obtenus à ces plus hautes températures ont des caractéristiques rhéologiques différentes de ceux observés à 55 °C : plus visqueux à 65 et 75 °C qu'à 55 °C (élastiques).

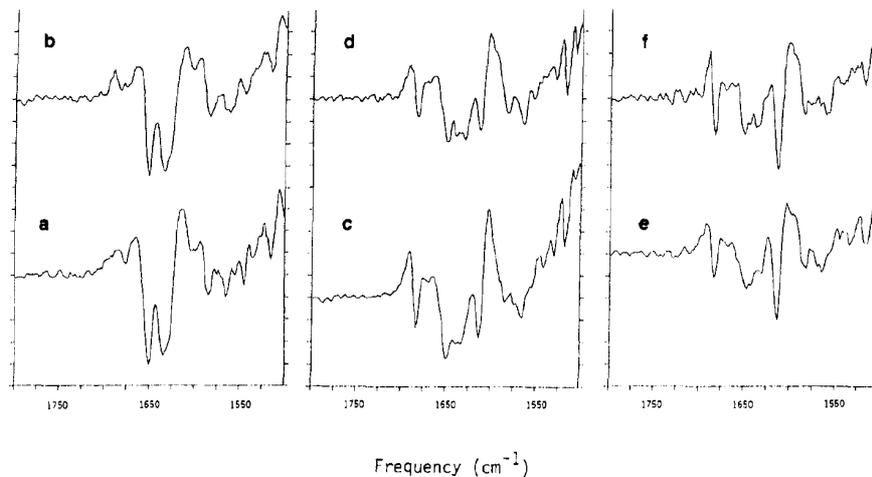


Figure 19 : Effet d'un chauffage isotherme de 30 minutes sur les spectres infrarouge de la myosine : a) native ; b) 45 °C ; c et d) 55 °C ; e) 65 °C ; f) 75 °C (Wang et Smith, 1994).

Hémoglobine

Grâce à l'assez bonne transparence des tissus biologiques à la lumière dans la région de 700 à 1100 nm , la spectroscopie de proche infrarouge est utilisée pour suivre les changements de concentrations de l'hémoglobine humaine, puisque les coefficients d'absorption de ses différentes formes (oxy, désoxy, carboxy et met) dans cette région (et dans le visible) sont très bien connus (Antonini et Brunori, 1971; Zijlstra et Buursma, 1997). Des instruments adaptés aux mesures cliniques avec des fibres optiques ont été développés pour mesurer l'oxygénation du cerveau de fœtus, de nouveaux nés ou d'adultes pendant une stimulation cérébrale, ou pour suivre l'oxygénation des muscles, avant, pendant ou après l'effort (Sfarenì et al., 1997) L'effet de la température (4 à 50 °C) sur les spectres dans le visible et le proche infrarouge des différentes formes d'hémoglobine a été décrit dans la littérature et montre une légère augmentation des intensités des deux bandes d'absorption majoritaires du proche infrarouge (vers 970 et 1180 nm) et un déplacement vers les grandes longueurs d'onde entre 20 et 40 °C (San Biagio et al., 1977; Sfarenì et al., 1997).

La structure secondaire de l'hémoglobine a été très étudiée dans le moyen infrarouge. L'analyse de la bande amide I de la protéine présente une bande très intense vers 1652 cm^{-1} et deux, de plus faibles intensités, vers 1630 et 1678 cm^{-1} qui sont respectivement attribuées aux hélices- α (qui représentent environ $75\text{--}85\%$ de la structure secondaire), aux feuillets- β et aux coudes (Levitt et Greer, 1977; Dong et Caughey, 1994). La spectroscopie infrarouge a été spécialement

utilisée pour observer les effets produits par la fixation de plusieurs types de ligands (CO, O₂, NO,...) sur la structure de la protéine (Dong et Caughey, 1994). La dénaturation thermique de l'hémoglobine a aussi été étudiée par spectroscopie infrarouge (Yan et al., 2004). L'analyse des spectres de la bande amide I enregistrés à différentes températures entre 30 et 70 °C montre que la protéine se dénature en plusieurs étapes, avec une perte des structures secondaires en hélices pour une agrégation en feuillets-β.

Spectroscopie de fluorescence

En spectroscopie de fluorescence, les espèces sont tout d'abord excitées de leur état fondamental vers l'un des nombreux niveaux vibrationnels des niveaux électroniques, par absorption d'un photon dans l'ultraviolet (UV) ou dans le visible. Les collisions avec les autres molécules induisent une perte d'énergie vibrationnelle pour la molécule excitée, jusqu'à atteindre le niveau vibrationnel le plus bas de l'état électronique excité. Ainsi comme le montre la figure 20, après l'excitation (de S₀ à S₁ ou S₂) les électrons perdent une petite partie de leur énergie, en descendant au niveau vibrationnel inférieur et, l'énergie restante est dissipée sous forme d'un rayonnement de fluorescence. De manière typique, les différentes fréquences de lumière fluorescente émise par l'échantillon sont mesurées avec une lumière excitée gardée à longueur d'onde constante. Cela est appelé "spectre d'émission". Un spectre d'émission est mesuré par l'enregistrement de la somme de la lumière de fluorescence émise à toutes les fréquences comme fonction de la fréquence d'une lumière incidente monochromatique.

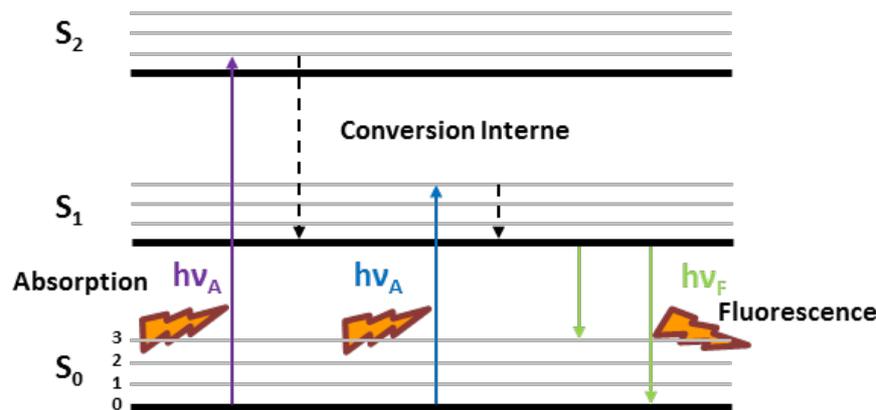


Figure 20 : Diagramme de Jablonski expliquant le phénomène de la fluorescence. Les niveaux électroniques sont indiqués avec des traits noirs foncés : S₀ (état fondamental) S₁ (premier niveau excité) et S₂ (deuxième niveau excité). Les niveaux vibrationnels (0, 1, 2 et 3) sont indiqués avec des traits gris. Les conversions internes et les émissions sont indiquées avec des flèches noires et colorées, respectivement (Lakowicz, 2006).

Viande

La spectroscopie de fluorescence mesure l'intensité de fluorescence émise par un échantillon, après une excitation dans les régions de l'ultraviolet ou du visible (UV, VIS). Les sondes fluorescentes intrinsèques du muscle les plus importantes et les plus observées sont les résidus d'acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine), les pigments comme la myoglobine et l'hémoglobine et des chromophores dérivant des lipides et de leur oxydation (Varley, 1994; Patra et Barakat, 2012). Pour des échantillons solides, comme la viande, les mesures sont réalisées sans préparation de l'échantillon en réflexion, donc en utilisant la configuration de l'appareil qui permet de mesurer la fluorescence de surface d'un échantillon par une mesure en incidence rasante (*front face*).

Les études de Swatland (Swatland, 1991; Swatland et al., 1993; Swatland et al., 1995a; Swatland et al., 1995b; Swatland, 2000) ont montré qu'il était possible de quantifier et d'observer par fluorescence les protéines du tissu conjonctif (collagène et élastine) de la viande pour en évaluer ses qualités (tendreté, origine génétique,...). Ils ont pu démontrer avec ces mesures que les changements de structure qui se produisent sur le collagène lors de la cuisson de la viande sont importants pour les propriétés mécaniques et notamment la tendreté de la viande cuite. Clerjon (Clerjon et al., 2008) a développé l'utilisation de la fluorescence polarisée dans la visible pour étudier l'effet de la température sur les fibres de collagène. Comme le montre la figure 21, il a pu observer la disparition de l'anisotropie de fluorescence des fibres de collagène suite au chauffage.

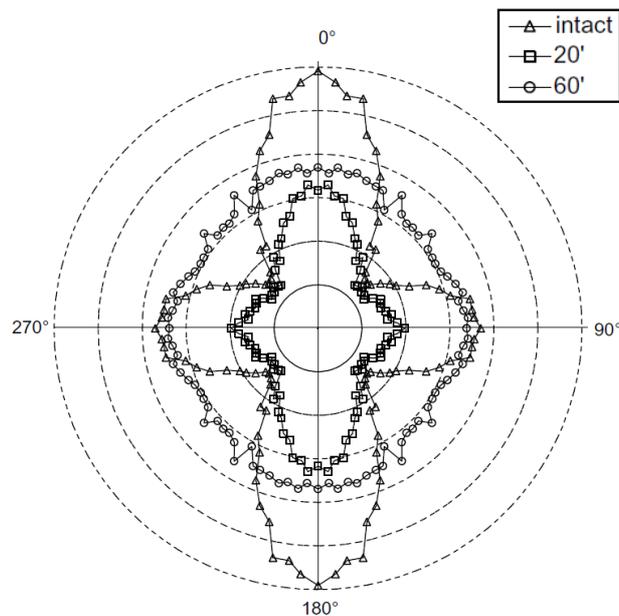


Figure 21 : Représentation de l'anisotropie de fluorescence du collagène après un chauffage à 60°C pendant 0, 20 et 60 minutes. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence utilisées étaient de 380 et 450 nm (Clerjon et al., 2008; Damez et Clerjon, 2008).

Il est aussi possible d'observer par fluorescence le phénomène d'oxydation de la viande, car des produits d'oxydation sont de très bonnes sondes comme les bases de Schiff, qui peuvent être excités entre 340-440 nm et émettre entre 420-520 nm, avec un maximum à 475 nm (Gatellier et al., 2007).

Les protéines peuvent aussi s'oxyder en influençant le profil de fluorescence de la viande. En effet, l'oxydation des myofibrilles a été observée dans le temps en excitant dans l'UV (280 nm) ou dans le visible (350 nm), et en évaluant l'évolution de la fluorescence dans deux intervalles : 300-400 nm et 400-500 nm. Les évolutions d'intensité ont été reliées aux changements d'environnement des résidus des tryptophanes des myofibrilles. Dans le premier intervalle, une diminution d'intensité et un déplacement du pic vers les hautes longueurs d'ondes est observé suite à l'oxydation des résidus de tryptophanes, alors que, dans le deuxième intervalle, l'intensité tend à augmenter avec un déplacement du pic vers les hautes longueurs d'ondes (Estévez et al., 2008; Gatellier et al., 2009), suite à la dénaturation des protéines.

Myosine

L'étude de la fluorescence de la myosine a été réalisée en étudiant séparément la tête de la queue. La tête et la queue sont séparées par voie enzymatique (figure 5). La figure 22 présente le positionnement des résidus de tryptophanes dans la sous-unité S1 (la tête de la myosine), en montrant qu'ils sont exposés à l'environnement externe.

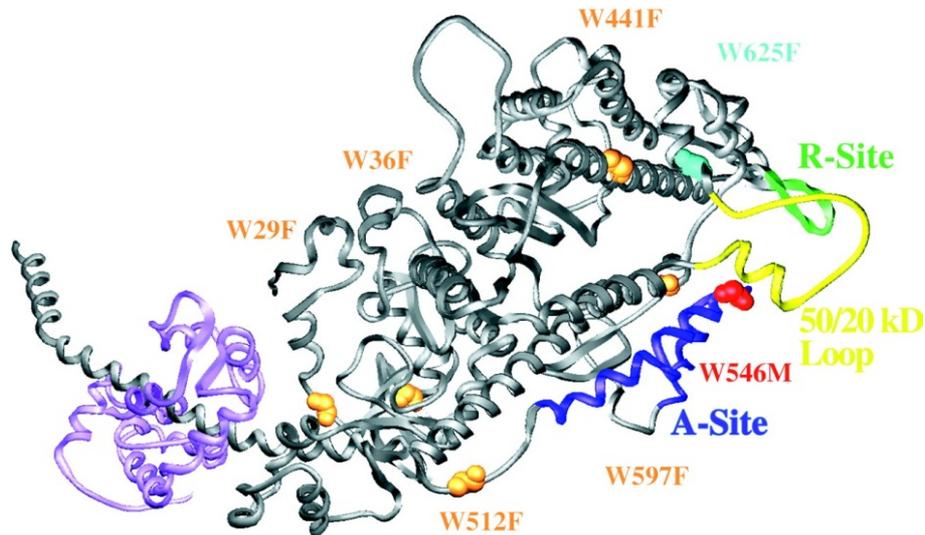


Figure 22 : Images de la sous-unité S1 de la myosine du muscle lisse présentant les positions des résidus des tryptophanes. Les positions indiquées (29, 36, 441, 512, 546, 597, 625) ne correspondent pas toutes aux positions des tryptophanes de la myosine d'un muscle squelettique (114, 132, 441, 511, 596, 830, 832). Les deux myosines, par contre, exposent les résidus de tryptophanes au solvant externe, en ayant une longueur d'onde d'émission d'environ 340 nm (Yengo et al., 1998).

Le fragment S1 a été étudié en présence et en absence d'ATP, nucléotide qui joue un rôle dans la contraction musculaire, en observant le comportement des résidus de tryptophanes.

Cette sous-unité est composée par 7 résidus de tryptophanes localisés en position : 114, 132, 441, 511, 596, 830, 832 (Hayashida et al., 1991; Komine et al., 1991; Maita et al., 1991a). En excitant à 295 nm, la position du maximum d'émission se déplace de 337 nm à 335 nm après fixation de l'ATP, et l'intensité de fluorescence à ce maximum augmente. Ceci indique que les résidus tryptophanes des protéines sont dans un environnement plus apolaire (Werber et al., 1972).

Le fragment méromyosine légère (LMM) de la myosine avec ses deux résidus tryptophanyles (positions 1375 et 1460) a aussi été étudié par fluorescence et dichroïsme circulaire dans le but de comprendre les étapes de dénaturation induite par voie chimique. Le fragment LMM de myosine de plusieurs poissons et de viande a été excité à 295 nm et l'évolution de l'émission de fluorescence en présence de concentrations croissantes de chlorure de guanidinium a été enregistrée (Maita et al., 1991b). L'analyse des spectres de fluorescence a mis en évidence que l'émission des résidus de tryptophanes change à partir d'une concentration de 2 M de chlorure de guanidinium alors que le dichroïsme circulaire montre des différences à partir d'une concentration de 1 M, puis d'autres vers 2 M. Les auteurs proposent un modèle en trois étapes, avec un état intermédiaire de dénaturation pour expliquer leurs résultats. Cet état intermédiaire est différent selon le type de poisson ou de viande considérés (Ogawa et al., 1999).

Hémoglobine

La structure de l'hémoglobine a aussi été étudiée par spectroscopie de fluorescence, en observant le comportement des résidus de tryptophane des 4 sous-unités. La figure 23 présente les positions des résidus de tryptophane du dimère d'hémoglobine $\alpha_1\text{-}\beta_2$.

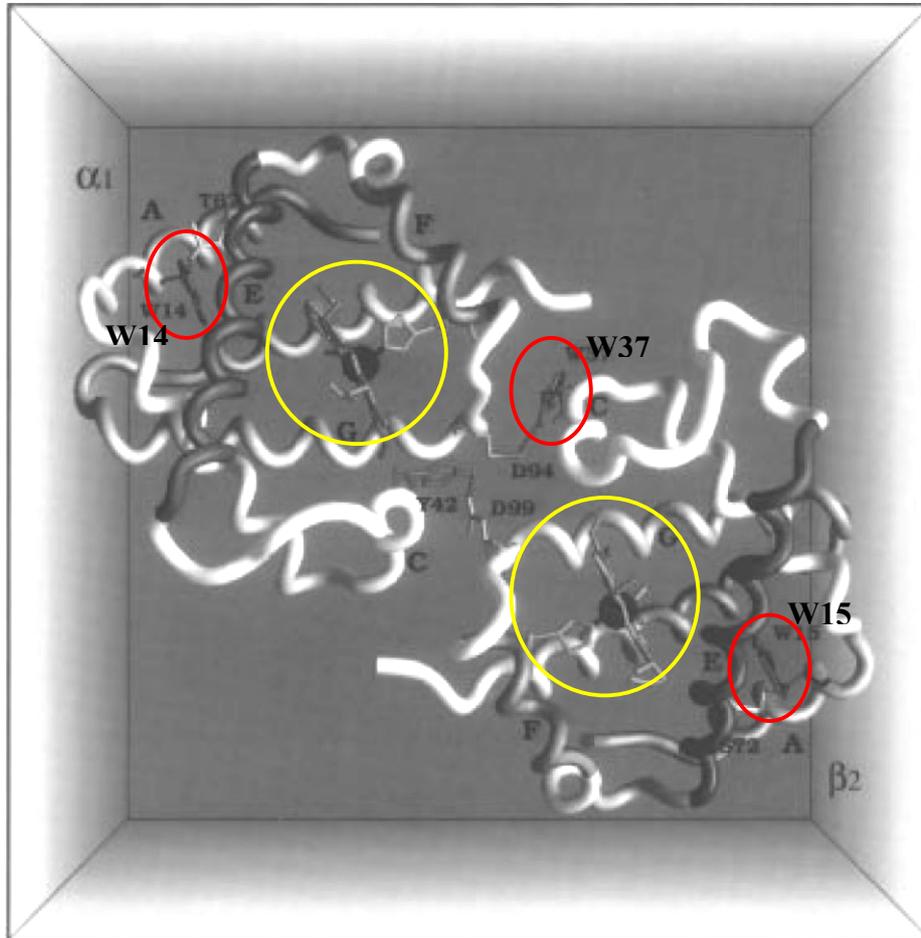


Figure 23 : Schéma du dimère d'hémoglobine : $\alpha_1\text{-}\beta_2$. Positionnement spatial des résidus de tryptophane : chaîne α , Trp-14 en position externe ; chaîne β , Trp-15 en position externe et Trp-37 en position interne (cercles rouges). Les groupements hémiques des deux sous-unités sont aussi visibles (cercles jaunes) (Hu et Spiro, 1997).

Les mesures ont été réalisées en mesurant l'émission de fluorescence en incidence rasante (mode réflexion) car en transmission, l'effet du quenching joué par l'hème est trop important (Teale et Weber, 1957; Teale, 1960; Hirsch, 1994).

Hirsch a observé que, parmi les résidus de tryptophanes (Trp- α -14, Trp- β -15, Trp- β -37), les Trp- β -37 sont responsables de l'émission de fluorescence : l'excitation à 296 nm produit une émission avec un maximum à 325 nm pour l'oxy-Hb ce qui suggère que ce Trp- β -37 est situé dans un environnement plutôt hydrophobe (Burstein et al., 1973; Hirsch et al., 1980).

D'autres études de fluorescence ont été réalisées en présence et absence de ligands. La figure 24 montre les spectres obtenus pour l'oxy-, la met- et la désoxy-Hb (Baldwin et Chothia, 1979; Hirsch et Nagel, 1981; Itoh et al., 1981; Venkatesh Rao et Manoharan, 2004).

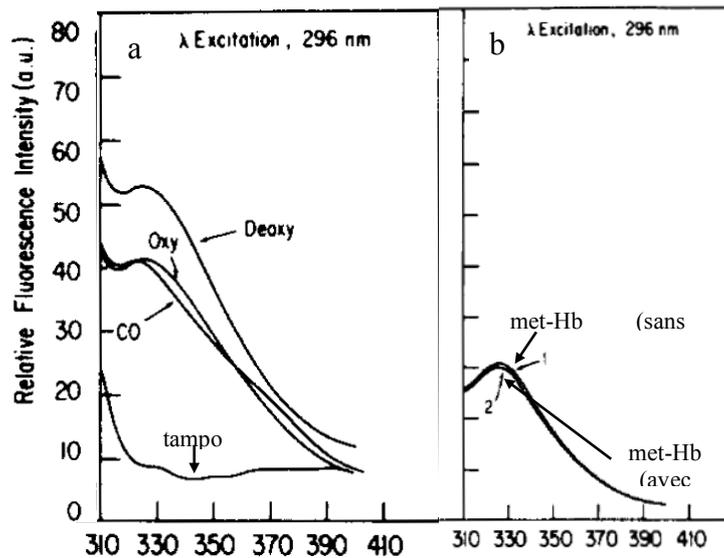


Figure 24 : Spectres de fluorescence des différentes formes d'hémoglobine (excitation à 296 nm). a) Spectres d'émission de l'oxy-Hb, la désoxy-Hb, carboxy-Hb et la ligne de base obtenue à partir du tampon ; b) Spectres d'émission de la met-Hb en absence de IHP (inositol hexaphosphate) (Hirsch et Nagel, 1981).

La spectroscopie de fluorescence a aussi été utilisée pour étudier les modifications de la structure en fonction de la dénaturation par voie chimique par ajout de diméthylsulfoxyde (DMSO). Il a ainsi été montré que lors de l'ajout de DMSO sur l'hémoglobine, le maximum de l'intensité de fluorescence se déplace de 330 nm (en absence de DMSO) à 344 nm (100 % de DMSO) (Liu et al., 1998).

Collagène

La spectroscopie de fluorescence a aussi été utilisée pour étudier l'état du collagène. À la différence de la myosine, le collagène ne possède pas de résidus de tryptophane et très peu de résidus de phénylalanine et de tyrosine (Miller et Gay, 1982), ce qui ne permet pas d'exciter cette protéine dans l'UV à 291 nm. Une des caractéristiques de la structure du collagène est la présence de plusieurs types de liaisons croisées entre le collagène même et l'élastine (Gallop et al., 1972). La pyridinoline est un exemple de liaison croisée et elle est formée par la réaction de deux hydroxylysine aldehydes avec un résidu de lysine formant une structure trifonctionnelle (Robins et al., 1996). La figure 25 présente les structures de la lysine (a) de l'hydroxylysine (b) et de la pyridinoline (c).

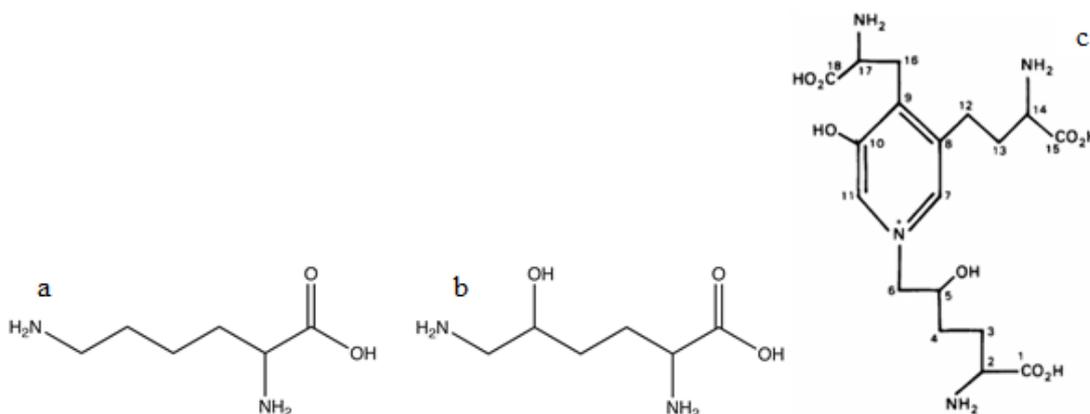


Figure 25 : Structures de la lysine (a) et de l'hydroxylysine (b) constituant la liaison croisée pyridinoline. c) Structure de la pyridinoline de masse molaire d'environ $428,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Robins, 1983).

De par sa structure, cette molécule est une sonde de fluorescence et elle est utilisée, dans le domaine médical, comme marqueur de la dégradation du collagène lors de cancers des os ou de la prostate, par exemple (Samma et al., 1997). En effet, dans les fluides biologiques elle s'excite dans le visible à 325 nm (phosphate de potassium 0,02 M, pH 7,4) et son maximum d'émission de fluorescence est observé vers 400 nm (Fujimoto et al., 1977). La fluorescence de la pyridoline de tissus (ex ou in vivo) permet aussi d'évaluer la réparation des tissus après une blessure. Cette expérience a été réalisée sur des souris en excitant les tissus à 325 nm et en collectant l'émission de fluorescence vers 425 nm (Prabhu et al., 2014).

L'évolution de la fluorescence de cette liaison croisée peut être aussi suivie en excitant le tissu à 405 nm. Il est ainsi possible de suivre la réduction de l'autofluorescence du tissu suite à la rupture des liaisons croisées entre l'élastine et le collagène causée par le développement des cellules tumorales (Lane et al., 2012). D'autre part, la fusion du tissu conjonctif induite par la chaleur, en chirurgie, présente une augmentation de l'intensité d'autofluorescence lorsque des liaisons croisées sont formées pendant la fusion (Su et al., 2014).

Échelle Microscopique

Spectroscopie RMN bas champ

La résonance magnétique nucléaire pulsée à bas champ (RMN-bc) est une technique non invasive et non destructive qui a pris place dans les industries agroalimentaires au cours des années 70. Les toutes premières applications de cette méthode ont été la détermination de la teneur en eau et en lipides des aliments, après la rédaction des normes ISO 8292-1 et 8292-2 de 2010 (Mariette, 2009; ISO 8292-1:2010; ISO 8292-2:2010). Ensuite, d'autres applications ont été proposées, parmi lesquelles l'investigation de la structure des matrices alimentaires, tout spécialement en observant la mobilité de l'eau.

La RMN bas champ s'utilise en mettant l'échantillon en présence d'un champ magnétique assuré par un aimant permanent (champ magnétique de polarisation ou B_0), qui polarise les spins des protons à la fréquence angulaire définie par la relation de Larmor (1) :

$$\omega_0 = \gamma_H * B_0 \quad (1)$$

où, ω_0 ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) est la vitesse angulaire ou la fréquence de précession de Larmor, γ_H est le rapport gyromagnétique, valeur constante (pour l'atome d'hydrogène sa valeur est de $26,752\cdot 10^7 \text{ rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) qui indique la fréquence de précession du spin de l'hydrogène quand il est soumis à un champ magnétique de 1 T ; B_0 est le champ magnétique de polarisation.

Pour pouvoir mesurer l'énergie de magnétisation (M) de l'échantillon, il est nécessaire de perturber l'équilibre dans lequel était l'échantillon, en appliquant un champ magnétique perpendiculaire à B_0 (champ magnétique d'excitation ou B_1), appliqué par des pulses de radiofréquences, qui doivent avoir une certaine énergie ou fréquence. En considérant cette équation en fréquence (2), on a :

$$v_0 = \frac{\omega_0}{2\pi} = \frac{\gamma_H * B_0}{2\pi} \quad (2)$$

où, ν_0 est la fréquence de résonance, donc l'énergie de la radiofréquence qui fait basculer les spins des protons et qui dépend du rapport gyromagnétique et de la force du champ magnétique B_0 .

Après l'application de B_1 , les spins des protons ne sont plus à l'équilibre. Pour rétablir l'équilibre, les spins doivent céder l'énergie en excès :

- soit à l'environnement qui les entoure. Il s'agit de la relaxation longitudinale par rapport à B_0 dite relaxation spin-réseau et décrite par la constante physique T_1 . Elle rend compte des phénomènes de type enthalpique, donc de la liberté de molécules de bouger dans l'échantillon, donc de la viscosité du système ;
- soit aux autres spins. Dans ce deuxième cas, la relaxation est dite transversale ou relaxation spin-spin. Elle est due à des phénomènes de type entropique causant la perte d'ordre du système. En effet, les spins s'excitent et se relaxent entre eux en perdant leur alignement initial, donc leur magnétisation transversale (M_{xy}). La perte de magnétisation transversale de la part des spins est mesurée par la constante physique T_2 (temps de relaxation transversal), qui décrit le déphasage des spins, donc leur perte de cohérence. Ce type d'expérience, dit spin-écho, est capable de mettre en évidence les différents types de protons présents dans l'échantillon.

Classiquement, les expériences de spin-écho consistent en l'application de deux ou plusieurs pulses à l'échantillon. L'application d'un premier pulse transversal fait basculer les spins de 90° , sur le plan x,y. Les spins peuvent alors se mettre à relaxer vers leur position initiale et le signal collecté est appelé *Free Induction Decay* (F.I.D.) décroissant dans le temps. La constante physique de décroissance est dite T_2^* . La décroissance de T_2^* est toujours plus rapide que celle de T_2 car cette dernière est sensible aux phénomènes de diffusion. La mesure du FID peut être quantitative puisque cette séquence permet d'observer tous les protons de l'échantillon.

Après ce premier pulse, la séquence classiquement utilisée dans le domaine agroalimentaire est la séquence dite de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) qui consiste en une combinaison de pulses de différentes intensités et durées (Carr et Purcell, 1954; Meiboom et Gill, 1958). Après l'application d'un pulse de 90° , une série de pulses de 180° est appliquée, afin de refocaliser les spins des protons en produisant des échos d'amplitude toujours plus faible. Chaque pulse est séparé du suivant par un certain temps : le pulse de 90° est séparé du premier pulse à 180° par un temps τ . Entre les pulses à 180° , le temps de séparation est de 2τ .

La figure 26 suivante résume les différentes étapes de la séquence CPMG.

$$90^\circ_{(x)} - \tau - (180^\circ_{(y)} - 2\tau)_n$$

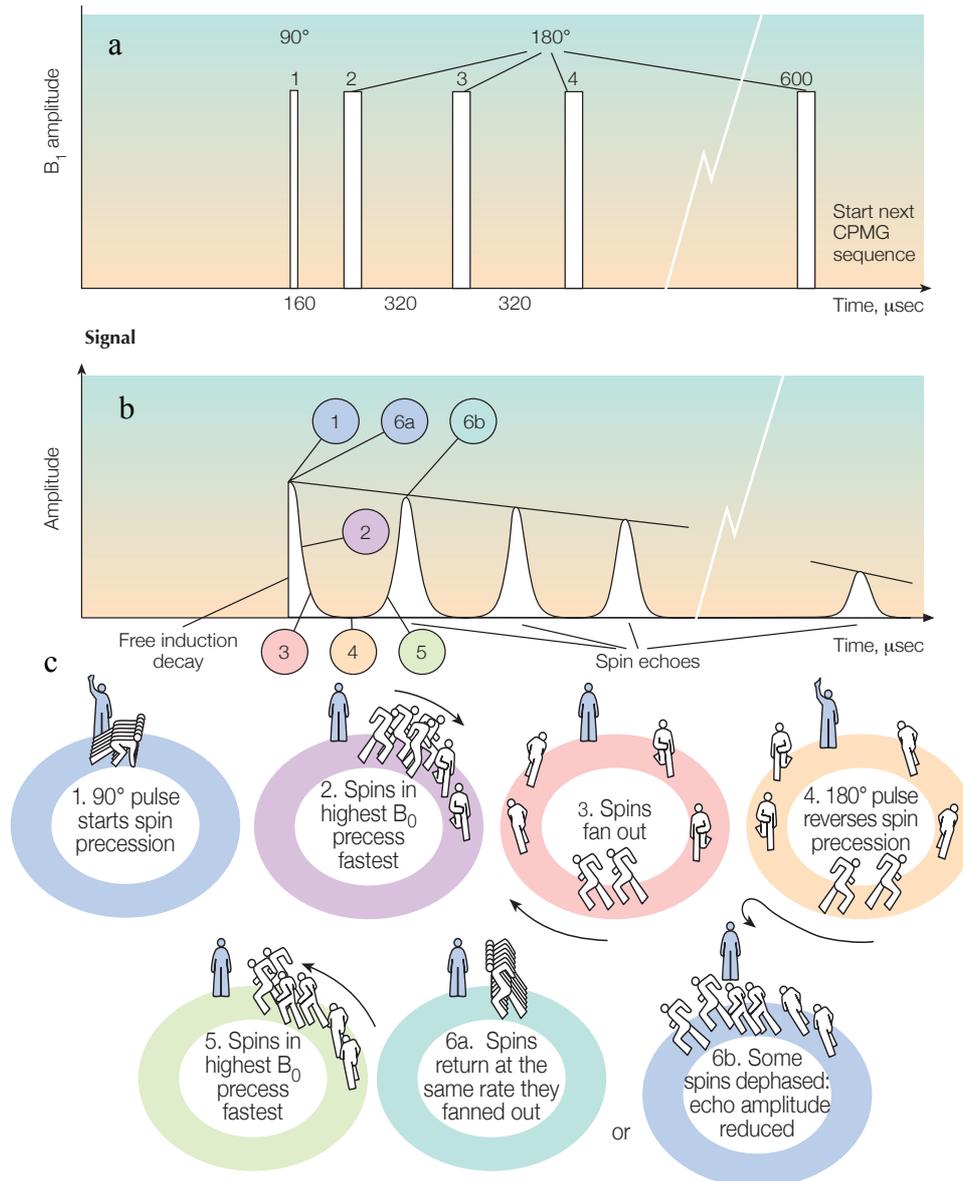


Figure 26 : Schéma présentant la séquence CPMG. a) Schéma montrant les pulses constituant la séquence : le premier à 90° est suivi par une série de pulses de 180° qui refocalisent les spins des protons ; b) les pulses génèrent un signal, écho, de plus en plus petit, à cause du déphasage des spins ; les chiffres dans les cercles correspondent aux étapes “de la course” présentées dans la figure c ; c) les spins des protons peuvent être imaginés comme des coureurs : (1) les coureurs partent avec un pulse de 90° . Après plusieurs tours, ils se sont distancés (2 et 3). Un deuxième pulse de 180° est déclenché (4 et 5), les coureurs font demi-tour et retournent vers la ligne de départ. Les plus rapides ont la distance la plus longue à parcourir et tous arrivent au même moment, s'ils courent à la même vitesse (6a). Si la vitesse n'est pas la même, les coureurs arrivent les uns après les autres (6b). Le processus de retournement des spins est répété plusieurs centaines de fois pendant une expérience et, à chaque retournement, le signal d'écho diminue. La vitesse de décroissance donne le temps de relaxation T_2 (Kenyon et al., 1995).

Dans le domaine des produits carnés, le suivi de l'évolution de la mobilité de l'eau, en fonction d'un ou plusieurs paramètres externes, est l'expérience la plus utilisée pour rendre compte des changements de la matrice (Bertram et al., 2002; Bertram et al., 2004a; Bertram et al., 2004b; Bertram et al., 2006a; Bertram et al., 2006b; Bertram et Aaslyng, 2007; Wu et al., 2007). L'application de la séquence CPMG permet de mettre en évidence la partie mobile du système, donc une ou plusieurs populations d'eau, qui se différencient selon leur temps de relaxation T_2 , ainsi que selon leur amplitude. Les spectres de RMN bas champ obtenus sur le muscle ou la viande en utilisant une séquence de type CPMG ont très souvent été décomposés en plusieurs

populations de protons. Il a très souvent été considéré que dans le muscle, ou dans la viande il existait :

- une très petite fraction de protons qui relaxe très rapidement (T_{2B} 1-10 ms), donc qui correspond aux protons les plus rigides ;
- une fraction plus importante qui relaxe plus tardivement (T_{21} 35-60 ms) ;
- une troisième fraction qui relaxe vers 150-400 ms (T_{22}), qui correspond aux protons les plus mobiles.

Les hypothèses de la littérature pour expliquer ces différents temps de relaxation, les associent à la fraction d'eau en forte interaction avec la matrice et aux fractions d'eau localisées à l'intérieur et à l'extérieur du réseau de myofibrilles ainsi qu'à l'extérieur de la cellule même (Bertram et al., 2001). D'après ces articles, il est souvent supposé que la longueur du sarcomère est l'un des paramètres qui influence le plus la capacité de la viande ou du muscle à retenir l'eau (WHC pour "water holding capacity"), laquelle serait liée à l'espace disponible, donc au volume, à l'intérieur des myofibrilles. Les expériences de RMN bas champ semblent indiquer que le temps de relaxation T_{21} est celui qui représente le mieux cette propriété (rétention d'eau ou WHC) (Bertram et al., 2002; Bertram et Aaslyng, 2007).

Les effets de la température et de la vitesse de chauffage sur cette capacité de la viande à retenir l'eau ont été évalués en utilisant la RMN bas champ. Comme le montre la figure 27, par rapport à l'échantillon cru, les distributions des temps de relaxation T_2 obtenus sur de la viande cuite montrent une diminution d'intensité importante du pic attribuée à l'eau myofibrillaire (T_{21} , 35-60 ms) et l'augmentations du pic d'eau externe aux myofibrilles (T_{22} , 150-400 ms), ainsi que l'apparition d'un nouveau pic avec un temps de relaxation T_2 autour 1000-3000 ms. Les auteurs de cette étude associent ce nouveau pic à l'eau expulsée de la matrice même.

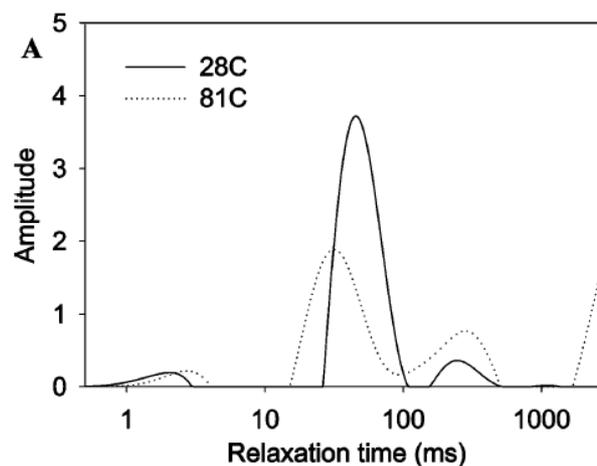


Figure 27 : Distribution des temps de relaxation T_2 pour du porc à 28 °C (cru, trait plein) et 80 °C (cuit, pointillé). (Bertram et al., 2006a).

Ces données de RMN ont été comparées à celles obtenues en analysant les fréquences de la bande amide I qui ont mis en évidence la disparition des bandes relatives à la structure native des protéines (hélice- α 1652 cm^{-1} et feuillets- β 1695, 1619 et 1628 cm^{-1}), et à l'augmentation des bandes à 1682 et 1628 cm^{-1} correspondant aux agrégats intermoléculaires des structures β qui s'associent en formant de nouvelles structures (Bertram et al., 2006a; Wu et al., 2007). Il y

aurait donc une forte relation entre les changements de mobilité des protons observés et les évolutions de la structure secondaire des protéines lors de la cuisson de la viande.

Les effets de la température sur la viande ont été suivis en ligne (donc en cours de cuisson) par RMN (Micklander et al., 2002). Les modifications des propriétés de l'eau (mobilité) se déroulent en plusieurs étapes et à plusieurs températures clés :

- les plus intenses vers 46 et 66 °C ;
- puis d'autres moins importantes vers 42, 57 et 76 °C. Ces températures correspondent aux changements de la microstructure du muscle et, en particulier, à 42 °C au début de la dénaturation de la myosine (Wright et al., 1977; Wright et Wilding, 1984), alors que vers 45-47 °C la réduction du diamètre des myofibrilles débute, ce qui favorise la libération de l'eau des myofibrilles (Bendall et Restall, 1983) ;
- en augmentant la température, vers 57 °C la contraction longitudinale des myofibrilles (qui a son maximum vers 66 °C) débute, lorsque le périmysium se contracte, en réduisant de plus le volume à disposition de l'eau qui est forcée de sortir de l'intérieur des fibres et des structures internes. En montant au-delà de 76 °C, la dénaturation des filaments d'actine se produit, ainsi que la gélification du collagène du périmysium et de l'endomysium favorisant une déshydratation de la viande (Jackson et al., 1974; Palka et Daun, 1999).

La RMN bas champ a aussi été utilisée pour observer l'évolution du T_2 en fonction de la prise en gel de la chair du poisson, en suivant l'évolution de l'élasticité du gel par rhéologie dynamique. Lors de la gélification par voie thermique, dans un premier temps entre 20 et 60 °C, le T_2 diminue avec l'augmentation de l'élasticité du gel. Après 60 °C, le T_2 augmente ce qui correspond à une mobilité de l'eau plus importante. Cette nouvelle population pourrait être liée à la synérèse du gel et/ou à un renforcement des bandes du réseau (Ahmad et al., 2005).

Comme le montre la littérature et l'indique la théorie, la séquence CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) est donc capable de bien caractériser les fractions les plus mobiles de l'échantillon. Par contre, cette séquence n'est pas la plus adéquate pour observer les protons les plus rigides, les protons de la matrice, ceux qui ont un temps de relaxation très bas. Dans ce cas, d'autres séquences sont utilisées (plutôt dans le domaine des sciences des matériaux) (Fujimoto et al., 1972; Boden et Mortimer, 1973; Folland et Charlesby, 1978; Collignon et al., 1981; Shiga et al., 1994; Bradley et al., 1995; Fechete et al., 2003), séquences qui rendent mieux compte de la partie rigide de la matrice : la *séquence de Hahn* (ou *spin-écho*) et la séquence dite *écho de Solide*.

Dans le cas de l'*écho de Hahn*, le premier pulse est suivi par un deuxième de 180° qui refocalise les spins et collecte un signal d'écho après un temps de précession 2τ par rapport au pulse initial (figure 28).

$$(90^\circ_{(x)} - \tau - 180^\circ_{(y)})_1$$

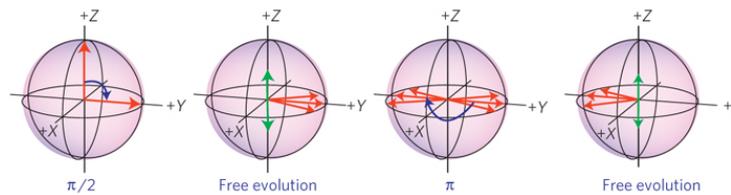


Figure 28 : Schéma des pulses de l'écho de Hahn. Après un premier pulse de 90° sur le plan horizontal (x, y), un deuxième pulse de 180° est appliqué sur le même plan (x, y) (Fuchs et al., 2010).

L'écho de Hahn observe la partie très peu mobile, la partie visqueuse de l'échantillon donc les protons qui n'ont qu'un faible mouvement, grâce au pulse de 180° (Hahn, 1950; Boden et Mortimer, 1973).

L'écho de Solide, par contre, est la séquence qui rend compte des protons les plus rigides de la matrice, ceux qui forment des interactions dipolaires homogènes. Après le pulse initial à 90° , un deuxième pulse de 90° fait basculer les spins sur l'axe y : ensuite ils peuvent relaxer.

$$(90^\circ_{(x)} - \tau - 90^\circ_{(y)})_1$$

Le signal de l'écho est collecté à partir d'un temps équivalent à 2τ , après le premier pulse, où le maximum du signal est atteint et qui a une évolution de type Gaussienne (Powles et Mansfield, 1962; Powles et Strange, 1963; Boden et Mortimer, 1973).

Imagerie de larges objets

À côté des techniques d'imagerie microscopiques classiques telles que les microscopies optique, électronique ou à force atomique, il existe aujourd'hui des imageries qui sont capables d'observer à l'échelle de quelques centaines de micromètres de plus gros objets (de l'ordre de quelques centimètres) : imagerie térahertz (THz), imagerie par résonance magnétique nucléaire (MRI) et imagerie de neutrons.

L'imagerie de RMN est une technique non invasive et non destructive utilisée pour décrire et discriminer plusieurs structures d'un échantillon alimentaire, même pendant l'application d'un procédé technologique de transformation et aussi d'en déterminer la composition. De plus, selon la séquence de relaxation appliquée, il est possible de moduler le contraste, en mettant en évidence une composante plutôt qu'une autre (Mariette, 2009).

Parmi les exemples d'applications de cette imagerie aux aliments, il est possible de trouver des études qui portent sur la détermination de la teneur en eau, en lipides et en collagène de poisson et viande (Mahmoud-Ghoneim et al., 2005; Toussaint et al., 2005; Brix et al., 2009; Mariette et al., 2012). Un autre exemple d'application est l'association de l'imagerie du proton (^1H -MRI) à celle du sodium (^{23}Na -MRI) pour suivre la pénétration du sodium dans la masse musculaire après le procédé de salaison et observer la migration de l'eau (Guiheneuf et al., 1997; Bertram et al., 2005; Vestergaard et al., 2005; Veliyulin et al., 2009; Aursand et al., 2010).

L'imagerie de résonance magnétique nucléaire a aussi été utilisée pour observer l'évolution d'un morceau de viande en ligne (online), pendant la cuisson (Bouhrara et al., 2011; Bouhrara et al., 2012). Dans un environnement échantillon adapté à la RMN, dans lequel le chauffage était assuré par un flux d'eau, les auteurs ont observé les changements de morphologie d'un échantillon de viande (taille de plusieurs centimètres) en même temps que la migration de l'eau.

Ils ont ainsi pu vérifier online les observations faites offline par d'autres auteurs (Bonny et Renou, 2002; Bertram et al., 2004b). En effet, ils ont observé que vers 40-42 °C la contraction des myofibrilles et du collagène a lieu, ce qui induit le début de la migration de l'eau entre les fibres. (Bendall et Restall, 1983; Offer et Trinick, 1983; Micklander et al., 2002). À températures plus élevées, vers 52-55 °C, la déformation de l'échantillon s'accélère ouvrant des espaces entre les fibres où l'eau migre avant d'être expulsée en dehors de l'échantillon (figure 29) (Bouhrara et al., 2011; Bouhrara et al., 2012).

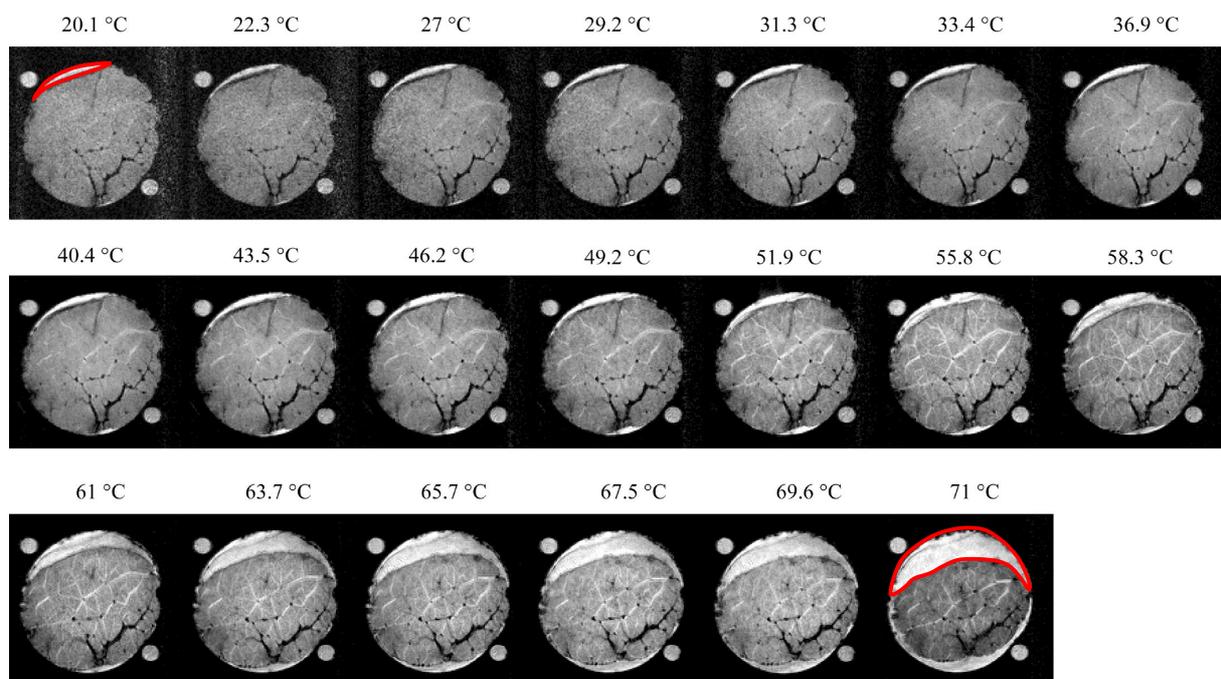


Figure 29 : Images de RMN d'un échantillon de viande en fonction de la température. Les images montrent la déformation de l'échantillon qui se contracte en laissant un espace pour le jus (contours en rouge) sortant de la matrice, en fonction de la température de chauffage (Bouhrara et al., 2011).

Dans la même échelle dimensionnelle, l'imagerie térahertz (THz) est utilisée surtout dans le domaine médical, soit en mode transmission ou réflexion, pour la détection de cancers de la peau, du foie et du sein, par exemple, même *in vivo* (Taylor et al., 2011). Sur des tissus biologiques, l'imagerie THz permet de visualiser les différents types de tissus (maigre, gras, d'autres organes) en modulant la fréquence de la source (Ferguson et al., 2001; D'Amone et Ciesla, 2010). Hoshina a étudié des muscles de porc congelés et a pu montrer les différences de contraste entre les tissus gras et maigres comme le présente la figure 30 (Löffler et al., 2001; Hoshina et al., 2009). Quelques auteurs ont proposé l'application de cette technique sur les lignes de production de l'agroalimentaire afin de détecter la présence des corps étrangers comme les insectes, les objets métalliques ou les matériaux plastiques (Lee et Lee, 2014; Ok et al., 2014).

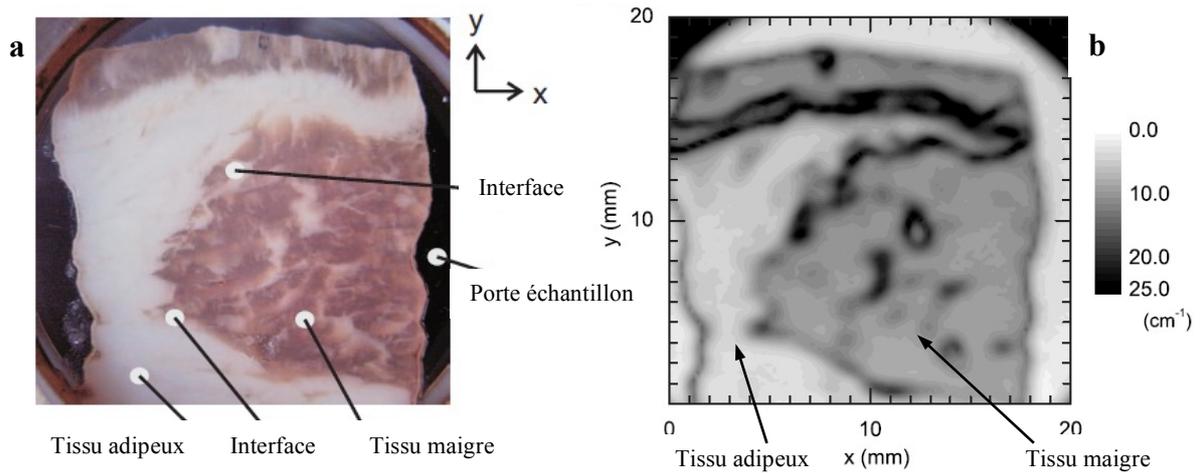


Figure 30 : Image optique d'un morceau de viande (a) et image térahertz correspondante (absorbance à 1 THz) (b) du muscle de porc (Hoshina et al., 2009).

L'imagerie de neutrons est un troisième exemple de technique capable d'observer des gros objets à la résolution de plusieurs μm . C'est une technique non destructive et non invasive qui se base sur la transmission d'un faisceau de neutrons à travers la matière, donc associée à l'interaction entre les neutrons et les différents composants de l'échantillon. Sur des tissus biologiques, comme le muscle, l'interaction la plus favorisée est celle avec les atomes d'hydrogène, puisqu'ils absorbent fortement le faisceau de neutrons. Cette imagerie est déjà utilisée dans les domaines de l'agronomie, des sciences des matériaux et de l'héritage culturel mais l'est encore assez peu dans le domaine de l'agroalimentaire. La figure 31 présente un exemple d'application de l'imagerie de neutrons dans le domaine de la science du sol avec la distribution de l'eau autour d'une racine dans un système poreux comme le sol.

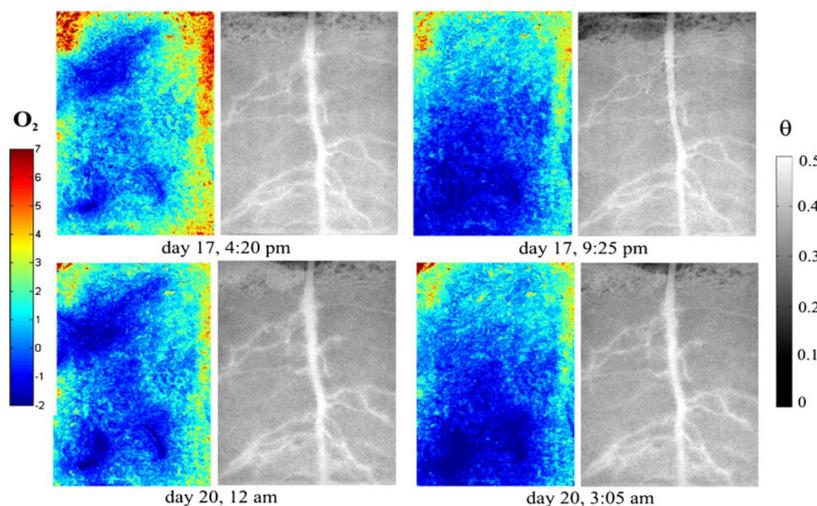


Figure 31 : Images relatives à la distribution d'eau autour d'une racine de lupin cultivée dans du sable (à gauche) et de la distribution d'oxygène (à droite), en fonction du temps de croissance (Rudolph et al., 2012).

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Système de cuisson

Le système de cuisson (figure 32) est composé d'un four instrumenté (thermosondes, sonde à oxygène, support pour faciliter le positionnement des thermosondes directement au cœur de l'aliment), d'un boîtier électronique pour le traitement de l'information et d'un logiciel disposant d'une interface utilisateur pour la visualisation des données.

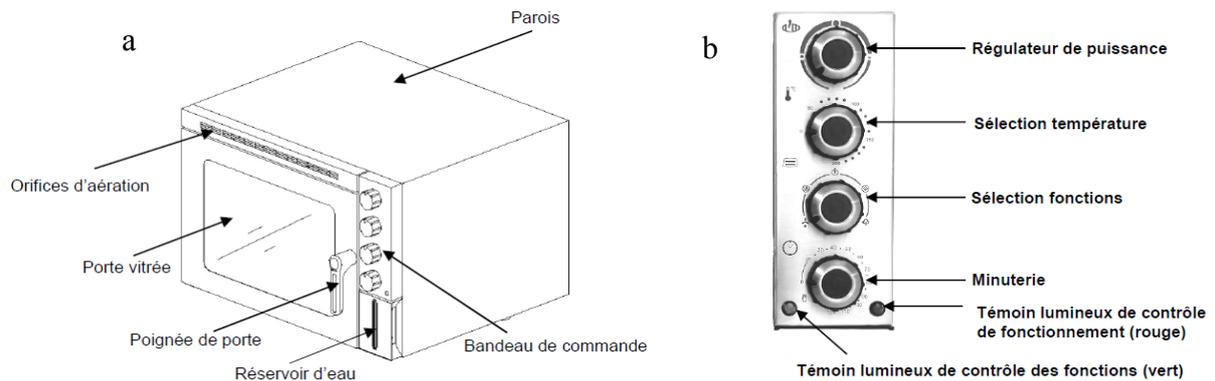


Figure 32 : a) Schéma du four "Opticook" utilisé par tous les partenaires du projet pour réaliser les cuissons de viande et poisson selon l'application de plusieurs barèmes de cuisson ; b) bandeau de commande du four avec les boutons de réglage de la température, du mode de cuisson, de la durée et de la puissance.

Four Opticook

La cuisson des différentes matrices du projet Opticook a été menée dans un four multifonction (Bartscher), semi-professionnel, présenté sur la figure 32 et dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau 3. Comme indiqué dans ce tableau, il est possible avec ce four de cuire les aliments par chaleur sèche, à la vapeur ou par combinaison des deux modes.

Tableau 3 : Caractéristiques du four Opticook.

Désignation	Four combi vapeur compact semi-professionnel
Thermostat	50 – 200 °C
Minuterie	0 – 120 min ou manuel
Alimentation	230 V, 50 Hz, 2500 W
Dimensions Cavité	Extérieurs (L,P,H.) : 550 x 545 x 380 mm
	Intérieurs (L,P,H.) : 360 x 330 x 260 mm Volume ≈ 31 L
Poids	20 kg
Mode de Cuisson	Mode "chaleur sèche" Mode "chaleur mixte" Mode "vapeur"

Ce four nous a été fourni par les industriels en charge du projet : SEB et TGCP. Avant livraison (avril 2013), le four a été personnalisé selon nos demandes pour être adapté aux mesures spécifiques que nous souhaitions réaliser (figure 33). Afin de pouvoir suivre la cuisson avec une fibre optique par spectroscopie et de pouvoir réaliser les expériences de diffusion de neutrons, nous avons demandé à équiper le four avec trois hublots : un sur le dessus du four (pour la spectroscopie), et deux sur les côtés (pour l'imagerie de neutrons et le couplage

imagerie-spectroscopie). Les hublots étaient fermés avec des fenêtres en verre ou en aluminium (transparent aux neutrons) pour éviter de disperser la chaleur lors de la cuisson des échantillons.

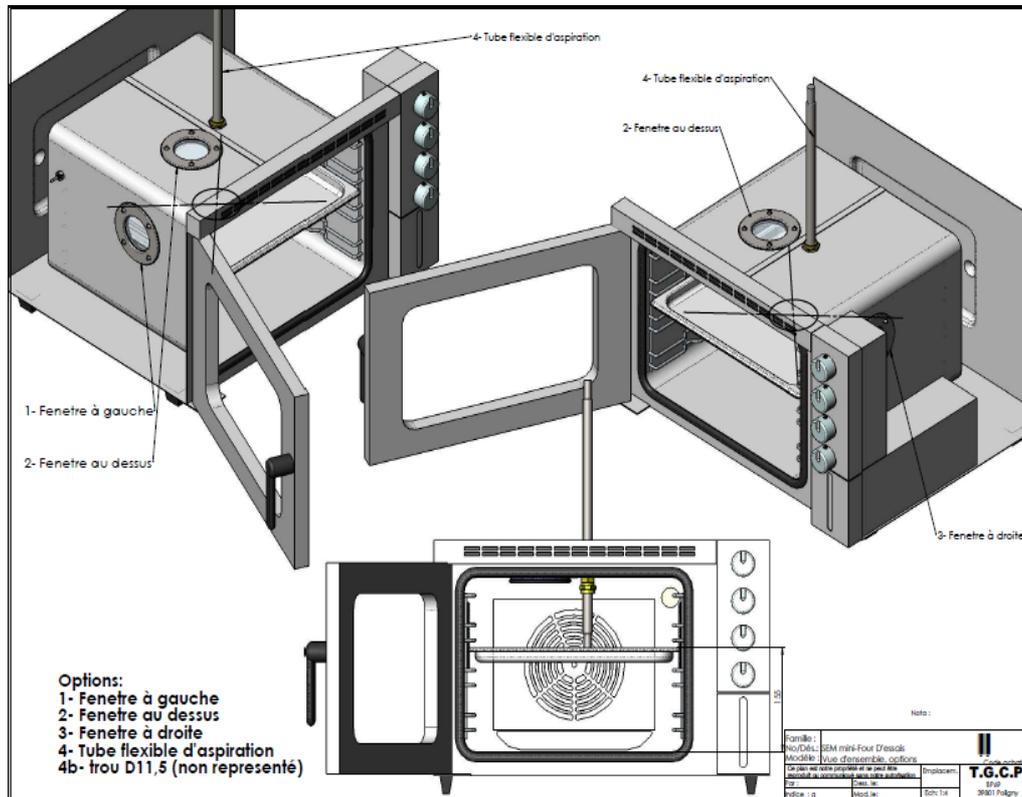


Figure 33 : Schéma du four Opticook en utilisant le logiciel de conception assisté SolidWorks. Cette représentation met en évidence les personnalisations que nous avons demandé pour réaliser les expériences couplées : deux hublots à gauche et à droite du four pour permettre le passage du faisceau de neutrons à travers le four ; un hublot sur le dessus pour permettre l'arrivée d'une fibre optique.

Un capteur de température est fixé à l'intérieur de la cavité du four, pour mesurer sa température lors des cuissons. Une thermosonde "mobile" est introduite à l'intérieur de l'échantillon pour mesurer sa température à cœur (figure 34).

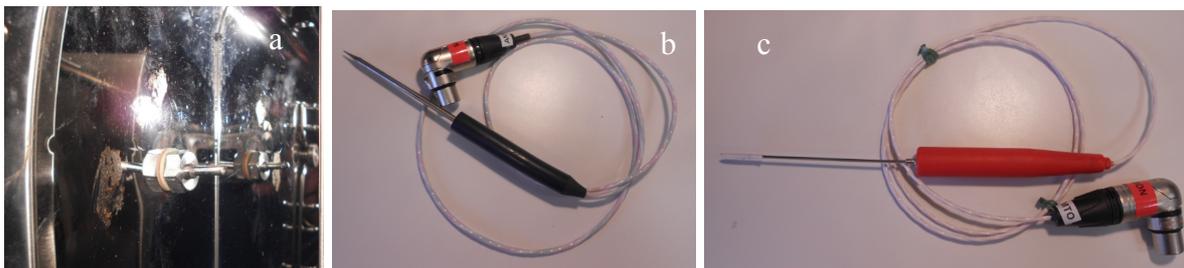


Figure 34 : Images des sondes de températures utilisées pendant les cuissons : a) sonde installée dans la cavité du four mesurant la température de l'environnement de cuisson ; thermosondes utilisées pour mesurer les températures à cœur de la plupart des viandes (à l'exception du blanc de poulet) (b) et des poissons (c).

Deux thermosondes ont été mises à notre disposition :

- une sonde 3 points pour la cuisson des viandes (sauf pour le blanc de poulet) disposant de trois capteurs de température (plan sur figure 35). Un capteur de mesure de la température à la pointe de la sonde que nous avons positionnée au cœur de la matrice à cuire, un capteur à 15 mm de cette pointe et un capteur à 30 mm de cette pointe ;

- une simple sonde pour la cuisson des poissons et du blanc de poulet disposant d'un seul capteur de température à sa pointe que nous avons positionné à cœur.

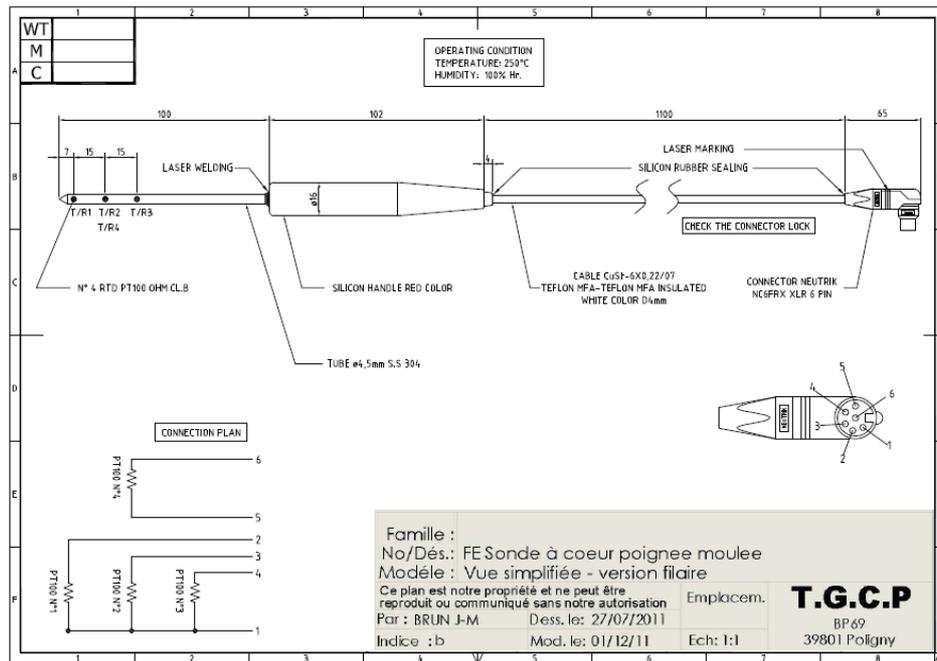


Figure 35 : Schéma électrique de la thermosonde viande à 3 points : le premier point de mesure est sur la pointe ; le deuxième est à 15 mm de la pointe ; le troisième est à 30 mm de la pointe.

Un support qui nous permettait d'introduire la sonde de température à l'intérieur des échantillons et de la positionner à cœur de façon la plus précise et répétable possible nous a été fourni. Il disposait de deux plages de réglage, une plage dédiée à la sonde viande (trous de gros diamètres) et une plage dédiée à la sonde poisson (trous de petits diamètres). Chaque plage proposait un réglage de hauteur tous les cinq millimètres pour s'adapter au centre géométrique de la matrice que nous souhaitions cuire (figure 36).

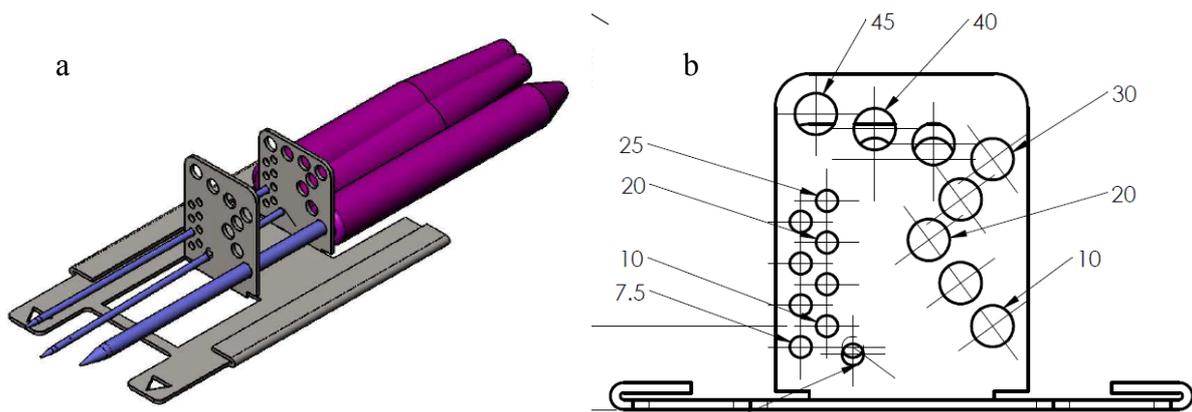


Figure 36 : Schéma du support utilisé pour enfoncer à cœur les thermosondes. L'objectif de ce support est de positionner la sonde toujours au même endroit, donc de rendre l'expérience la plus répétable possible. a) exemple d'utilisation du support ; b) positionnement des trous, petits et grands, qui correspondent à la position de la sonde poisson et viande, respectivement.

Le système d'acquisition des données est composé d'un boîtier contenant les cartes d'acquisition. L'enregistrement des températures est réalisé par le logiciel *Opticook* ; en figure 37 est présentée l'interface graphique.

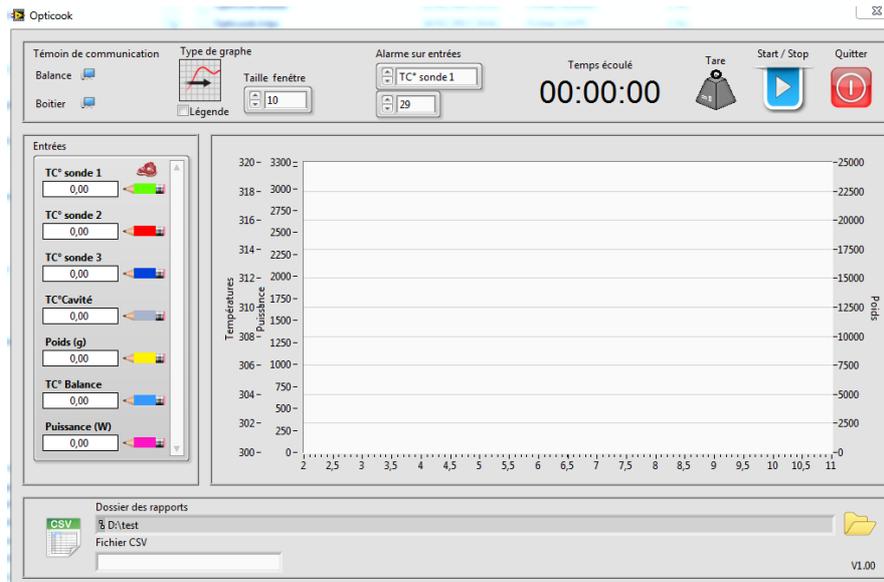


Figure 37 : Interface graphique du logiciel Opticook qui gère l'enregistrement des données des sondes installées dans le four et positionnées dans l'échantillon.

L'interface graphique se présente subdivisée en plusieurs parties. À gauche de l'écran sont localisés les indicateurs des capteurs installés dans le four et aussi une icône (viande ou poisson) indiquant la thermosonde utilisée. En haut de l'écran, on retrouve les témoins de communication entre l'ordinateur et les sondes, ainsi que les boutons de démarrage et arrêt de l'enregistrement des données. Au milieu de la fenêtre, on peut visualiser le graphique où les valeurs enregistrées s'affichent et tout en bas sont indiqués le nom du fichier et le dossier de sauvegarde des données. Le logiciel sauvegarde le fichier en format .csv sous forme d'un tableau indiquant :

- la date et l'heure de l'expérience ;
- un chronomètre indiquant la durée de l'expérience ;
- un chronomètre qui se déclenche lors de l'enfournement de l'échantillon. Ce chronomètre est activé manuellement à partir du logiciel *Opticook* (figure 37) ;
- les températures des thermosondes et de la cavité ;
- la puissance absorbée par le four.

Le projet Opticook est un projet dont l'objectif d'une des parties principales (lot 8 dont ma thèse fait partie) était de définir des protocoles de cuisson pour différentes matrices à destination de l'ensemble des partenaires du consortium. Ces protocoles nous ont permis de réaliser des bases de données (lot 9 du projet Opticook) afin d'établir des corrélations entre les différentes études menées par analyse sensorielle ou analyse de la texture, ou, par le suivi des principaux descripteurs par spectroscopie ou par analyse des arômes, pour le développement des capteurs (lot 10 du projet Opticook). Afin de vérifier l'universalité des signatures spectroscopiques et olfactives, plusieurs types de viande et de poisson ont été étudiés en raison de leurs différences de couleur, de teneur en myoglobine et en matières grasses : trois poissons (dos de cabillaud, pavé de saumon, truite entière éviscérée) et cinq viandes (filet de bœuf, rôti de porc, rôti de veau, blanc de poulet et cuisse de poulet). Les paramètres comme le poids, la taille, le diamètre ou la marque des échantillons ont été précisément décrits dans les protocoles rédigés par les

partenaires du projet (SEB pour la viande et PFI Nouvelles Vagues pour les poissons). Ces paramètres et les protocoles de cuisson ont été suivis par toutes les équipes à toutes les étapes du projet. Les cinétiques de cuisson à reproduire sont en général des cinétiques à deux paliers, avec deux réglages de température. Le premier palier démarre après préchauffage du four, à haute température (200 °C). Le deuxième palier a lieu à température réduite (arrêt du four) de manière à stabiliser la température du produit à cœur en fin de cuisson. Pour la thèse, parmi toutes ces matrices, nous n'en avons choisi que trois en relation avec leur composition chimique : le filet de bœuf, le blanc de poulet et le dos de cabillaud.

Partie 1 : Échelle moléculaire

Matrices utilisées et protocoles de cuissons

Les filets de bœuf (*Bos taurus*, race Charolaise), appelés aussi rond parisien (*Psoas major*), ont été achetés chez le même boucher pendant toute l'étude. Les caractéristiques de ce morceau étaient bien décrites dans le protocole : masse de 500 à 600 g, 100 mm de longueur et 80 mm de diamètre. Les protocoles de cuisson imposaient une double étape pour chaque degré de cuisson, afin d'atteindre trois température de fin cuisson, pour obtenir trois degrés de cuisson différents déterminés par évaluation sensorielle (partenaire SEB) : sous cuit (SC), bien cuit (BC) et trop cuit (TC).

Ainsi, pour réaliser les cuissons du rond parisien, le four était préchauffé à 200 °C pendant au moins 20 minutes en mode chaleur sèche. La température de l'échantillon avant enfournement était de 6 à 8 °C. La cuisson de l'échantillon :

- SC se réalisait en éteignant le four juste après l'enfournement du morceau et en laissant la température à cœur du filet atteindre 45 °C ;
- BC se réalisait en laissant la température de l'échantillon atteindre 13 °C. Le four était alors éteint. Le morceau continuait sa cuisson jusqu'à ce que sa température à cœur soit de 52 °C ;
- TC se réalisait en éteignant le four lorsque la température de l'échantillon atteignait 19 °C. Le morceau continuait sa cuisson jusqu'à ce que sa température à cœur soit de 68 °C.

Les profils de températures (cavité, à cœur et deux points intermédiaires) enregistrés pour chaque barème avec la sonde trois points sont présentés en annexe 1. En fin de cuisson, pour tous les échantillons, ces derniers étaient placés dans un sachet en plastique puis dans un bain de glace jusqu'à ce que leur température à cœur atteigne 15 °C.

Les blancs de poulet (*Gallus gallus*) de la marque *Le Gaulois* ont été achetés dans un supermarché local. Leur masse était d'environ 140 g. Ils étaient cuits à la vapeur. Le protocole imposait de préchauffer le four en mode vapeur, à 100 °C, pendant 30 minutes minimum et d'enfourner deux blancs de poulet à la fois. La température des échantillons avant enfournement était de 6 à 8 °C. Comme pour le bœuf, les protocoles de cuisson imposaient deux paliers. Pour l'échantillon :

- SC, la température à cœur de l'échantillon montait à 15 °C après enfournement. Le four était éteint et la cuisson continuait dans ces conditions jusqu'à ce que leur température à cœur soit de 56 °C ;
- BC, les deux températures clefs étaient de 42 °C et 66 °C ;
- TC, les deux températures clefs étaient de 56 °C et 76 °C.

Les profils de températures (cavité et à cœur) enregistrés pour chaque barème avec la sonde mono-point sont présentés en annexe 2. À la fin de la cuisson, les filets de poulet étaient placés dans un sac en plastique et refroidis dans un bain de glace jusqu'à ce que la température à cœur soit de 15 °C.

Les dos de cabillaud (*Gadus morhua*) congelés ont été achetés par l'un des partenaires du projet, PFI Nouvelles Vagues, qui les a sélectionnés et emballés sous vide. La masse des échantillons était de 150 g. La cuisson du filet de cabillaud s'est faite en mode vapeur. Deux filets étaient cuits en même temps. La décongélation des échantillons était réalisée la nuit précédente aux cuissons, dans un réfrigérateur à 3-4 °C pendant environ 8 h. Après avoir préchauffé le four à 100 °C, pendant 30 minutes minimum, les filets étaient enfournés. Pour l'échantillon :

- SC, la cuisson du filet continuait avec le four éteint jusqu'à ce que la température à cœur soit de 50 °C ;
- BC, après enfournement, lorsque la température à cœur de l'échantillon avait atteint 20 °C, le four était arrêté, la cuisson continuait alors par inertie jusqu'à ce que la température à cœur soit de 60 °C ;
- TC, les deux températures clefs étaient de 61 °C et 80 °C.

Les profils de températures (cavité et à cœur) enregistrés pour chaque barème avec la sonde mono-point sont présentés en annexe 3. À la fin de la cuisson, les filets de dos de cabillaud étaient placés dans un sac en plastique et refroidis dans un bain de glace jusqu'à atteindre la température à cœur de 15 °C.

Le tableau 4 présente les temps nécessaires pour atteindre les températures à cœur enregistrées lors de la cuisson de tous les échantillons.

Tableau 4 : Temps nécessaires à l'échantillon pour atteindre la bonne valeur de température à cœur pendant les cuissons, températures finales à cœur et correspondant au degré de cuisson.

Matrice	Degré de cuisson	Temps cuisson à cœur (min)
Rond Parisien	SC (45 °C)	66,20 ± 6,94
	BC (52 °C)	31,10 ± 2,34
	TC (68 °C)	49,59 ± 6,19
Blanc Poulet	SC (56 °C)	13,08 ± 1,53
	BC (66 °C)	14,50 ± 1,71
	TC (76 °C)	22,03 ± 1,40
Dos Cabillaud	SC (50 °C)	19,12 ± 1,38
	BC (60 °C)	16,27 ± 1,79
	TC (80 °C)	19,68 ± 1,46

Préparation des échantillons

Une fois que les échantillons s'étaient refroidis (15 °C à cœur), nous avons coupé le morceau entier en plusieurs tranches d'un centimètre d'épaisseur, en utilisant la partie centrale du morceau. Ces trois tranches étaient ensuite émiettées au couteau et les miettes mélangées pour moyenner les effets du gradient de température sur la tranche entière.

Nous avons réalisé plusieurs répétitions pour chaque matrice :

- trois répétitions pour chaque barème de cuisson ;
- trois répétitions par tranche.

Nous avons donc réalisé neuf cuissons par matrice. Pour chaque barème de cuisson, les échantillons étaient coupés en trois tranches et l'analyse sur chaque tranche a été répétée trois fois.

Méthodes d'analyse

Calorimétrie

Nous avons utilisé un microcalorimètre (DSC III, Setaram, France) pour évaluer les caractéristiques thermiques de nos échantillons. L'objectif est d'observer le degré de dénaturation des protéines. Les masses de miettes d'échantillon placées dans la cellule de calorimétrie étaient d'environ 450 à 500 mg. La cellule référence contenait de l'oxyde d'aluminium (488,77 mg), poudre inerte dans l'intervalle de température étudié (25-100 °C). La rampe de température imposée était de 0,5 °C·min⁻¹. Les thermogrammes obtenus ont été analysés avec le logiciel *Setsoft 2000*. Les paramètres étudiés sont les températures des pics de dénaturation des différentes protéines : nous avons donc relevé sur chaque thermogramme la valeur de la température des pics, ainsi que leur température de début de dénaturation.

Spectroscopie dans le visible (VIS)

La spectroscopie dans le visible a été réalisée à l'aide d'un appareil portatif (FieldSpec 3 Analytical Spectral Devices, Inc., USA). Nous avons utilisé ce spectromètre en mode réflexion, en touchant l'échantillon avec une fibre optique capable d'envoyer et de collecter un signal dans l'intervalle 350-900 nm. Nous avons collecté un spectre par échantillon, en cumulant 128 acquisitions. Neuf répétitions par barème de cuisson ont été réalisées. Nous avons suivi le rapport entre les intensités à 580 nm et 544 nm qui rendent compte de l'état des hémoprotéines (oxy- ou met-) selon l'équation (3)

$$ratio = \frac{I_{580}}{I_{544}} \quad (3)$$

Sur les valeurs de ratio d'intensité, nous avons réalisé l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA-1way) en y couplant le test *post-hoc* de Tukey ($\alpha = 0.05$) pour en déterminer les groupes (Statistica 10, Statsoft, Inc.). L'ANOVA a eu une étape préliminaire (test d'homogénéité de la variance de Levene) qui nous a permis de vérifier si la variance d'erreur intergroupe était similaire parmi les groupes.

Le test de Tukey (ou test de la différence vraiment significative *Honest Significant Difference* (HSD)) est un test de comparaison multiple utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes de groupes dans une analyse de variance.

Il est basé sur la *distribution de la statistique d'écart studentisée*, q , et il compare chaque paire de moyennes comme si ces deux moyennes pouvaient être la plus grande et la plus petite dans l'ensemble de n moyennes à comparer (4)

$$\mu_k - \mu_l \quad (4)$$

Les différences entre les moyennes des traitements sont comparées à une valeur critique T_α (ou *valeur atteinte HSD*). Cette valeur peut être calculée par l'équation (5)

$$T_\alpha = q_{\alpha;p;p(n-1)} \sqrt{\frac{S}{n}} \quad (5)$$

où, T_α est la valeur critique, q est la valeur de la distribution qui dépend de α , le niveau de confiance (0,05), p le nombre de traitement, $p(n-1)$ degrés de liberté, s la variance d'erreur, n nombre de répétitions. Donc, la différence entre deux moyennes est significative si

$$\mu_k - \mu_l > T_\alpha \quad (6)$$

Spectroscopie dans le moyen infrarouge (FTIR)

Les expériences de spectroscopie FTIR-ATR ont été réalisées en utilisant un appareil de type Spectrum 100 de chez Perking Elmer. L'objectif était d'observer les changements dans tout le spectre du moyen infrarouge correspondant aux vibrations de tous les constituants de nos matrices (protéines, sucres, matières grasses et eau) et de trouver les nombres d'ondes qui représentaient au mieux les différences sur les trois degrés de cuisson. Les expériences ont été réalisées en réflexion, en positionnant quelques miettes de l'échantillon sur le cristal. Nous avons réalisé 128 acquisitions entre 4000 et 600 cm^{-1} , avec une résolution de 2 cm^{-1} . Neuf répétitions par barème de cuisson ont été réalisées. La figure 38 présente un exemple de spectre collecté dans le moyen infrarouge d'un échantillon de bœuf.

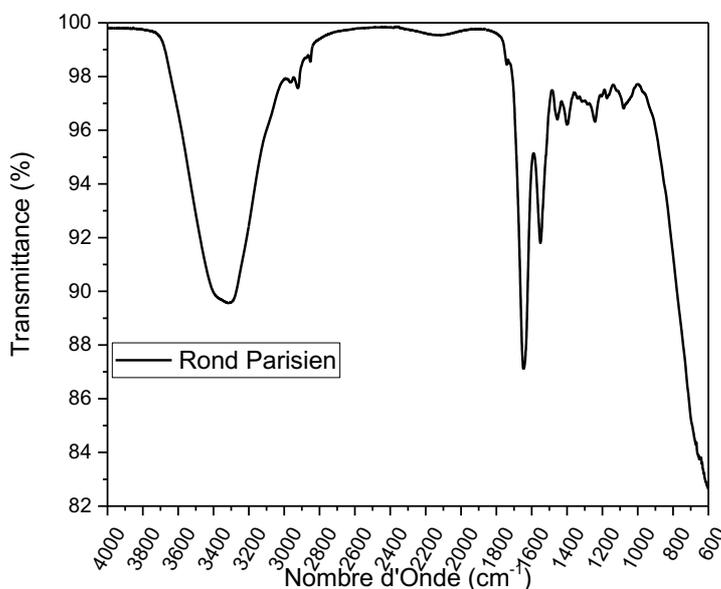


Figure 38 : Exemple de spectre obtenu dans l'infrarouge moyen d'échantillon de bœuf.

Analyse statistique des spectres obtenus dans le moyen infrarouge

L'analyse des spectres a été faite en plusieurs étapes en utilisant le logiciel OriginPro 9.2 (OriginLab Corporation, USA). Les spectres infrarouge collectés ont été coupés entre 1000 et 600 cm^{-1} , pour éliminer la zone où l'absorption est très importante. Ensuite, pour étudier plus précisément la position des bandes les plus intenses de ces spectres, nous avons déconvolué à l'aide d'une dérivée seconde, couplée au filtre de *Savitzky-Golay* permettant de lisser les spectres en réduisant le bruit de fond. Les paramètres de l'algorithme de *Savitzky-Golay* sont : polynôme de second degré et une fenêtre de 30 points. En effet, OriginPro 9.2 interpole les données brutes du spectre (7)

$$f(x) = a_n x^n + a_{n-1} x^{n-1} + a_{n-2} x^{n-2} + \dots + a_0 \quad (7)$$

et, ensuite, à partir de ces données en calcule la dérivée (8)

$$f'(x) = na_n x^{n-1} + (n-1)a_{n-1} x^{n-2} + \dots + a_1 \quad (8)$$

(Savitzky et Golay, 1964; Kitamura et Hozumi, 1987). Un exemple de signal dérivé et lissé avec la fonction de *Savitzky–Golay* est présenté sur la figure 39.

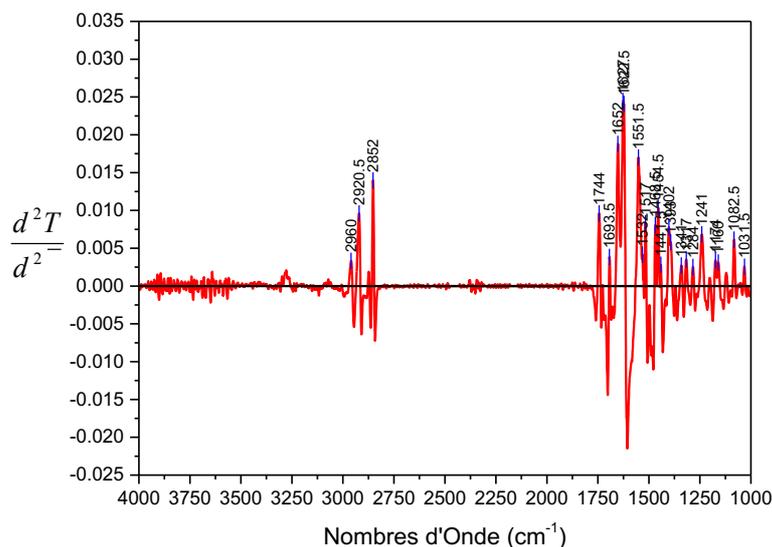


Figure 39 : Exemple de spectre dérivé et lissé avec la méthode de *Savitzky–Golay*, en prenant une fenêtre de 30 points.

La sélection des pics observés sur ces spectres dérivés a été faite en prenant les pics positifs qui ont une intensité supérieure de 10 % de la ligne de base. Nous avons alors comparé les valeurs des nombres d'onde des pics obtenus à partir de cette première sélection sur toutes les matrices, pour tous les degrés de cuisson et toutes les répétitions. À partir de cette comparaison, une deuxième sélection a été réalisée afin de lister les trente nombres d'onde, les plus répétitifs et les plus communs à toutes les expériences.

Les trente nombres d'onde sélectionnés ont été ensuite traités par l'analyse en composantes principales et puis par ANOVA en utilisant le logiciel Statistica 10 (Statsoft, Inc.). L'analyse en composantes principales (ACP) est une technique d'analyse des données de statistique multivariée qui transforme des variables liées (corrélées) entre elles (celles observées) en (nouvelles) variables décorrélatées les unes des autres, dites composantes principales. L'objectif est de simplifier l'information de façon à la rendre moins redondante, en réduisant le nombre de variables et de classifier les observations (les échantillons) en groupes.

D'un point de vue mathématique, les nouvelles variables sont une combinaison linéaire de variables observées auxquelles il est assigné un poids, "une valeur d'importance", selon l'expression générique (9)

$$y = a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_p x_p \quad (9)$$

où y est la nouvelle variable produite (composante principale), x_1 , x_2 et x_p sont les variables observées (les nombres d'ondes dans notre cas) et a_1 , a_2 et a_p correspondent aux poids assignés

aux variables initiales. Le choix des poids est réalisé en ajoutant des contraintes aux composantes principales créées. Donc, la première composante principale, y_1 , est définie par (10)

$$y_1 = \sum_{i=1}^p a_{1i} x_i \quad (10)$$

où $a_{1i} x_i$ est la combinaison de poids (a_{1i}) de la première composante qui a été assignée à chaque variable (x_i) observée. La première composante (y_1) doit avoir une variance maximale sous la contrainte que la somme des carrés des poids soit égale à 1 (11)

$$\sum a_{1i}^2 = 1 \quad (11)$$

Le principe pour calculer les composantes principales suivantes (y_2, y_3, y_4, \dots) est le même : maximiser la variance de la composante en prenant en compte, en plus, la contrainte de l'orthogonalité des composantes, deux à deux (12)

$$\sum a_{1i} * a_{2i} = 0 \quad (12)$$

où, a_{1i} et a_{2i} sont les poids de la première et de la deuxième composante principale. De cette façon, à chaque nouvelle composante calculée, le nombre de contraintes augmente, donc la variance expliquée par la composante même diminue, jusqu'à la dernière composante qui aura une variance d'environ zéro. Donc, à partir de 30 variables sélectionnées des étapes précédentes, nous avons, donc, obtenu 30 nouvelles variables, dont nous avons choisi les deux premières (appelées facteur 1 et facteur 2) après avoir observé la variance expliquée : environ le 75 % et 8 % (figure 75a).

Une dernière étape de réduction des variables a été nécessaire pour enlever les valeurs redondantes. Nous avons observé le graphique des projections des variables sur le plan (figure 75a) et avons choisi d'en enlever seize qui nous semblait être redondantes. Les deux premières composantes des quatorze variables restantes expliquent, respectivement, 71 % e 10 %, environ, de la variance totale (figure 76 et figure 77). Ensuite, nous avons observé le graphique des projections des échantillons en fonction des deux premières composantes et ajouté les ellipses de confiance ($\alpha = 5\%$) pour avoir une première information par rapport à la classification des matrices en fonction du degré de cuisson (figure 78, figure 79 et figure 80).

Ensuite, l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA-1way) a été réalisée sur ces variables, avec le test *post-hoc* de Tukey ($\alpha = 0.05$). L'ANOVA a eu une étape préliminaire (test d'homogénéité de la variance de Levène) qui nous a permis de sélectionner les variables qui avaient des variances d'erreur similaires.

Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence (Luminescence Spectrometer, LS 50 B, Perkin Elmer) a été réalisée en mode incidence rasante. L'objectif était de suivre le changement de conformation

des protéines en observant l'environnement des résidus de tryptophane. Le porte échantillon était équipé d'une cellule avec une fenêtre en quartz. Cette cellule était remplie avec 0,7 g de miettes d'échantillon. Les spectres ont été enregistrés en excitant les tryptophanes à 291 nm et en collectant l'émission entre 300 et 450 nm. Neuf répétitions par barème de cuisson ont été réalisées. La figure 40 présente un exemple de spectre d'émission de fluorescence enregistré sur la matrice "bœuf".

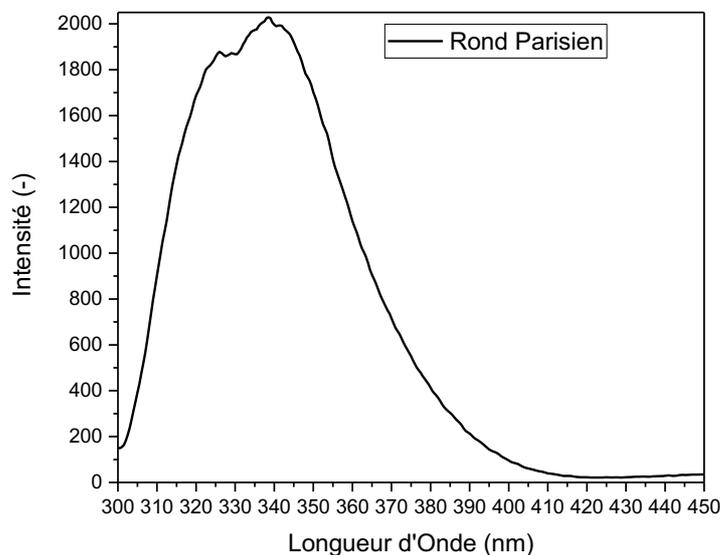


Figure 40 : Exemple de spectre d'émission de fluorescence obtenu pour la matrice "rond parisien" en fonction du degré de cuisson suite à une excitation à 291 nm.

L'analyse des spectres a été réalisée en utilisant le logiciel OriginPro 9.2 (OriginLab Corporation, USA), en déconvoluant les spectres par l'équation *Log-Normal* (Emel'yanenko et Burshtein, 1998; Emel'yanenko et al., 2000) qui décrit la hauteur maximale du pic (I_{\max}) et la longueur d'onde à laquelle l'intensité est maximale (λ_{\max}). Cette équation prend en considération aussi d'autres paramètres qui caractérisent le pic comme : l'aire du pic, la largeur à mi-hauteur, les deux longueurs d'ondes à mi-hauteur et le paramètre d'asymétrie. L'équation (13) utilisée est la suivante :

$$y = y_0 + \frac{A}{\sqrt{2\pi} w x} e^{-\frac{[\ln \frac{x}{x_c}]^2}{2w^2}} \quad (13)$$

où, y_0 est l'offset du pic, A l'aire du pic, x_c la moyenne des données et w l'écart type. La déconvolution des spectres a été réalisée de "façon" exploratrice, en laissant l'équation détecter le nombre de bandes adéquates (deux) pour l'ensemble des échantillons. La figure 41 présente un exemple de déconvolution d'un spectre collecté en montrant le spectre collecté (noir) et les deux ajustements (lignes magenta et bleu).

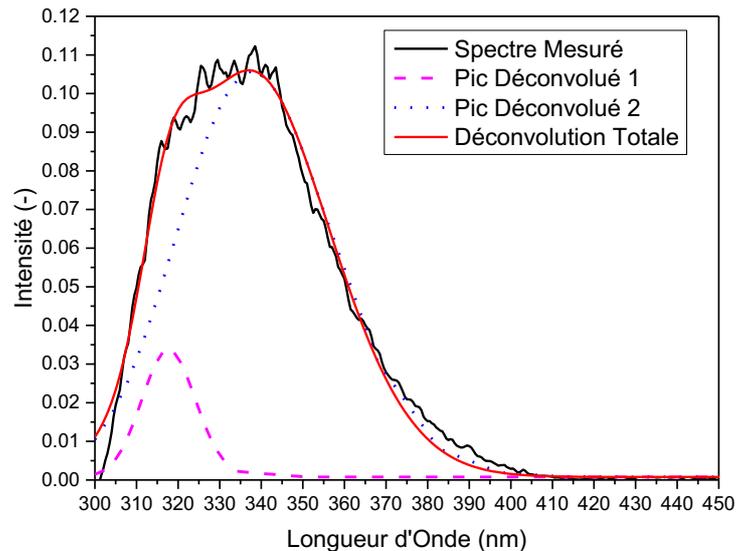


Figure 41 : Exemple de spectre d'émission de fluorescence avec les déconvolutions. Le spectre enregistré (noir) peut être décomposé en deux composantes, pic 1 (magenta, centré vers 320 nm) et pic 2 (bleu, centré vers 340 nm). La courbe rouge correspond à l'ajustement du spectre expérimental grâce à ces deux composantes.

Protocole de purification de la myosine

L'objectif de la mise au point du protocole de purification de la myosine était d'obtenir une suspension de myosine pure, concentrée et gardant sa structure native. D'une manière générale, ce protocole est bien décrit dans la littérature. Chacune des étapes de cette procédure a été optimisée (Margossian et Lowey, 1982). Nous avons utilisé un blanc de poulet obtenu juste après l'abattage. Pour simplifier, la purification peut être subdivisée en trois grandes phases clefs :

- l'extraction ;
- la suspension et la dialyse ;
- le contrôle de la concentration et de pureté.

Pendant la première phase, nous avons haché le blanc de poulet en utilisant un hachoir (Mini Hachoir, Moulinette Moulinex), pendant 20 à 25 secondes. Ensuite, 20 g de viande hachée ont été resuspendue dans le *tampon d'extraction* (rapport 1:4) à froid (4 °C). La composition de ce tampon était la suivante :

- chlorure de potassium (KCl) (Sigma-Aldrich), 300 mM ;
- dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich), 150 mM, pH 6,5 ;
- hydroxyde de potassium (KOH) (Sigma-Aldrich), en quantité suffisante pour ajuster le pH à 6,5 ;
- cofacteurs favorisant la séparation de la myosine :
 - ATP (Sigma-Aldrich), 1 mM, favorisant le détachement de la myosine de l'actine, en fournissant l'énergie nécessaire à la réaction enzymatique (ATP-phosphohydrolase) ;
 - chlorure de magnésium (MgCl₂) (Sigma-Aldrich), 5 mM, cofacteur de la réaction enzymatique d'hydrolyse ;
 - acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), sel disodique dihydraté (Sigma-Aldrich), 20 mM, éliminant les ions calcium.

Pour favoriser la rupture des parois cellulaires, pendant l'extraction de la myosine, la suspension de blanc de poulet haché était homogénéisée par l'action du politron (Janke & Kunkel Ultra-Turrax T25 Lab Mixer Homogenizer Stirrer), équipé avec un axe de dispersion de 18 mm de diamètre (S 25 N-18 G Dispersing element) pendant 20 secondes à 8000 rpm. Cette suspension était mise sous agitation pendant 15 minutes. L'homogénéisation avec le politron et l'agitation ont été réalisées dans un bain de glace afin de garder la température de l'échantillon autour de 4 °C. Nous avons ensuite ajouté de l'eau MilliQ froide (4 °C), en rapport 1:4 (v/v) et conservé la suspension pendant 3 heures à 4 °C.

L'objectif de la deuxième phase du protocole était de récupérer la myosine, en éliminant les autres protéines. Nous avons filtré l'échantillon pour enlever les gros morceaux qui se sont formés pendant l'étape de repos au réfrigérateur, en utilisant un entonnoir filtre Büchner. Le filtrat a été centrifugé à 15600 g, pendant 45 minutes, à 4 °C, (Sorvall™ RC 6 Plus Centrifuge, Thermo Scientific ; rotor Fiberlite F21-8x50y, Thermo Scientific). Nous avons séparé le culot, contenant les myofibrilles, du surnageant contenant les protéines sarcoplasmiques en utilisant une pipette pasteur. Le culot était ensuite suspendu (rapport 1:5, v/v) dans le *tampon de suspension* dont la composition est la suivante :

- chlorure de potassium (KCl), 1 M, pour favoriser la solubilisation des myofibrilles ;
- dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄), 600 mM ;
- hydroxyde de potassium (KOH), pour imposer le pH à 6,5 ;
- EDTA sel disodium dihydrate, 10 mM ;
- dithiothréitol (DTT) (Sigma-Aldrich), 10 mM, pour couper les liaisons disulfures intermoléculaires.

La suspension restait sous agitation pendant la nuit à 4 °C. Elle était alors centrifugée pour enlever les agrégats qui ne s'étaient pas resuspendus à 15600 g, pendant 45 minutes, à 4°C. Nous avons conservé le surnageant que nous avons ensuite dialysé contre le *tampon de dialyse* :

- chlorure de potassium (KCl), 600 mM ;
- dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄), 25 mM;
- hydroxyde de potassium (KOH), pour imposer le pH à 6.5 ;
- EDTA sel disodium dihydrate, 10 mM ;
- DTT, 10 mM.

Nous avons réalisé la dialyse à 4 °C et changé le tampon 3 fois. Les deux premières fois après 3 heures d'agitation, la dernière, après une nuit passée sous agitation. Nous avons utilisé une membrane (Biotech CE Membrane, SpectrumLab, 20 mm de diamètre), dont le seuil de coupure était de 100 kDa, afin d'éliminer toutes les molécules qui avaient une taille inférieure à 100 kDa. Nous avons ajouté une pointe de spatule d'azide comme conservateur de la suspension.

La dernière phase du protocole était le contrôle de la pureté, de la concentration et de la structure native. Ces vérifications ont été réalisées par électrophorèse, par chromatographie liquide haute pression en utilisant une colonne à exclusion de taille et par calorimétrie.

Électrophorèse

Nous avons réalisé des expériences d'électrophorèse pour contrôler la pureté des échantillons de myosine purifiée pendant les étapes de purification.

Pour nos contrôles, nous avons utilisé le système d'électrophorèse (SE600 Standard Dual Cooled Vertical Unit, AA Hoefer) et coulé la veille de l'analyse des gels (taille du gel : $16 \times 16 \text{ cm}^2$), à 5 % d'acrylamide et stocké à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant la nuit (ratio monomère : réticulant 526). Nous avons préparé le gel selon la séquence et le protocole suivant :

- glycérol (Sigma-Aldrich), 1,8 g ;
- tampon de Séparation, 6 mL ;
- acrylamide (40 %) (Sigma-Aldrich), 4,7 mL (0,07 mol);
- eau distillée, 24,6 mL ;
- dodécylsulfate de sodium (SDS) (10 %) (Sigma-Aldrich), 300 μL ;
- persulfate d'ammonium (5 %) (Sigma-Aldrich), 500 μL ;
- N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Sigma-Aldrich), 20 μL ($1,33 \cdot 10^{-4}$ mol).

La composition des tampons utilisés pendant l'expérience est présentée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Composition des tampons utilisés pour les expériences d'électrophorèse.

Composant	Tampon de Séparation (100 mL, pH 8,9)	Tampon de Concentration (100 mL, pH 6,8)	Tampon de Migration (5 L, pH 8,45)	Tampon de l'échantillon (50 mL)
Tris	22,7 g	6 g	15 g	/
Glycine	/	/	72,25 g	/
SDS	/	/	5 g	10 mL (solution 10%)
Tampon Concentration	/	/	/	6,25 mL
Glycérol 40 %	/	/	/	12,5 mL
Bleu de Bromophénol	/	/	/	2,5 mL
DTT	/	/	/	0 ou 1 g
H ₂ O	Porter à volume	Porter à volume	Porter à volume	Porter à volume

Les expériences ont été réalisées en déposant 30 μL d'un mélange d'échantillon (60 μL) et de tampon échantillon (190 μL). La composition du tampon échantillon est décrite dans le tableau 5. Un marqueur de masse moléculaire (Sigma-Aldrich) a été ajouté dans le premier puits de l'électrophorèse. Le voltage utilisé était de 120 V, et la migration se faisait pendant 6 heures environ.

La coloration du gel d'électrophorèse était réalisée en plusieurs étapes en utilisant le produit PageBlue (PageBlue™ Protein Staining Solution, Thermo Scientific). Le protocole était le suivant :

- lavage du gel dans de l'eau, puis passage au four à microondes pendant 60 secondes. Il faut laisser le gel sous agitation pendant 5 minutes et changer l'eau 3 fois ;
- on jette l'eau et on ajoute le colorant en couvrant le gel. Chauffer au four à microondes pendant 60 secondes. Laisser sous agitation douce pendant la nuit ;
- après avoir enlevé le colorant, il faut rincer le gel plusieurs fois avec une grande quantité d'eau, en le laissant sous agitation pendant plusieurs minutes.

Les résultats des gels d'électrophorèse de plusieurs étapes du protocole de purification sont présentés dans l'annexe 4.

Chromatographie liquide à exclusion de taille

Nous avons utilisé la chromatographie liquide à exclusion de taille pour déterminer la concentration et, plus finement, la pureté (ÅKTA FPLC W FRAC-920, GE Healthcare). Nous avons utilisé une colonne à exclusion de taille (Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare), spécifique pour séparer des molécules de grosse taille (10-600 kDa). Nous avons utilisé un flux constant de $0,70 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, afin de ne pas dépasser 12 bars de pression. Le tampon utilisé pour éluer l'échantillon était le tampon de dialyse. L'analyse a montré que la pureté de l'échantillon était d'environ 85-86 % (masse de myosine sur masse protéines extraites) et que la concentration était d'environ $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, en comparant les aires sous les pics de l'échantillon purifié par nos soins et de l'échantillon de myosine de référence acheté (Sigma-Aldrich). Les chromatogrammes enregistrés sont présentés dans l'annexe 5.

Calorimétrie

La calorimétrie (micro-DSC III, Setaram, Caluire, France) a été utilisée pour valider le protocole de purification en termes de structure native de la protéine isolée. Nous avons enregistré des thermogrammes entre 25 et 100 °C, à $0.5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. L'échantillon était mesuré contre le tampon de dialyse et avait une masse d'environ 700 mg.

Observation macroscopique de la dénaturation de la myosine

Nous avons préparé plusieurs tubes à essais en ajoutant 3 mL de suspension de myosine à une concentration de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les chauffages étaient assurés dans un bain d'huile (HBR 4 Digital Heating Bath, Ika Werke GmbH & Co. KG), dont la température était de 100 °C, pour assurer une rampe de température rapide. L'objectif était d'observer une turbidité, preuve d'agrégation, donc de dénaturation des protéines.

Spectroscopie de fluorescence

Nous avons réalisé la spectroscopie de fluorescence sur les échantillons de myosine native et chauffée. Nous avons dû diluer l'échantillon d'un facteur 5, en utilisant le tampon de dialyse, pour pouvoir nous affranchir du "quenching" lié à la concentration de l'échantillon. Nous avons utilisé le spectrofluorimètre (Luminescence Spectrometer, LS 50 B, Perkin Elmer) en mode absorbance, en excitant l'échantillon à 291 nm et en collectant l'émission de fluorescence entre 300 et 450 nm. L'objectif était d'observer les changements de l'environnement des résidus de tryptophane. Nous avons regardé l'évolution de l'intensité maximale d'émission de fluorescence (I_{max}) et la longueur d'onde à laquelle l'intensité est maximale (λ_{max}) pour rendre compte de la dénaturation de la protéine à l'échelle moléculaire.

Protocole de purification de l'hémoglobine

La purification de l'hémoglobine est réalisée à partir du sang de porc (*Sus scrofa domesticus*), récupéré à l'abattoir Harang à Houdan. Sur place, nous avons immédiatement mélangé le sang à une solution anticoagulante (rapport 5:1) composée :

- d'acide citrique $4,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fluka) ;
- de citrate de sodium $13,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich) ;
- de dextrose à $14,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich).

Ensuite, nous avons transporté le sang à 4 °C dans une glacière et purifié dès l'arrivée au laboratoire selon la méthode de Perutz (Perutz, 1968). Nous avons réalisé plusieurs lavages avec une solution de chlorure de sodium à 9 g·L⁻¹ et l'hémolyse des cellules dans l'eau MilliQ froide à 4 °C. L'ajout du tampon phosphate (2,8 M à pH 6,8) a fait précipiter les membranes cellulaires. Nous avons centrifugé la suspension pendant 30 minutes à 20000 g et dialysé le surnageant limpide quatre fois contre l'eau MilliQ à 4 °C. Le seuil de coupure de la membrane de dialyse était de 12-14 KDa (Biotech RC Membrane SpectrumLab, 20,4 mm de diamètre). À la fin, la suspension dialysée a été séparée du 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) par chromatographie sur une résine AG 501-X8 (BioRad) selon le protocole de Jelkmann (Jelkmann et Bauer, 1976) et centrifugé à 20000 g pendant 10 minutes. La solution d'hémoglobine est conservée à 4 °C pendant 15 jours.

Spectroscopie de UV-VIS

L'état de l'hémoglobine purifiée a été contrôlé par spectroscopie UV-VIS (UV-VIS Spectrophotomètre V-530, Jasco), en observant l'état d'oxydation en faisant le rapport d'absorbance des intensités aux longueurs d'ondes 576 et 541 nm, ainsi que la concentration à 576 nm. Un exemple de spectre UV-VIS d'absorbance est présenté dans l'annexe 6.

Partie 2 : Échelle microscopique

Nous avons utilisé de la viande de bœuf. Nous avons acheté des morceaux de filet (*Rond Parisien – Psoas major*) (*Bos taurus*, race charolais), préparés à la découpe par un boucher local.

Préparation des échantillons

Les échantillons ont été découpés de façon à obtenir un parallélépipède de 0,5 cm de côté et 4 cm d'hauteur. Cette géométrie a été nécessaire pour obtenir un gradient de température entre la surface de l'échantillon et son cœur.

L'échantillon a été découpé à l'aide d'une trancheuse à jambon et les épaisseurs et la hauteur ont été vérifiées à l'aide un pied à coulisse. Le porte échantillon était un tube RMN en verre de 1 cm de diamètre (513-5PP-7, 10 mm Thin Wall Precision NMR Sample Tube 7" L, 400 MHz, Wildmad).

Cuisson

Nous avons réalisé les cuissons de ces échantillons directement dans les tubes RMN en verre, en appliquant les mêmes barèmes de cuisson que ceux de la partie moléculaire, déterminés pour l'ensemble du projet Opticook. Cependant la température initiale du four a été modifiée (105 °C au lieu de 200 °C) afin que la rampe de température ne soit pas trop rapide. Ensuite, pour les échantillons Sous Cuits (SC), la température de fin d'enfournement d'échantillon était de 45 °C. Pour l'échantillon Trop Cuit (TC), la température de sortie du four était de 68 °C à cœur. Nous avons réalisé un nouveau type d'échantillon : le Trop Trop Cuit (TTC). Cet échantillon a été chauffé à 90 °C pour pousser la cuisson, donc la dénaturation des protéines et la perte en eau. Pour cela, la température du four était de 130 °C. Le suivi de la température a été réalisé en introduisant deux thermocouples à l'intérieur du porte échantillon, un à la surface et un à cœur (diamètre de 1 mm, ± 0.1 °C, Pyrosystem) (figure 42).



Figure 42 : Aspect de l'échantillon avant (a) et après (b) la cuisson. Les thermocouples ont été placés à la surface et au cœur de l'échantillon.

La figure 43 présente les gradients de température des échantillons Sous Cuit, Trop Cuit et Trop Trop Cuit.

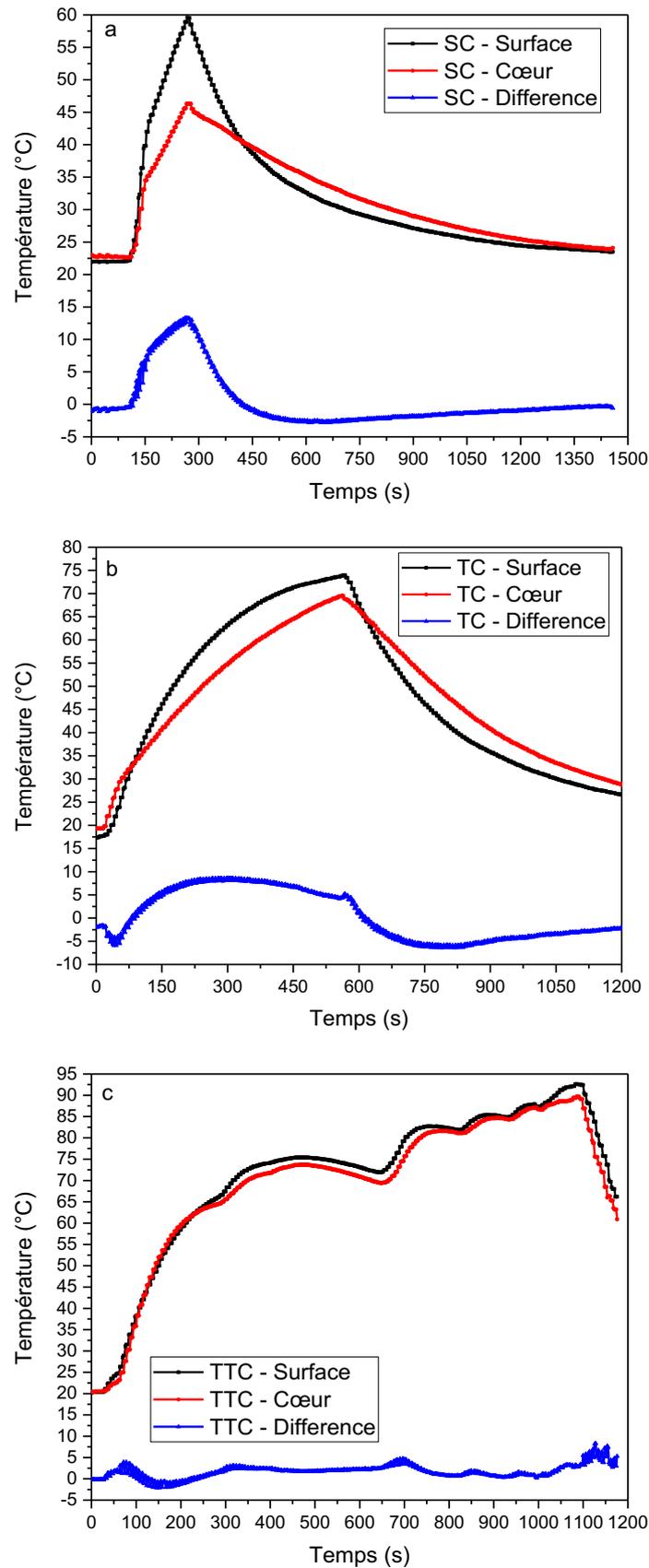


Figure 43 : Graphiques des gradients de température des échantillons : a) SC, b) TC, c) TTC. La figure met en évidence a) 10 °C de différence pour l'échantillon SC, entre la surface et le cœur ; b) 5 °C de différence pour l'échantillon TC, entre la surface et le cœur ; c) Pas de différence de température entre la surface et le cœur de l'échantillon TTC.

Teneur en eau

La teneur en eau des échantillons de viande a été mesurée par pesée après séchage à l'étuve à 104 °C pendant trois jours. 132 échantillons de masse constante ont été analysés, dont 33 par barème de cuisson. Les échantillons ont été laissés stabiliser à température ambiante pendant un jour dans un dessiccateur. Les expériences ont été faites en utilisant plusieurs morceaux de rond parisien. Cette analyse était nécessaire pour quantifier la quantité d'eau perdue suite à l'application des barèmes de cuisson.

RMN bas champ

Les expériences de RMN bas champ ont été réalisées à l'*Institut des Sciences de Matériaux de Mulhouse* (IS2M) sur un appareil MiniSpec mq20 (Bruker), équipé d'un aimant permanent de 0,47 T et d'une fréquence de précession de 20 MHz. Les expériences ont été menées à 45 °C, température de l'aimant. La préparation des échantillons pour l'analyse a été réalisée en coupant l'échantillon en petits morceaux de 0,3-0,4 mg et introduits dans des tubes RMN de 10 mm de diamètre et 180 mm de hauteur (Bruker). L'objectif était d'observer l'évolution des composantes plus et moins mobiles après la cuisson, ainsi que de caractériser les changements de structure en étudiant le coefficient de diffusion.

Séquence d'impulsions RMN en système homogène

Plusieurs séquences d'impulsions ont été utilisées dans cette étude afin de caractériser graduellement et sélectivement les différentes composantes, de la plus mobile à la plus rigide.

Séquence CPMG

La séquence CPMG ($90^\circ_{(x)} - \tau - (180^\circ_{(y)} - 2\tau)_n$) permet de caractériser la partie la plus mobile, en réalisant 32 acquisitions, avec un temps de relaxation, τ , de 500 μs , entre le pulse de 90° et de 180° ; le temps de recyclage entre une acquisition et la suivante était de 4 s. Mille échos ont été enregistrés par acquisition (Carr et Purcell, 1954; Meiboom et Gill, 1958). Le temps de recyclage est le temps de retour à l'équilibre de la magnétisation. Il a été déterminé en amont par mesure du temps de relaxation longitudinal T_1 . La figure 44 présente un exemple de courbe RMN enregistrée en utilisant la séquence CPMG.

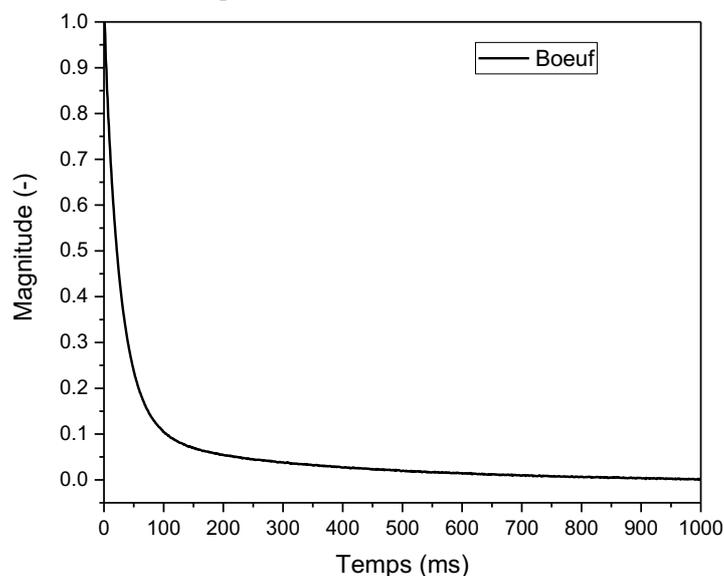


Figure 44 : Exemple de courbe RMN obtenue en utilisant la séquence CPMG (τ de 500 μs) sur un échantillon de viande de bœuf.

Les spectres obtenus par la séquence CPMG ont été ajustés par l'équation d'une exponentielle décroissante (14) en utilisant le logiciel OriginPro 9.2 (OriginLab Corporation, USA).

$$y = y_0 + \sum_i A_i \cdot e^{-\frac{x}{t_i}} \quad (14)$$

où, y_0 est l'offset, A_i est l'amplitude de la population mobile, i , considérée dans l'échantillon ; t_i est la constante de temps (T_2) de la population, i , de la fraction mobile de l'échantillon. Le choix du nombre de composantes (1, 2 ou 3) a été fait en nous appuyant sur la littérature (Bertram et al., 2001; Micklander et al., 2002; Ahmad et al., 2005; Bertram et al., 2006b; Wu et al., 2006). La figure 45 montre l'analyse d'une courbe RMN avec une exponentielle.

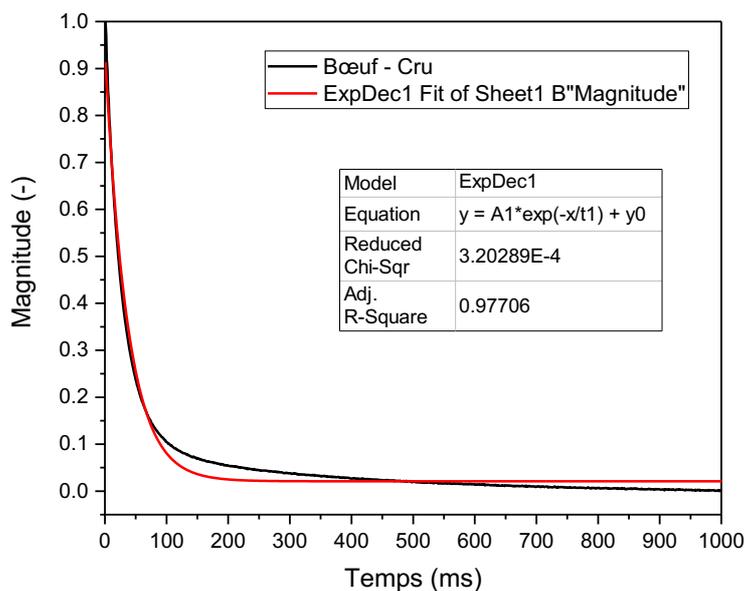


Figure 45 : Comparaison des déconvolutions des courbes RMN. Modélisation à une exponentielle décroissante. Le tableau de l'ajustement est présenté en annexe 7.

La figure 46 montre l'analyse d'une courbe RMN avec deux exponentielles.

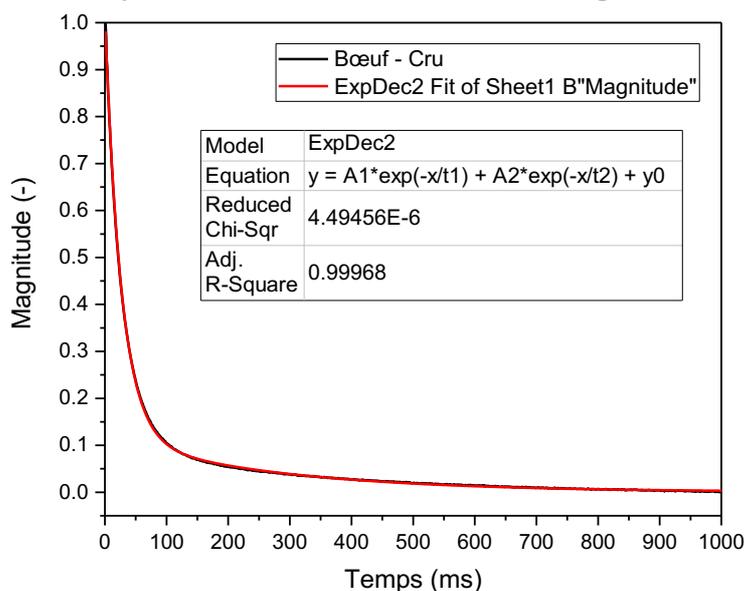


Figure 46 : Comparaison des déconvolutions des courbes RMN. Modélisation à deux exponentielles décroissantes. Le tableau de l'ajustement est présenté en annexe 7.

La figure 47 montre l'analyse d'une courbe RMN avec trois exponentielles.

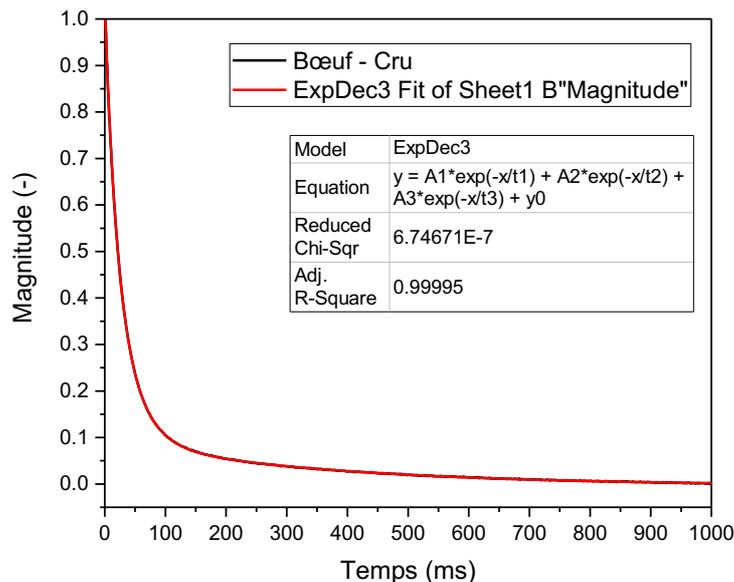


Figure 47 : Comparaison des déconvolutions des courbes RMN. Modélisation à trois exponentielles décroissantes. Le tableau de l'ajustement est présenté en annexe 7.

La figure 45 montre que l'équation à une composante exponentielle n'ajuste pas bien la courbe expérimentale. L'équation à deux composantes exponentielles (figure 46) ajuste bien la courbe expérimentale et celle avec trois exponentielles (figure 47) pas mieux que celle à deux. Il y a au moins 2 populations "statistiques" ; la troisième population de protons n'est pas très différente de la première. En effet son temps de relaxation passe de 30 ms à 20 ms. Donc, nous avons opté pour l'ajustement des courbes à deux composantes pour représenter au mieux nos échantillons en utilisant l'équation suivante (15) :

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{x}{t_2}} \quad (15)$$

Séquences de l'écho de Hahn et de l'écho de Solide

Nous avons utilisé deux autres séquences complémentaires l'une de l'autre capable d'observer les populations de protons moins mobiles : l'écho de Hahn et l'écho de Solide.

L'écho de Hahn ($90^\circ_{(x)} - \tau - 180^\circ_{(y)}$)₁ permet de caractériser la fraction de protons moins mobiles associés à la matrice, fraction intermédiaire (Hahn, 1950; Boden et Mortimer, 1973). La séquence de l'écho de Solide ($90^\circ_{(x)} - \tau - 90^\circ_{(y)}$)₁ permet, par contre, de caractériser la fraction de protons en forte interaction dipolaire, donc la fraction la moins mobile et associée à la matrice (Powles et Mansfield, 1962; Powles et Strange, 1963; Boden et Mortimer, 1973). Pour les deux séquences, nous avons utilisé les mêmes paramètres : 128 acquisitions ; la valeur de τ était de 9,5 μ s, alors que l'écho a été enregistré 9,2 μ s après le deuxième pulse (temps mort). Le temps de recyclage entre une acquisition et la suivante était de 4 s. La figure 48 présente un exemple de spectres de RMN enregistrés pour des échantillons de bœuf crus et cuits (figure 48a, écho de Hahn ; figure 48b, écho de Solide).

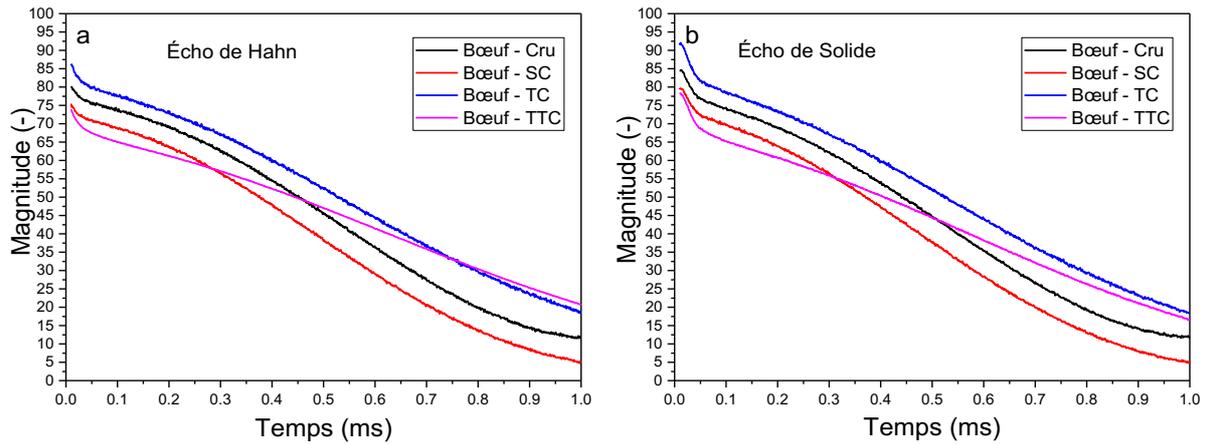


Figure 48 : Exemples de courbes RMN obtenues en utilisant la séquence des échos de Hahn (a) et de Solide (b) (τ 9.5 μ s). La courbe noire représente l'échantillon Cru, la rouge l'échantillon Sous Cuit, la bleue l'échantillon Trop Cuit, la magenta l'échantillon Trop Trop Cuit.

L'analyse des courbes a débuté par l'analyse des données obtenues avec les échos de Hahn (composante intermédiaire), puis a été suivie par celle des résultats obtenus avec les échos de Solide (composante la moins mobile) (Fujimoto et al., 1972).

Nous avons analysé les courbes obtenues avec la séquence de l'écho de Hahn en considérant la partie du spectre comprise entre 0,05 et 1 ms. La figure 49 présente la partie des courbes de l'écho de Hahn que nous avons considérée.

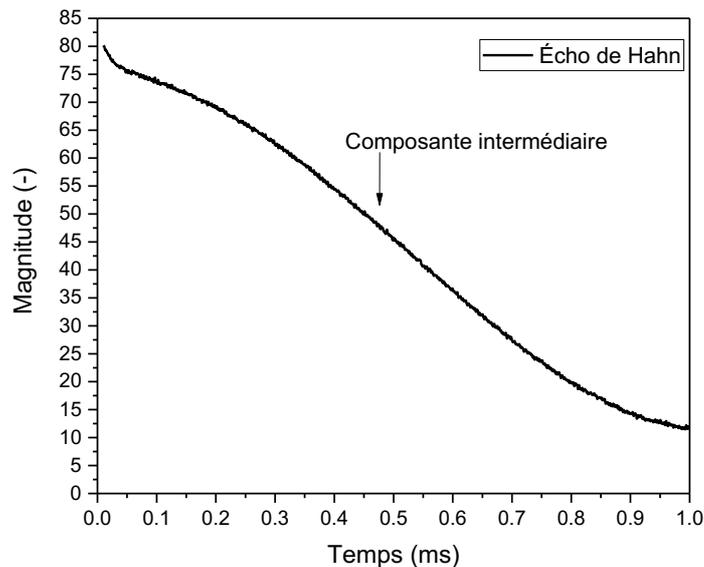


Figure 49 : Partie de la courbe de l'écho de Hahn analysée. La courbe présente une pente évidente, indiquée par la flèche et identifiée comme la composante la plus mobile (celle qui relaxe plus lentement).

L'étude de la composante intermédiaire a été faite en utilisant l'équation de Weibull (16)

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\left(\frac{x}{t_1}\right)^{b_1}} \quad (16)$$

où, b est le paramètre de forme de la courbe. Sa valeur est comprise entre 1 et 2. Lorsque le coefficient b

- à une valeur de 1, la fraction observée est plutôt mobile et peut être décrite par une fonction lorentzienne classique (17)

$$y = y_0 + \frac{hw^2}{4(x - x_c)^2 + w^2} \quad (17)$$

où, h est l'amplitude du signal, w est la largeur du pic à mi-hauteur, x_c correspond au centre du pic et x aux limites du pic, d'où on peut extraire une valeur de T_2 lorentzienne par (18)

$$T_2 = \frac{2}{w} \quad (18)$$

- est compris entre 1 et 2, alors le T_2 sera celui obtenu par l'équation de Weibull (16) corrigé du coefficient ;
- est égale à 2, la fraction observée est très rigide, et peut être décrite par une fonction gaussienne.

Après nos expériences, nous avons eu des résultats qui rentraient dans ce dernier cas. Nous avons analysé les spectres en utilisant l'équation gaussienne (19) écrite de la façon suivante :

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\left(\frac{(x-xc_1)^2}{2 \cdot w_1^2}\right)} \quad (19)$$

où, y_0 est l'offset, xc_1 correspond au centre de la gaussienne, w est la largeur du pic à mi-hauteur et A_1 est son amplitude, d'où on peut en extraire une valeur de T_2 gaussienne par :

$$T_2 = \frac{\sqrt{2}}{w} \quad (20)$$

La figure 50 montre un exemple d'ajustement de courbe opéré par l'équation de Weibull (16).

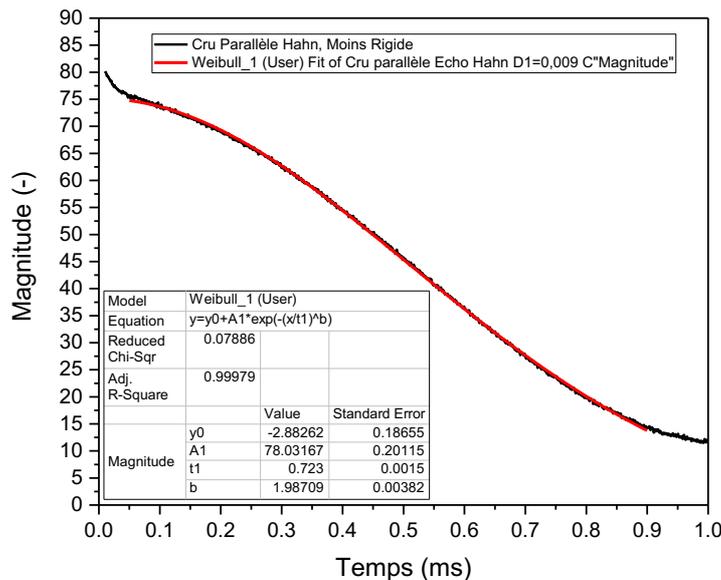


Figure 50 : Ajustement de la fraction de protons la moins rigide de l'écho de Hahn réalisé en utilisant l'équation de Weibull (16). Cet exemple met en évidence une valeur proche de 2 du paramètre de forme b , indice de rigidité de cette fraction de protons. Le tableau de l'ajustement est présenté en annexe 7.

La figure 50 montre que l'ajustement faite par l'équation de Weibull met en évidence une valeur de b proche de 2. Donc, pour décrire au mieux nos échantillons (dans le cas où nous obtenions une valeur du paramètre b proche de 2), nous avons utilisé une fonction Gaussienne (19). La figure 51 montre un exemple d'ajustement en utilisant l'équation d'une gaussienne de la fraction de protons intermédiaire mesurée par l'écho de Hahn.

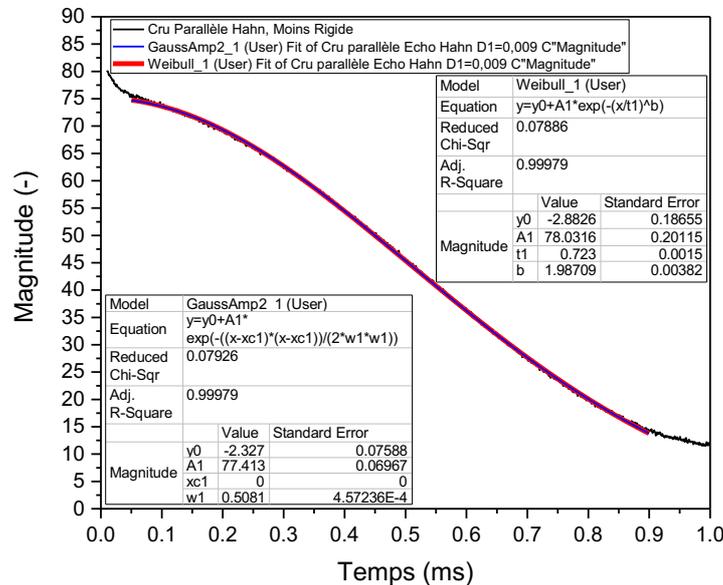


Figure 51 : Ajustement de la composante la moins rigide de l'écho de Hahn : ajustement en utilisant l'équation d'une gaussienne (bleu) qui se superpose parfaitement à l'ajustement réalisé par l'équation de Weibull (rouge). Les tableaux des ajustements sont présentés en annexe 7.

La première étape du traitement des données obtenues avec la séquence de l'écho de Solide consiste à soustraire à ces données celles obtenues avec la séquence de l'écho de Hahn. L'objectif est de suivre la petite fraction de protons en forte interaction dipolaire. La figure 52 présente un exemple de résultat de cette soustraction.

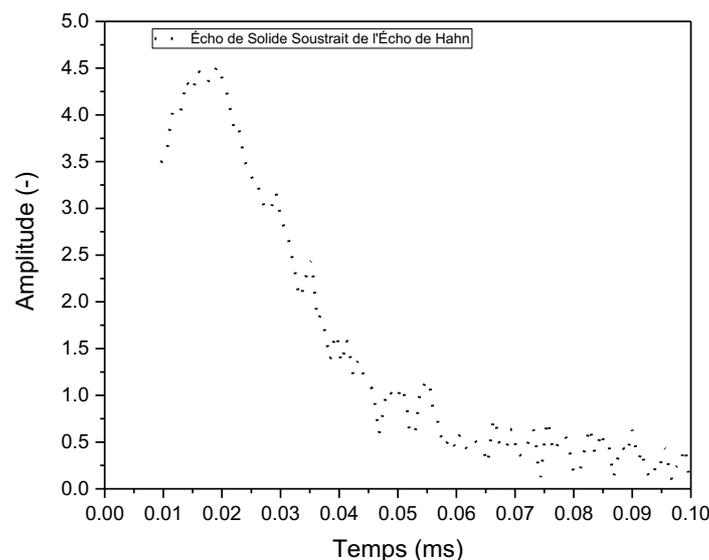


Figure 52 : Intervalle d'intérêt de l'écho de Solide. Les données ont été soustraites des composantes obtenues avec la séquence de l'écho de Hahn.

Pour étudier cette partie du spectre (entre 0 et 0,1 ms), nous avons utilisé l'équation Gaussienne (19). La figure 53 présente l'ajustement de la fraction de l'écho de Solide considéré par l'équation Gaussienne.

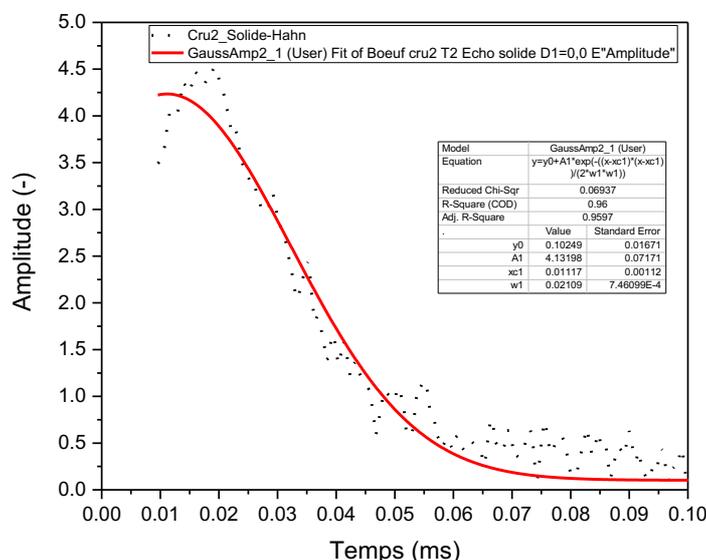


Figure 53 : Ajustement gaussien (rouge) de la fraction (0-0,1 ms) du spectre de l'écho de Solide soustrait de l'écho de Hahn correspondant à la fraction de protons en forte interaction dipolaire.

La dernière étape de l'analyse des spectres des séquences de CPMG, d'écho de Hahn et d'écho de Solide a été la quantification des protons, après calibration de l'instrument avec un tube d'eau de masse connue (0,0847 g). Nous avons normalisé les valeurs des magnitudes des échantillons en utilisant l'équation (21)

$$I_{(i)} = I_{0(i)} \cdot e^{(0,1149 \cdot G)} \quad (21)$$

où $I_{(i)}$ est l'intensité normalisée, I_0 est la valeur d'intensité mesurée et corrigée du gain utilisé, G est le gain contre lequel I sera normalisé et 0,1149 est une valeur constante qui dépend de l'appareil. La valeur d'intensité I_0 est calculée selon l'équation (22)

$$I_{0(i)} = \frac{I_{(i) \text{ mesurée}}}{e^{(0,1149 \cdot G(i))}} \quad (22)$$

où $I_{(i) \text{ mesurée}}$ et $G_{(i)}$ correspondent aux valeurs d'intensité et de gain de l'échantillon i , respectivement. Ensuite, nous avons comparé l'intensité normalisée des échantillons et l'intensité de l'eau et, puis, déterminé le nombre de moles totaux correspondant.

Nous avons estimé aussi le nombre de protons des échantillons de bœuf en considérant leur teneur en eau, en fonction du degré de cuisson. Pour cela, nous avons considéré la fraction d'eau restante dans l'échantillon déterminée après séchage en étuve.

Configuration "gradient de champ"

Les mesures de coefficient de diffusion ont été réalisées grâce au générateur de champ magnétique pulsé à gradient de $4 \text{ T} \cdot \text{m}^{-1}$ (mq-PGU4, Bruker). L'objectif était de caractériser les

changements de structure des échantillons de viande, après l'application des barèmes de cuisson, en étudiant le coefficient de diffusion. Nous avons utilisé la séquence de *Stejskal-Tanner* incluant deux champs magnétiques à gradient à l'intérieur de la séquence de Hahn : le premier, dit "de déphasage" juste avant le pulse de 180° et le deuxième dit "de rephasage" juste après.

Les paramètres de l'expérience étaient :

- intensité du gradient (G) comprise entre 5 et 75 % de la force du champ magnétique à gradient ;
- temps d'application du gradient (δ) de 0,5 ms ;
- temps de diffusion (temps entre l'application des deux gradients) (Δ) de 7,5 ms.

Trois acquisitions ont été réalisées pour chaque valeur d'intensité du gradient et l'équation (23) utilisée pour calculer le coefficient de diffusion D était la suivante :

$$\ln \frac{M}{M_0} = (\gamma G \delta)^2 - D \Delta \quad (23)$$

où, M est l'intensité du champ magnétique après l'application du gradient et M_0 est l'intensité du champ magnétique sans l'application du champ magnétique à gradient.

Tomographie de neutrons

Les expériences de tomographie neutronique ont été réalisées sur la station d'imagerie, *Imagine*, au *Laboratoire Léon Brillouin* (CEA Saclay). L'objectif était d'observer directement les modifications de structure : le changement de morphologie et les défauts associés au changement de densité des fibres. Cette station est implantée sur le guide à neutrons froids G3bis. La taille du faisceau de neutrons est de 25 x 50 mm². La gamme de longueurs d'ondes du spectre de neutrons disponible s'étend de 0,3 à 2 nm. Dans la configuration usuelle, l'ouverture de la source est de 20 mm, et pour une position du détecteur à 4 m, le champ de vue est de 80 mm, avec un flux de neutrons de 2×10^7 neutrons·s⁻¹·cm⁻². Au niveau de la détection, une caméra est couplée à un scintillateur au lithium de 100 μm d'épaisseur. Pour ces expériences, il a été nécessaire de remplacer le tube en verre par un tube en aluminium (diamètre d'un centimètre) pour réduire l'absorption des neutrons par ce porte échantillon.

L'échantillon était positionné à cinq centimètre du scintillateur sur une table tournante, qui permettait de tourner l'échantillon de 0° à 180°, par pas de 1° par image. L'acquisition d'une image se faisait après 30 s d'exposition au faisceau de neutrons. La durée d'une expérience était d'environ 3h à 3h30. Le logiciel utilisé pour piloter les expériences était le logiciel Pingouin développé au *Laboratoire Léon Brillouin*. Il permettait de régler la hauteur de la table tournante pour permettre de positionner l'échantillon au centre du champ de vue de la caméra.

La caméra utilisée était de type Neo 5.5 sCMOS (Andor, Oxford Instrument). Elle est équipée d'une puce sCMOS de 16,6 x 14,0 mm² de taille, 2560 x 2160 px² (5,5 Mpx). La résolution d'un pixel est donc de 6,5 μm. Pour réduire le bruit de fond, la température de la caméra était de -30 °C. Les images sont enregistrées en 32 bits en format *fits*. La caméra est équipée d'un objectif de 35 mm (Canon EF 35 mm f/2.0 IS USM). À la fin de chaque expérience, 180 images ont été enregistrées. En plus, 10 images de bruit de fond électronique (caméra allumée mais faisceau de neutrons fermé) et 10 images du faisceau blanc ont été capturées.

Traitements des données de tomographie de neutrons

Le traitement des données a été réalisé en utilisant un ordinateur capable de gérer les représentations graphiques en trois dimensions avec les composantes suivantes :

- processeur Intel i5-quad cores, 3,40 GHz ;
- ram 32 GB ;
- carte graphique discrète NVIDIA GeForce GTX970 ;
- mémoire SSD.

Toutes les images acquises ont été filtrées, préliminairement, avec ImageJ 1.48 (NIH, USA) avec les commandes *despeckle* et *remove outliers* afin d'éliminer les pixels morts de la caméra (rayon de 2 px ; seuillage 50 ; *outliers bright*). Les images étaient converties en format 16 bits et sauvegardées en format *tiff*.

Reconstruction des images 3D

Les images 3D ont été reconstruites grâce au logiciel Octopus 8.7 (Octopus Imaging, Inside Matters, Belgique) avec un traitement en plusieurs étapes. Après l'importation des données en format *tiff*, les images ont été :

- rognées, en sélectionnant la région des images occupée par l'échantillon, pour en réduire la taille ;
- filtrées, en appliquant les paramètres du filtre par défaut (méthode normale, niveau 10), pour améliorer la qualité des images ;
- normalisées par rapport au bruit de fond et au faisceau vide ;
- normalisées par rapport à une partie de l'image où les neutrons ne tapent pas contre l'échantillon, pour enlever les variations d'intensité du faisceau ; pendant cette étape, un filtre est appliqué pour enlever les artefacts en forme d'anneaux qui sont dus à des effets de diffusion.

Ensuite,

- la correction de l'angle d'inclinaison de l'échantillon est réalisée, pour corriger le défaut d'alignement du plan du détecteur par rapport à l'axe de rotation de l'échantillon ;
- les sinogrammes, projection 2D des coefficients d'atténuation de tous les angles d'une tranche, ont été construits.

La dernière étape a été la reconstruction 3D. Nous avons choisi le module "*parallel beam*" où nous avons inséré plusieurs paramètres pour améliorer la qualité de l'image 3D reconstruite :

- sélection de la région d'intérêt pour réduire la taille de l'image ;
- filtrage pour enlever le bruit de fond (80 %, avec un filtre régulier) ;
- filtrage pour enlever les artefacts en forme d'anneaux (largeur maximal 20 px)
- enregistrement en 16 bits des valeurs d'intensité entre 0 et 1.

Analyse des images 3D reconstruites

Nous avons utilisé le logiciel Avizo Fire 8.1.1 (FEI, Hillsboro, Oregon USA) et plus particulièrement le module "*Porosities Analysis Wizard*" pour caractériser la morphologie et les défauts qui se forment lors de la cuisson dans l'échantillon. Ce module propose un traitement des images en plusieurs étapes :

- la sélection du seuil de détection de l'échantillon sur lequel poursuivre l'analyse. Nous avons construit un masque pour sélectionner tout ce qu'il y a à l'intérieur du tube en

aluminium : l'échantillon et l'espace vide laissé par l'échantillon à cause de la cuisson. Cela a au final concerné tous les pixels compris entre 0 et 255 ;

- la sélection du seuil de détection des gros défauts, donc des défauts externes, entre l'échantillon et le porte échantillon, réalisée en agissant sur les niveaux d'intensités des pixels ; c'est-à-dire tous les pixels compris entre 0 et 60 ;
- la sélection du seuil de détection des petits défauts. Pour cette détection, nous avons appliqué un filtre morphologique (*closing 3D*, taille 7, avec des blocs de 18 px). Ensuite, nous avons créé un masque contenant les petits défauts, à l'intérieur de l'échantillon, en sélectionnant manuellement chaque défaut ;
- la sélection du seuil de détection du matériel sans défaut, en jouant sur l'intensité des pixels (environ entre 6 et 130) ;
- la séparation des trous connectés en fonction du contraste (facteur de contraste 1, pour améliorer la séparation).

La figure 54 présente quatre exemples de reconstruction 3D d'images neutroniques des échantillons Cru (a), Sous Cuit (b), Trop Cuit (c) et Trop Trop Cuit (d).

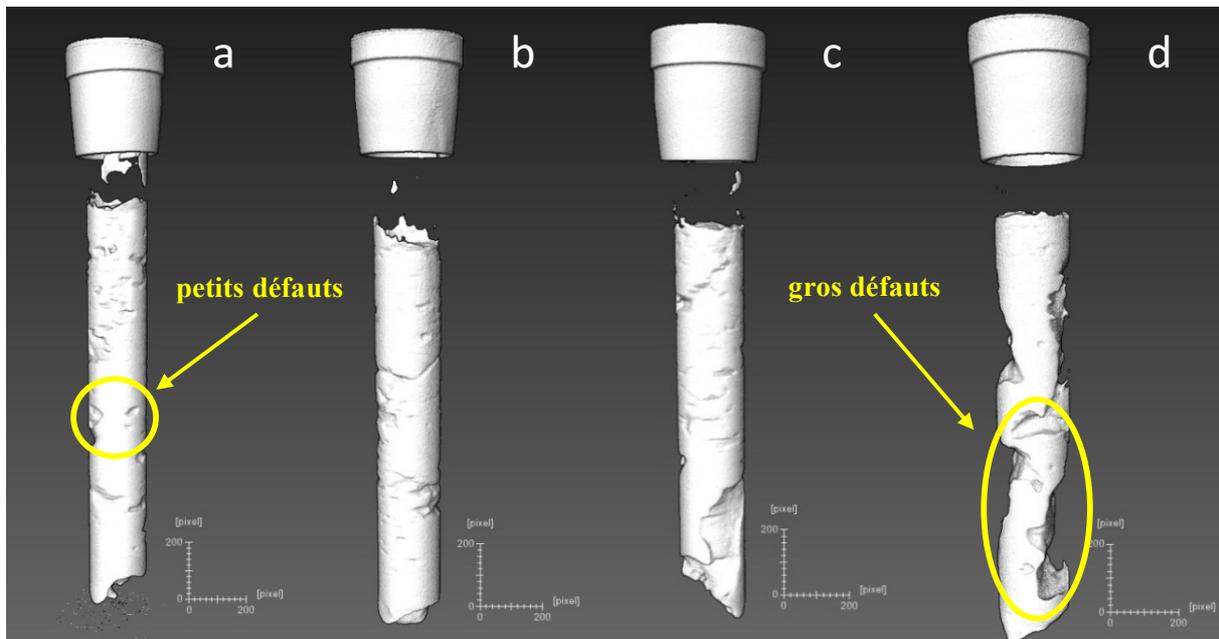


Figure 54 : Reconstruction 3D d'images obtenues par tomographie de neutrons. a) échantillon Cru, b) échantillon Sous Cuit, c) échantillon Trop Cuit, d) échantillon Trop Trop Cuit.

À la fin de la procédure guidée, ce logiciel produit un tableau résumant les caractéristiques des défauts, comme le volume (px^3) et la position du défaut.

Nous avons d'abord analysé l'évolution de la morphologie des échantillons en fonction du degré de cuisson. Nous avons calculé le volume (px^3) de l'échantillon en estimant son rayon et sa hauteur. Pour "corriger" le fait que le morceau de viande n'était pas un cylindre parfait, nous avons moyenné six diamètres et six hauteurs. Ensuite, pour estimer le volume de l'échantillon occupé par les défauts (internes et externes) nous avons fait le ratio entre la somme des volumes occupés par les défauts et le volume de l'échantillon estimé.

Pour aller plus loin dans l'analyse des défauts, nous avons essayé de déterminer la taille des défauts dans l'échantillon. Nous avons choisi le seuil 0,075 % v/v (volume du défaut par rapport au volume total de l'échantillon). Cette valeur de seuil a été choisie après avoir classé les données entre 0 et 2 % (v/v), en observant que des changements importants se passent entre 0,05 et 1 % (v/v). Donc, à partir de ce seuil, nous avons classifié les défauts en gros ($>0,075$ %) et petits ($<0,075$ %).

Ensuite, nous avons reparti ces défauts, gros et petits, en fonction de la position. Pour faire cette classification, nous nous sommes basé sur les données produit par AVIZO indiquant les coordonnées (x, y et z) des défauts.

Partie 3 : Couplage, suivi microscopique-analyse moléculaire

Échantillons

Nous avons utilisé de la viande de bœuf. Nous avons acheté des morceaux de filet (*Rond Parisien - Psoas major*) (*Bos taurus*, race charolais), préparés à la découpe par un boucher local. Nous avons aussi utilisé des blancs de poulet (*Gallus gallus*), que nous avons acheté dans des barquettes au supermarché. L'objectif est de réaliser des mesures capables d'observer le même échantillon de viande à plusieurs échelles en même temps et de les réaliser au cours de la cuisson dans le four Opticook.

Préparation des échantillons

Les échantillons ont été coupés en fines tranches de 1 à 4 mm, en utilisant une trancheuse à jambon. L'épaisseur des tranches a été vérifiée grâce à un pied à coulisse, en réalisant plusieurs mesures sur la même tranche. Le porte échantillon adapté pour les mesures d'imagerie a été développé au *Laboratoire Léon Brillouin*. Il s'agissait d'une cellule en aluminium de 5 x 3 cm de hauteur et de longueur. Son épaisseur était de 5 mm. Nous avons découpé les échantillons de façon transversale et parallèle par rapport à la direction des fibres.

Porte échantillon adapté pour les mesures couplées dans le four Opticook

Pour réaliser le couplage entre l'imagerie de neutrons et la spectroscopie, en cuisant les échantillons dans le four Opticook, nous avons apporté quelques modifications au four. Nous avons enlevé le capot et la laine de verre, pour approcher le four le plus près possible du scintillateur pour limiter la perte en résolution (figure 55b).

Le porte échantillon adapté aux mesures dans le four et au couplage a été conçu et réalisé *au Laboratoire Léon Brillouin*, par Arnaud Hélyary (technicien en charge de la station d'imagerie). Il est constitué par deux plaques en aluminium (transparent aux neutrons), séparées entre elles par deux écarteurs de plusieurs épaisseurs (2, 3 et 4 mm). La taille de la cellule est de 10 cm de hauteur et 6 cm de largeur. La cellule est équipée de deux pieds qui permettent de la positionner sur le plateau de cuisson présent dans le four. Deux hublots en quartz (transparent aux neutrons) sont insérés au haut de la cellule pour les mesures spectroscopiques (figure 55a).

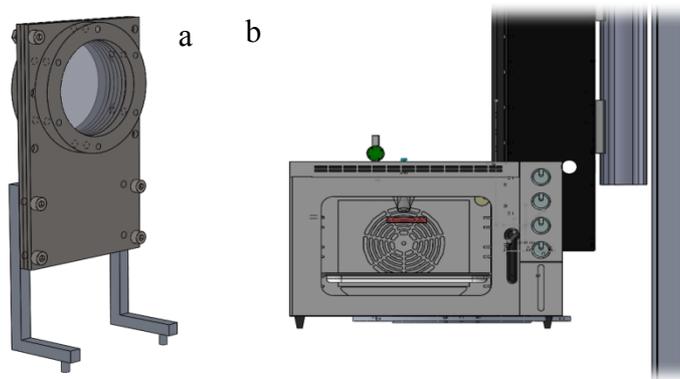


Figure 55 : Représentation graphique 3D (SolidWorks) du porte échantillon (a) et du positionnement du four Opticook à côté de la camera (la boîte noire) (b).

La figure 56 présente la position de l'échantillon à l'intérieur du four Opticook.

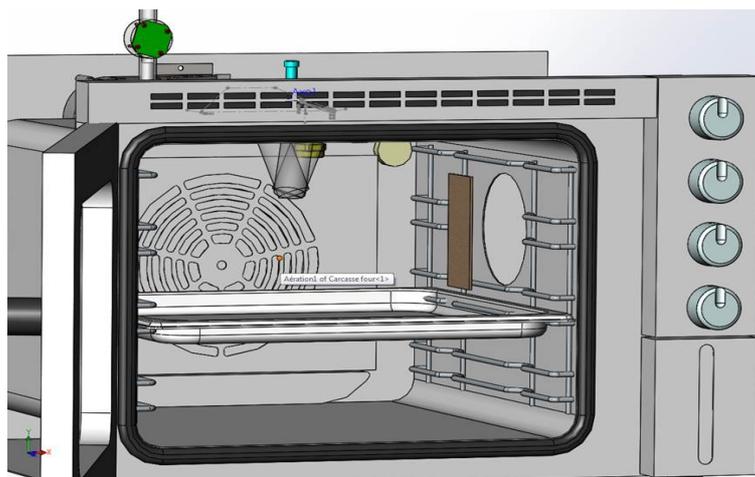


Figure 56 : Représentation graphique 3D (SolidWorks) de la position de l'échantillon pendant les mesures couplées (spectroscopie et imagerie) dans le four Opticook.

Couplage Four Opticook-Spectroscopies

Pour la partie spectroscopie, nous avons collaboré avec l'équipe *FEMTO-ST* de Besançon, partenaire du projet OFS, qui nous a fourni un spectrophotomètre prototype (lot 10 du projet Opticook).

Le système, entièrement portable, était composé par :

- une source laser excitant à 405 nm pour les expériences de spectroscopie de fluorescence (ULN Laser Diode Controller, LDC 201C, ± 100 mA, Thorlabs) ;
- une lampe halogène pour les mesures dans le visible (HL-2000, Ocean Optics) ;
- une fibre optique placée à l'extérieur du four, qui permet à la fois d'envoyer le rayonnement d'excitation et de collecter le rayonnement d'émission vers le spectromètre (M19L01 – $\varnothing 200$ μm , 0.22 NA, SMA-SMA Solarization-Resistant Patch Cable, 1 m, Thorlabs) ;
- une fibre métallique de 0,5 cm de diamètre, longue de deux mètres, qui contient sept fibres optiques de 400 μm de diamètre et résistante aux hautes températures, jusqu'à 500 °C et qui était introduite dans le four (FCR-7UV400-C-2-ME-HTX, Aventes Enlightening Spectroscopy) ;
- un spectromètre (USB4000 UV-VIS, Ocean Optics) qui analyse le signal émis par l'échantillon. La figure 57 présente le schéma du spectrophotomètre.

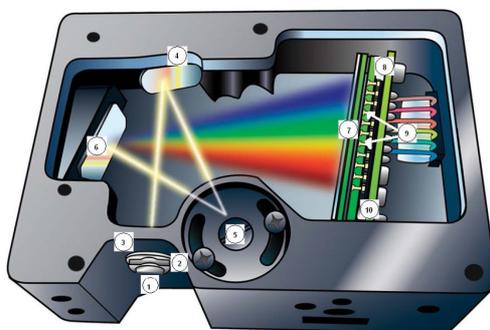


Figure 57 : Microspectromètre (USB4000, Ocean Optics) composé par (1) l'entrée de la fibre optique, (4) et (6) deux miroirs qui dirigent le signal vers le prisme (5) et puis vers le détecteur (6), une puce CCD, où un pixel correspond à une longueur d'onde.

Pour les expériences de fluorescence, deux filtres optiques ont été utilisés. Le premier permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation 405 ± 10 nm (405/10 nm BrightLine® single-band bandpass filter, FF01-405/10, Semrock). Le deuxième est un filtre "passe haut" à 430 nm nécessaire pour éliminer le rayonnement de la source (430 nm blocking edge BrightLine® long-pass filter, FF01-430/LP-25, Semrock). La figure 58 présente l'ensemble du dispositif utilisé pendant les expériences de spectroscopies dans le four Opticook.

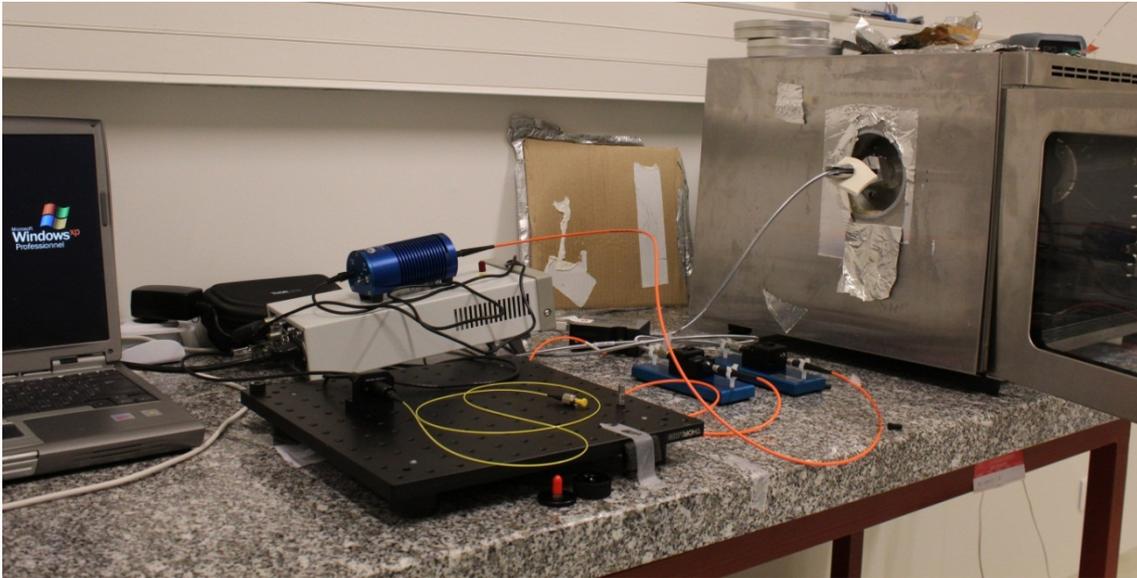


Figure 58 : Équipements utilisés pour les expériences de spectroscopie de fluorescence et visible. On peut voir sur cette photographie : l'ordinateur qui pilote le logiciel d'acquisition des spectres ; la source de lumière blanche (l'objet cylindrique bleu), le générateur du laser à 405 nm (sous cette lampe) ; les fibres optiques dédiées aux mesures de fluorescence (jaune et orange) et aux mesures dans le four (fibres incluses dans une gaine métallique) pour les deux configurations (fluorescence et visible) ; les filtres optiques ; le spectromètre (USB4000 UV-VIS, Ocean Optics) qui est branché à l'ordinateur via un port USB.

Nous avons découpé des tranches de poulet de 2 mm d'épaisseur pour les mesures de spectroscopie de fluorescence. Nous avons excité l'échantillon à 405 nm pour suivre l'évolution du tissu conjonctif, en collectant la fluorescence émise entre 437 et 900 nm (limites inférieures et supérieures du spectromètre).

Pour la configuration dans le visible, nous avons utilisé des tranches de rond parisien de 2 mm d'épaisseur. Les expériences ont été réalisées en collectant des spectres de réflexion entre 400 et 900 nm. Dans les deux cas, la température du four était de 130 °C et les cuissons démarraient à four froid.

Couplage Four Opticook-Imagerie de Neutrons

Mesures préliminaires : cuissons offline et en ligne.

Dans le cas des cuissons offline, les échantillons ont été cuits dans la cellule en aluminium et dans le four Opticook à plusieurs températures finales à cœur : 45, 52, 68, 90 et 100 °C. La température à cœur a été mesurée par un thermocouple introduit dans l'échantillon avant le début de la cuisson (type K, diamètre de 1 mm, ± 0.1 °C, Pyrosystem), et les données enregistrées par un thermomètre *datalogger* (Temp300, Thermo Scientific) (figure 59).

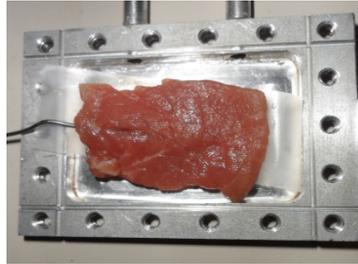


Figure 59 : Photographie d'un échantillon de viande de bœuf dans le porte échantillon en aluminium. La taille de l'échantillon était de 5 cm x 3 cm et de 2 mm d'épaisseur. Une sonde de température était placée dans l'échantillon pour suivre la température de cuisson.

Après la cuisson, l'échantillon a été laissé pendant quelques minutes à l'air ambiant afin de diminuer sa température. L'échantillon a ensuite été placé devant le faisceau de neutrons pour collecter les images.

Dans le cas de la cuisson en ligne, un four modèle a été utilisé (figure 60). Cette enceinte en acier a été conçue *au Laboratoire Léon Brillouin* pour un autre instrument (réflectomètre PRISM). Elle est équipée avec des fenêtres en quartz sur les côtés, une plaque chauffante en platine qui permettait d'avoir une vitesse de chauffage de $2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 30 à 106 °C. Un deuxième capteur de température a été utilisé et placé à l'extérieur du porte échantillon, sur sa partie haute.



Figure 60 : Photographie du four modèle utilisé pour le premier essai de cuisson en ligne, couplé avec l'imagerie de neutrons.

Les expériences d'imagerie ont été réalisées sur la station d'imagerie, *Imagine*, du Laboratoire Léon Brillouin (UMR12, CEA-CNRS). La station est localisée dans le hall de guide du réacteur *Orphée*, sur une guide de neutron froid, en utilisant tout le spectre de neutrons disponible qui va de 0,3 à 2 nm. La taille du guide est d'environ $25 \times 50\text{ mm}^2$. Nous avons utilisé la configuration classique de l'instrument : champ de vue de 80 mm, diamètre de la source de 20 mm, et la distance entre le collimateur et l'échantillon (L) était de 4 m. Le flux de neutron était de $2 \times 10^7\text{ neutrons s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Pour les premières expériences d'imagerie de neutrons, nous avons utilisé une caméra équipée d'une puce sCMOS (2k x 2k sCMOS GEV Camera, Photonics Science). La résolution spatiale était d'environ $40\text{ }\mu\text{m}\cdot\text{px}^{-1}$. La taille de l'image était de $2048 \times 2048\text{ px}^2$. Cette caméra a été

utilisée pour les expériences de cuisson offline et pour l'expérience de cuisson en ligne dans le four modèle. Cette caméra était couplée avec un scintillateur en lithium de 100 μm d'épaisseur. L'échantillon était posé sur une table qui peut supporter jusqu'à 100 kg et qui permet d'ajuster la position de l'échantillon, vers le haut ou vers le bas et le faire tourner de 360°.

Pour les mesures offline, l'échantillon était positionné le plus près possible du scintillateur, pour gagner le plus possible en résolution. Une image capturée a été la moyenne de 10 scans et chaque scan avait une durée de 3 secondes. Au final, l'échantillon a été exposé pendant 30 secondes aux neutrons pour collecter une image.

Pour les mesures online, l'échantillon était placé à l'intérieur du four donc à environ 20 cm du scintillateur (figure 61). L'échantillon était alors exposé aux neutrons avec des scans d'une seconde. Pour améliorer le rapport signal/bruit, une image était la moyenne de 120 scans.

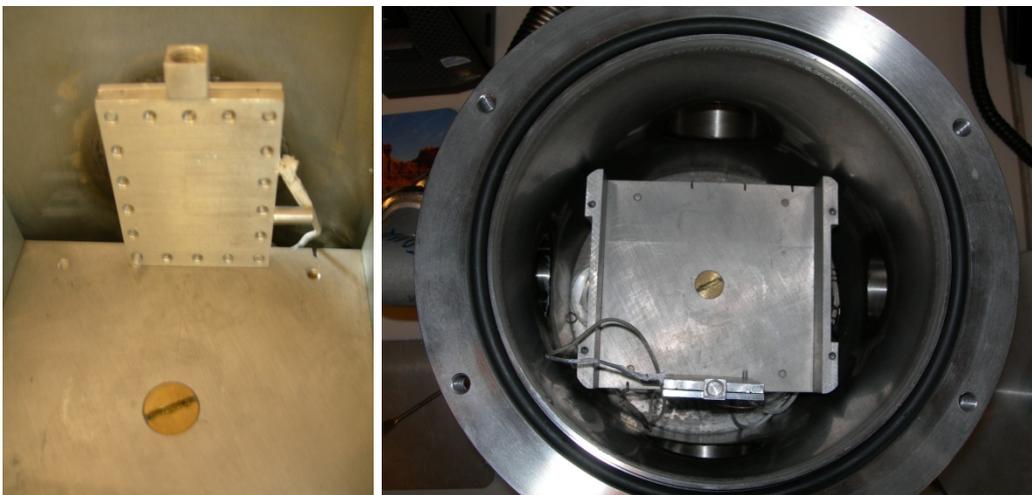


Figure 61 : Four modèle : vision intérieure de l'enceinte et positionnement de l'échantillon. L'échantillon était debout sur le bord de la plaque chauffante en platine, le plus près possible du détecteur.

Pour les deux expériences, le bruit électronique (dc), ainsi que le faisceau blanc ont été mesurés au début de toutes les séries de mesures expérimentales. Les images du bruit électronique ont été soustraites aux images de l'échantillon (I) et du faisceau blanc (I_0), et normalisées par le faisceau blanc corrigé, à travers l'équation de la transmittance (24).

$$T = \frac{I - dc}{I_0 - dc} \quad (24)$$

Calibration de la station d'imagerie *Imagine*

La calibration de l'instrument, *Imagine*, a été une étape importante pour déterminer l'épaisseur de l'échantillon la plus adéquate, afin de ne pas être affecté par le phénomène de diffusion multiple. Pour trouver l'épaisseur la plus adéquate, nous avons mesuré la transmittance de plusieurs épaisseurs d'eau (de 0,1 à 5 mm) dans un porte échantillon en aluminium. À partir des valeurs de transmittance enregistrées en fonction de l'épaisseur d'eau, nous avons pu estimer les paramètres de correction de la transmittance de l'échantillon réel en utilisant l'équation (25)

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{x}{\tau_1}} \quad (25)$$

Une description plus détaillée est présentée dans la chapitre 3 : *Résultat, Partie 3 : Couplage moléculaire et microscopique. Suivi de la cuisson en ligne avec le couplage de l'imagerie neutronique et de la spectroscopie.*

Traitement des images de neutrons

Le traitement des images a été réalisé avec MatLab (R2014b, MathWorks), en utilisant le module “*Image Processing*”. Pour les expériences de cuisson offline, les images normalisées ont été découpées avec la commande “*imcrop*” pour réduire leur taille. Nous avons utilisé un filtre médian 2D (*medfilt2*) (Lim, 1990) avec une fenêtre de 13 x 13 px², pour enlever les points blancs et les rayures liés aux défauts de la caméra et du faisceau de neutrons.

Ensuite, à travers l'équation de Beer-Lambert, nous avons converti les images selon l'équation (26)

$$\Sigma \cdot Z = -\ln T \quad (26)$$

où, Z (cm) est l'épaisseur du matériel et Σ (cm⁻¹) correspond au coefficient d'atténuation, paramètre intrinsèque du matériel qui décrit le degré d'atténuation de neutrons. L'atténuation est la résultante de toutes les interactions du faisceau de neutrons avec la matière (transmission, absorption et diffusion). Nous avons choisi de “corriger” l'atténuation avec l'épaisseur (donc de considérer le paramètre “Sigma*Zeta”) puisqu'elle n'est pas constante et qu'elle change après la cuisson.

Nous avons étudié les profils d'atténuation à plusieurs positions de l'image (16, 24, 32 and 48 mm). Nous avons déterminé l'évolution de la morphologie de l'échantillon en utilisant la commande “*impoly*” pour tracer son périmètre et la commande “*regionprops*” pour en calculer le nombre de pixels (figure 109).

En plus, pour l'expérience en ligne nous avons utilisé la commande “*imcontour*” qui trace des lignes (les contours) selon le niveau d'intensité sélectionné (dès 0 à 0,6, pas de 0,1) (figure 113). Pour mieux suivre l'évolution des coefficients d'atténuation en fonction de la température, nous avons pris plusieurs points sur la diagonale de l'échantillon, à la fois à son extrémité, à la fois à son intérieur. Les coordonnées de ces points sont : point 1 (35;2,12) ; point 2 (31,4;8) ; point 3 (26,56;16) ; point 4 (21,72;24) ; point 5 (18,04;29,8) ; point 6 (16,84;32) ; point 7 (12,04;40) ; point 8 (7,12;48). La figure 114 et la figure 115 et la correspondantes à ce traitement de données.

Couplage Four Opticook-Spectroscopie-Imagerie de Neutrons

Pour les mesures “couplées”, nous avons positionné le four devant le faisceau de neutrons et installé la fibre optique, en configuration visible. Pour ces expériences, nous avons utilisé la caméra de type Andor Neo sCMOS (Andor, Oxford Instrument), équipée avec une puce sCMOS de 16,6 x 14,0 mm² de taille, 2560 x 2160 px² (5,5 Mpx). La résolution de cette caméra est de 6,5 µm par pixel. Pour réduire le bruit de fond, la température de la caméra était de -30 °C et les images étaient enregistrées en 32 bits en format *fits*. La caméra est équipée avec un objectif de 35 mm (Canon EF 35mm f/2.0 IS USM).

Pour réaliser ces expériences, une image était enregistrée après trente secondes d'exposition au faisceau de neutrons (donc, une image est une moyenne de plusieurs températures). Un spectre dans le visible était enregistré toute les deux secondes (temps d'intégration du signal de 2 secondes). Un thermomètre de type *datalogger* (Temp 300, Thermo Scientific) a aussi été utilisé pour enregistrer les températures de l'échantillon (taille d'environ 10 cm de hauteur, 6 cm de largeur et 2 mm d'épaisseur) et de la cavité du four, grâce à deux thermocouples (type K, diamètre de 1 mm \pm 0,1 °C, Pyrosystem). Le boîtier enregistrait une valeur de température toutes les deux secondes, de façon à être synchronisé avec l'enregistrement des spectres dans le domaine du visible. La figure 62 présente l'ensemble du dispositif utilisé.

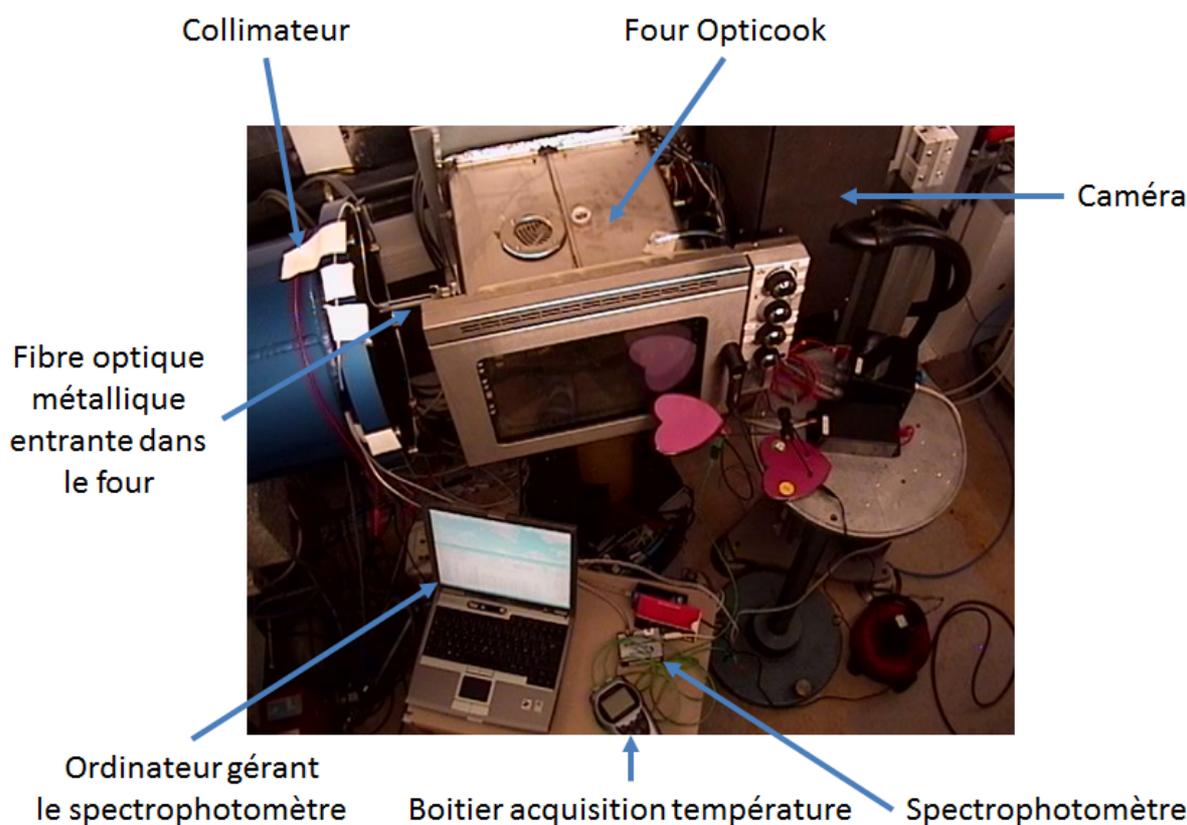


Figure 62 : Photographie présentant l'ensemble du dispositif utilisé pour les expériences de couplage. On peut voir : la fin du collimateur (tube bleu), le four et la caméra (caché dans une boîte en graphite), l'ordinateur pour piloter l'acquisition des spectres du visible, le spectromètre et la source de lumière blanche, la fibre optique métallique entrant sur le côté gauche du four et le boîtier pour l'acquisition des températures.

Les horloges de tous ces systèmes ont été synchronisées à la seconde, pour permettre une plus facile association d'une image à un spectre et à une température. Les cuissons démarraient à four froid (20 °C). La température du four était imposée à 130 °C. Les cuissons duraient environ quinze minutes (la montée de température était de 10,8 °C·min⁻¹).

Traitement des données de spectroscopie

Pour le traitement des spectres obtenus en spectroscopie de visible, nous avons utilisé une routine écrite sous MatLab (2014b MathWorks) par Olivier Gaiffe de l'institut *FEMTO-ST* (*Besançon*), partenaire du projet Opticook.

La routine nous a permis :

- de lisser les spectres ;
- de normaliser les spectres ;
- de calculer et exporter le ratio (en fonction du temps) entre les intensités à 544 et 580 nm représentatives des oxy-hémoprotéines.

Pour les spectres de fluorescence, nous avons observé l'évolution du pic de fluorescence, à 506 nm en fonction de la température, après avoir excité à 405 nm.

Traitement des images de neutrons

Pour le traitement des spectres obtenus avec les neutrons, nous avons élaboré plusieurs routines sous MatLab (2014b MathWorks) en collaboration avec Jean-Christophe et Hassina Bilheux du centre de neutronique d'Oak Ridge (*Oak Ridge National Laboratory*, Tennessee, USA).

Les routines ont été subdivisées en trois parties :

- normalisation des images neutroniques, en accord avec l'équation (24) ;
- affinages des images ;
- conversion des images en valeur Sigma*Zeta, selon l'équation (26) ;
- analyse.

Dans la deuxième partie du script, les images ont été :

- découpées (*imcrop*), pour ne garder que la partie relative à l'échantillon ;
- filtrées avec un filtre médian bidimensionnel (*medfilt2*) avec une fenêtre $5 \times 5 \text{ px}^2$, pour enlever les points blancs dus aux rayons gamma.

Les derniers scripts établis avec MatLab concernent les analyses de la morphologie et des niveaux d'intensité.

Dans le cas de l'analyse de la morphologie, nous avons créé un élément structurant morphologique, nécessaire pour construire un masque spécifique pour chaque image acquise ("*strel*", à forme de disque avec 10 px de rayon). Pour chaque image, nous avons créé un masque en sélectionnant toutes les valeurs inférieures à 1 (donc l'échantillon). Nous avons couplé l'élément structurant et le masque avec la commande "*imdilate*" pour remplir les trous éventuels qui sont présents dans l'image, en ajoutant des pixels à toute l'image. Ces pixels ajoutés ont presque tous été enlevés avec la commande "*squeeze*". À la fin de la procédure, le script produisait un tableau et un graphique récapitulatifs du nombre de pixels total en fonction de l'image analysée.

Pour l'analyse des intensités, nous avons utilisé une segmentation de l'image en classant les intensités en plusieurs groupes. Pour réaliser cette analyse, nous avons écrit une fonction capable de sélectionner les valeurs d'intensité de pixels, en imposant un pas de 0,2 (entre 0 et 1), donc en produisant 5 groupes. Le script était capable d'afficher les images et de produire un tableau et un graphique présentant l'évolution du nombre de pixels en fonction de l'intervalle considéré et en fonction de l'image. Ensuite, nous avons utilisé la commande "*contourf*" pour afficher les niveaux de contours de l'image analysée.

Chapitre 3

Résultats

Partie 1 : Échelle moléculaire

Signatures spectroscopiques du degré de cuisson de la viande et du poisson

L'un des objectifs du projet Opticook était d'établir des corrélations entre le degré de cuisson de la viande et du poisson et des mesures spectroscopiques. Pour aboutir à cet objectif, l'une des étapes importante était de définir des protocoles spécifiques à un degré de cuisson pour différentes matrices, protocoles communs pour tous les partenaires du consortium. Ainsi, l'ensemble des partenaires a travaillé sur plusieurs échantillons : cinq types de viande (filet de bœuf, rôti de porc et rôti de veau, blanc de poulet et cuisse de poulet) et trois types de poisson (dos de cabillaud, pavé de saumon, truite entière éviscérée). Dans les protocoles de cuisson établis par les partenaires industriels du projet (SEB pour les viandes et PFI Nouvelles Vagues pour les poissons), certaines caractéristiques des échantillons sont décrites très précisément en termes de poids, de taille, de diamètre ou de marque. Les températures des échantillons à cœur au moment de l'enfournement et à la fin de la cuisson, la température de préchauffage du four, ainsi que le mode de cuisson (vapeur ou chaleur sèche) sont aussi des paramètres donnés dans ces protocoles (voir le chapitre "matériels et méthodes").

Dans cette partie du travail de thèse, nous avons étudié trois de ces matrices, choisies en fonction de leur composition chimique : le bœuf (rond parisien), le blanc de poulet et le dos de cabillaud. Les différences de composition sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Composition chimique, moyenne, des trois matrices considérées (% sur matière humide). Les données mettent en évidence les différences en termes de composition en protéines des trois matrices. Pour ce qui concerne la teneur en myoglobine de la matrice dos de cabillaud, la valeur indiquée est celle de la Loquette d'Amérique (*Zoarces americanus*), poisson à chair blanche qui provient de l'atlantique nord comme le cabillaud.

Matrice	Bœuf	Poulet	Cabillaud	Références
Protéines Totales (%)	18-22 ^a	18-24,80 ^{b,c,d,e,f}	17,5-17,9 ^{g,h}	a) (Vega-Warner et al., 1999) b) (Jaturasitha et al., 2008) c) (Wattanachant et al., 2004) d) (Tougan et al., 2013)
Myofibrilles (%)	47,5-55,5 ^a	42,5-62 ^k	20,8-51,3 ^o	e) (Bogosavljevic-Boskovic et al., 2010) f) (Suchy et al., 2002) g) (Thorarinsdottir et al., 2002) h) (Stefansson et Hultin, 1994)
Sarcoplasmiques (%)	19,4-24,6 ^a Mb ^{ij} : 2,05-3,91 mg·g ⁻¹	33-40 ^k Mb ^l : 0,01-0,56 mg·g ⁻¹	47,2-77,7 ^o Mb ^m : 15,03 µg·g ⁻¹ (Loquette d'Amérique)	i) (Ginger et al., 1954) j) (Fleming et al., 1960) k) (Robinson, 1952) l) (Kranen et al., 1999)
Tissu Conjonctif (%)	19,9-33,1 ^a	5-17,5 ^k	1,5 ⁿ	m) (Driedzic et Stewart, 1982) n) (Kryvi et al., 1985) o) (Ironsides et Love, 1958)

Ce choix nous a permis de réaliser des mesures spectroscopiques sur des échantillons qui contenaient des teneurs voisines en protéines, mais avec des répartitions différentes des trois grandes classes de protéines. Par exemple, comme indiqué dans le tableau 6, les teneurs en myoglobine et en collagène de ces trois matrices sont très différentes.

Système complexe

Analyses préliminaires : évaluation et validation des protocoles de cuisson

Les partenaires industriels, SEB et PFI Nouvelles Vagues, ont mis en place des panels sensoriels composés de juges entraînés et qualifiés pour la dégustation de la viande et du poisson, afin de valider les protocoles de cuisson. Les descripteurs considérés pour analyser les matrices viandes appartiennent à deux catégories : l'aspect (brillant, la couleur) et la texture (fibrosité, granulosité, jutosité, tendreté). La figure 63 présente le profil sensoriel de la matrice bœuf en fonction des trois barèmes de cuisson (Sous Cuit SC, Bien Cuit BC et Trop Cuit TC).

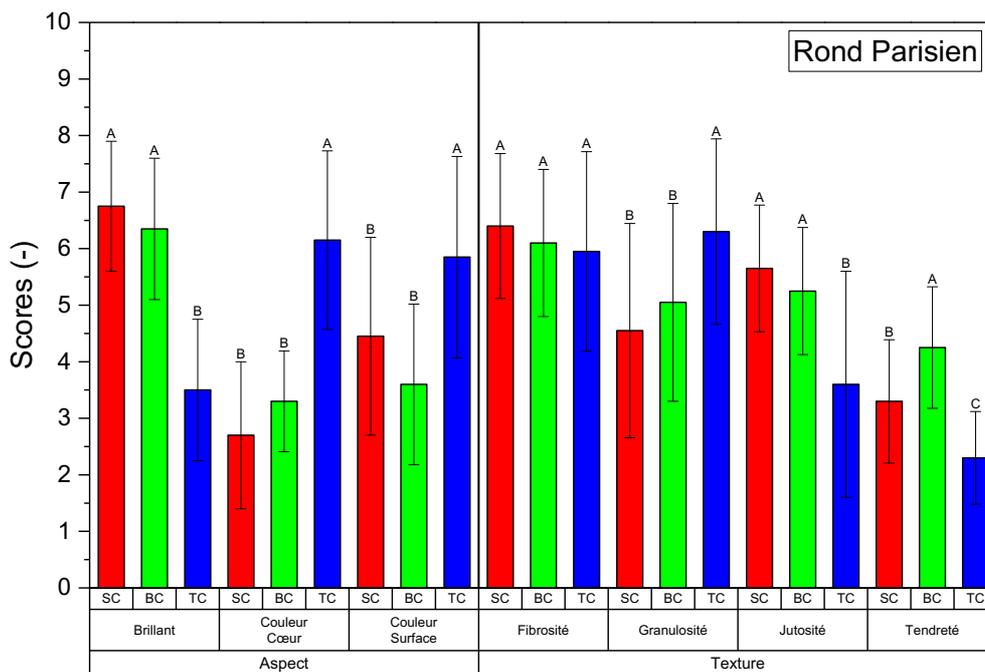


Figure 63 : Histogramme du profil sensoriel établi pour les échantillons de bœuf en fonction du degré de cuisson (Sous Cuit (SC), Bien Cuit (BC) et Trop Cuit (TC)). Les expériences ont été réalisées par SEB : un panel sensoriel composé par 15 juges qualifiés à l'analyse sensorielle de la viande a été utilisé. Deux séances ont été organisées pendant lesquelles les juges évaluaient à la fois certaines caractéristiques de l'aspect en observant l'échantillon, et certaines caractéristiques de la texture en goûtant l'échantillon. L'analyse des données a été réalisée par l'analyse de la variance à 2 facteurs (les cuissons et les juges). L'analyse a montré que le panel sensoriel est bien entraîné et performant, car les interactions (cuisson*subject) de chaque paramètre ne sont pas significativement différentes. La répartition des échantillons en groupes a été réalisée en utilisant le test *post-hoc* de Newman-Keuls. Les lettres désignent les groupes d'appartenance des échantillons (SC, BC, TC) avec un seuil de significativité de 5 %. La définition des descripteurs selon la norme ISO 5492 de 2008 (ISO 5492:2008) est la suivante :

Brillant : qualifie l'aspect d'une surface faisant apparaître des reflex lumineux ;

Couleur à cœur : changement de la couleur d'une teinte rouge à une teinte marron ;

Couleur en surface : changement de la couleur d'une teinte rouge à une teinte marron ;

Fibrosité : particules de forme allongée, orientée dans le même sens ;

Granulosité : propriété géométrique de texture qualifiant la perception de la dimension et de la forme des particules d'un produit ;

Jutosité : propriété de la texture qualifiant la perception de la quantité d'eau dégagée par un produit ;

Tendreté : propriété mécanique de texture liée à la cohésion et en relation avec la dureté d'un produit solide afin de le rendre prêt à être avalé.

Parmi les sept descripteurs d'aspect et de texture considérés, l'analyse des données a mis en évidence que la plupart sont capables d'indiquer que le degré de cuisson Trop Cuit est un barème différent (cinq sur sept). Seule la tendreté est différente pour les trois barèmes de cuisson. La tendreté est une caractéristique de la texture et elle est associée, selon la littérature

(Obuz et al., 2003), à la dénaturation des protéines myofibrillaires et du tissu conjonctif. Par rapport à l'échantillon Sous Cuit, le morceau Bien Cuit (barème atteignant 52 °C à cœur) est perçu comme plus tendre par le panel. Cela peut être attribué à la dénaturation de la myosine (pic de dénaturation observé vers 55 °C), à la réduction du diamètre des myofibrilles et au changement d'interaction entre l'eau et les protéines. À température plus élevée (barème TC, 68 °C à cœur), les protéines du tissu conjonctif (collagène) se dénaturent en générant des forces de traction qui causent la contraction longitudinale des fibres musculaires et une importante perte en eau, en réduisant la tendreté de l'échantillon de bœuf, ainsi que la jutosité et l'aspect brillant. Au niveau de l'aspect, la dénaturation des protéines sarcoplasmiques, et plus particulièrement de la myoglobine, est responsable du changement de couleur vers une teinte marron. L'analyse sensorielle de la couleur permet de mettre en évidence deux groupes d'échantillons : l'échantillon Trop Cuit est différent par rapport aux échantillons Sous Cuit et Bien Cuit, à la fois en surface et à cœur.

Les échantillons de blanc de poulet (cuisson vapeur) ont aussi été décrits par le panel sensoriel avec les mêmes descripteurs utilisés pour décrire les échantillons de bœuf. La figure 64 présente le profil sensoriel obtenu pour les trois barèmes de cuisson (Sous Cuit SC, Bien Cuit BC et Trop Cuit TC).

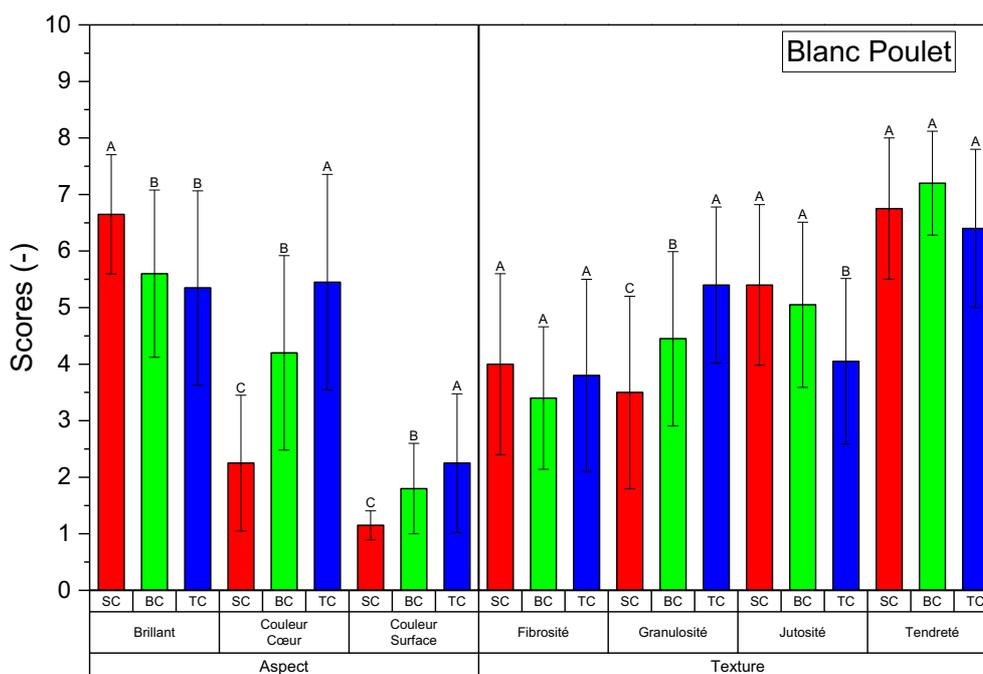


Figure 64 : Histogramme du profil sensoriel établi pour les échantillons de blanc de poulet en fonction du degré de cuisson (Sous Cuit (SC), Bien Cuit (BC) et Trop Cuit (TC)). Les expériences et le traitement des données ont été réalisés par SEB, selon les mêmes protocoles que ceux utilisés pour l'échantillon de bœuf. La définition des descripteurs, selon la norme ISO 5492 de 2008 (ISO 5492:2008), est présentée dans la légende de la figure 63.

Le profil sensoriel des échantillons de blanc de poulet montre que trois descripteurs sur sept présentent des différences significatives sur les trois degrés de cuisson : deux descripteurs qui concernent l'aspect des échantillons (à savoir la couleur en surface et à cœur) et de texture, la granulosité. En surface, la couleur change du blanc vers le beige, alors qu'à cœur elle passe de rose à blanc. Ces changements de couleur peuvent être attribués à la dénaturation de la myoglobine. La jutosité est significativement différente pour l'échantillon Trop Cuit (76 °C à

cœur), qui présente un score inférieur aux autres degrés de cuisson. La brillance est significativement plus faible pour les échantillons Bien Cuit (66 °C à cœur) et Trop Cuit. Les deux autres descripteurs de texture ne montrent pas de différences significatives entre les trois barèmes de cuisson.

Le dos de cabillaud (cuisson vapeur) a lui aussi été décrit avec des descripteurs d'aspect (friabilité et séparation des myomères) et de la texture (fermeté, adhérence, fondant, pâteux) plus adéquates à la matrice poisson. La figure 65, présente le profil sensoriel du dos de cabillaud en fonction des barèmes de cuisson (Sous Cuit SC, Bien Cuit BC et Trop Cuit TC).

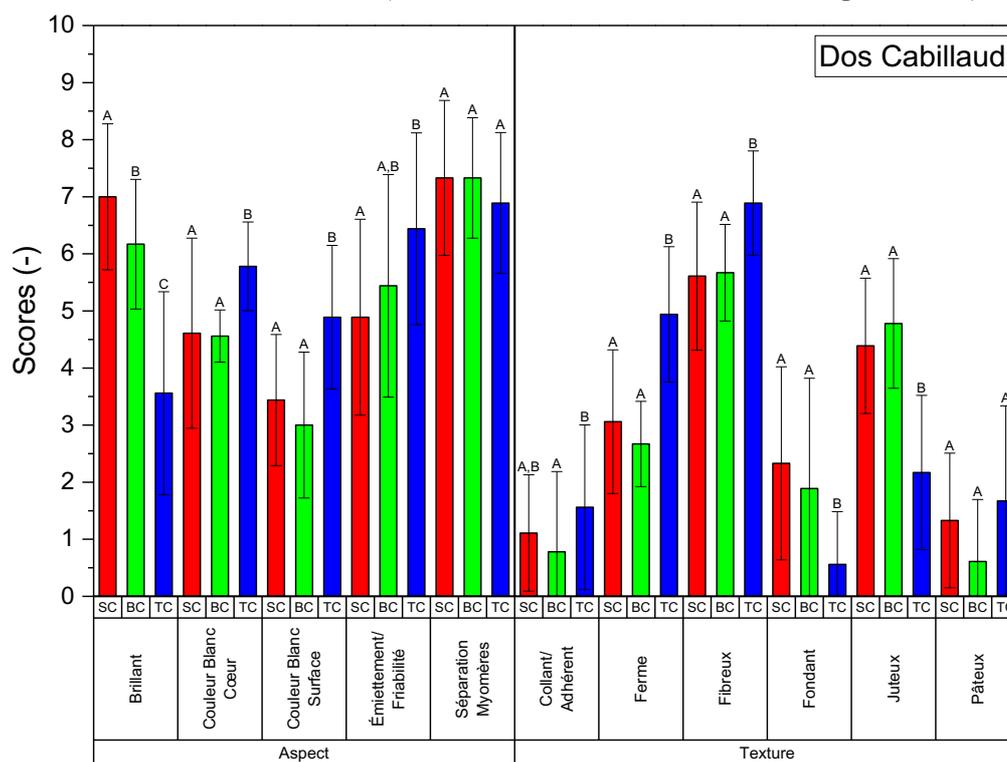


Figure 65 : Histogramme du profil sensoriel établi pour les échantillons de dos de cabillaud en fonction du degré de cuisson (Sous Cuit (SC), Bien Cuit (BC) et Trop Cuit (TC)). Les expériences ont été réalisées par PFI Nouvelles Vagues : un panel sensoriel composé par 10 juges qualifiés pour l'analyse sensorielle du poisson a été utilisé. Deux séances ont été organisées pendant lesquelles les juges évaluaient à la fois certaines caractéristiques de l'aspect en observant l'échantillon, et à la fois certaines caractéristiques de la texture en goûtant l'échantillon. L'analyse des données a été réalisée par l'analyse de la variance à 2 facteurs (les cuissons et les juges). L'analyse a montré que le panel sensoriel était bien entraîné et performant, car les interactions (cuisson*subject) de chaque paramètre ne sont pas significativement différentes. La répartition des échantillons en groupes a été réalisée en utilisant le test *post-hoc* de Fisher (LSD). Les lettres désignent les groupes d'appartenance des échantillons (SC, BC, TC) avec un seuil de significativité de 5 %. La définition des descripteurs selon la norme ISO 5492 de 2008 (ISO 5492:2008) est la suivante :

Couleur blanc à cœur : changement de la couleur de la teinte blanche ;

Couleur blanc en surface : changement de la couleur de la teinte blanche ;

Émiettement/friabilité : propriété mécanique de texture liée à la cohésion et en relation avec la force nécessaire pour qu'un produit se brise ;

Séparation des myomères : propriété mécanique de texture liée à la cohésion entre les blocs musculaires par une membrane de tissu conjonctif (myoseptes) ;

Collant/Adhérence : propriété mécanique de texture liée à la force nécessaire pour décoller des produits qui adhèrent à l'intérieur de la cavité buccale ;

Ferme : propriété mécanique de texture liée à la force nécessaire pour déformer ou pénétrer un produit ;

Fondant : propriété de la texture qualifiant la perception à la dissolution rapide dans la bouche ;

Pâteux : propriété de la texture qualifiant la perception d'une consistance molle d'une pâte, qui empâte la bouche.

Le profil sensoriel du dos de cabillaud met en évidence que le seul descripteur discriminant les trois degrés de cuisson est la brillance de la surface, qui s'atténue en augmentant la température de cuisson (de 50 à 80 °C à cœur).

La plupart des autres descripteurs sont capables de discriminer l'échantillon Trop Cuit (80 °C à cœur) des deux autres degrés de cuisson. La couleur blanche de la surface et de l'intérieur augmente avec la température de cuisson. Du côté de la texture, le phénomène de dénaturation des protéines de structure (contraction des fibres) et la modification des interactions avec l'eau (perte de jus) rendent le produit Trop Cuit plus ferme et fibreux. Le descripteur de texture "collant" présente des différences significatives entre les échantillons Bien Cuit et Trop Cuit, respectivement moins collant et plus collant. Le descripteur de l'aspect "friabilité" montre, par contre, que l'échantillon Trop Cuit s'émiette plus facilement que l'échantillon Sous Cuit. Les quatre autres descripteurs évalués par le panel sensoriel ne montrent pas de différences significatives pour les trois degrés de cuisson.

Pour compléter le panorama des mesures macroscopiques permettant de qualifier les caractéristiques des échantillons, nous avons réalisé des expériences pour mesurer leur perte en eau et leur couleur selon leur degré de cuisson. Le tableau 7 présente les données de la perte en eau des différentes matrices (rond parisien, blanc de poulet et dos de cabillaud), mesurées par différence de masse, avant et après cuisson, en fonction de la température de cuisson.

Tableau 7 : Valeurs de la perte en eau des échantillons rond parisien, blanc de poulet et dos de cabillaud en fonction du degré de cuisson déterminée par différence de masse avant et après cuisson.

Matrice	Sous Cuit (%)	Bien Cuit (%)	Trop Cuit (%)
Rond Parisien	6,15	19,13	21,27
Blanc de Poulet	4,17	10,07	12,90
Dos de Cabillaud	6,23	17,03	21,21

La perte en eau des trois matrices montre la même tendance : la perte en eau est plus importante pour les échantillons qui ont été cuits à température plus élevée. L'analyse sensorielle des trois matrices met en évidence que certaines caractéristiques organoleptiques de la texture et de l'aspect, comme la jutosité, la tendreté et la brillance, diminuent d'intensité lorsque la température de cuisson à cœur augmente. Les changements de la texture ne sont perçus que sur l'échantillon Trop Cuit, alors que les pertes importantes en eau s'observent dès le barème de cuisson Bien Cuit. Cela peut signifier que les changements de texture de l'échantillon ne sont pas complètement liés à la perte en eau mais peuvent aussi être dus à d'autres phénomènes qui se déclenchent à plusieurs températures, et qui forcent l'eau à sortir de la matrice : comme la dénaturation des protéines (Mohr et Bendall, 1969; Bouton et al., 1976; Bendall et Restall, 1983; Offer et Trinick, 1983; Rodger et Wilding, 1990; Micklander et al., 2002).

Le deuxième aspect mis en avant par le panel sensoriel est la couleur qui a aussi été suivie en utilisant un chromamètre tristimulus la décomposant en trois coordonnées spatiales, selon le standard CIE Lab* 1974 (CIE, 2004) : a^* et b^* , les coordonnées des couleurs rouge-verte et jaune-bleue ; L^* , la luminosité, placée sur l'axe z. À partir des coordonnées a^* , b^* et L^* , il est possible de déterminer d'autres paramètres :

- la teinte (h_{ab}), exprimée en degré et calculée selon l'équation (27)

$$h_{ab} = \operatorname{arccotan} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (27)$$

- la saturation (C_{ab}^*), l'intensité d'une teinte, calculée selon l'équation (28) ;

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (28)$$

- le paramètre ΔE qui décrit la différence visuelle entre deux couleurs (pas de différence, si $\Delta E < 0,2$; deux couleurs sont totalement différentes, si $\Delta E > 12$) calculée selon l'équation (29).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (29)$$

Le tableau 8 présente les valeurs des coordonnées cartésiennes Lab* mesurées à la surface et à cœur d'échantillons de rond parisien en fonction du degré de cuisson.

Tableau 8 : Valeurs des coordonnées cartésiennes mesurées selon le standard CIE-Lab* (1974) en surface et à cœur des échantillons de rond parisien. Les mesures ont été réalisées grâce à un chromamètre (Chroma Meter CR-410, Konica Minolta), juste après cuisson à la fois sur la surface et à cœur. L'expérience a été réalisée en posant l'outil sur l'échantillon et en collectant trois paramètres du standard Lab* (L, luminosité ; a*, la coordonnée couleur rouge-vert (rouge valeurs positives, vert valeurs négatives) ; b*, la coordonnée jaune-bleu (jaune valeurs positives, bleu valeurs négatives). L'expérience a été répétée une fois.

Rond Parisien	Paramètre	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
Surface	L*	50,97	42,33	62,96
	a*	13,86	8,67	8,10
	b*	13,01	13,26	18,81
Tranche	L*	52,82	53,44	70,19
	a*	24,54	27,28	15,08
	b*	13,54	13,24	13,07

Pendant la cuisson, le changement de couleur en surface est mis en évidence par le changement des valeurs de a^* et de b^* . La valeur de la couleur rouge (coordonnée a^*) diminue en passant de l'échantillon Sous Cuit à l'échantillon Bien Cuit : la surface de l'échantillon devient plus foncée, en relation aussi avec la réduction de l'indice de saturation (C_{ab}^*) (figure 66a). En augmentant la température de cuisson, l'échantillon Trop Cuit présente une augmentation de la coordonnée b^* (couleur jaune), en accord avec le changement de la teinte (h_{ab}) vers la zone des jaunes (figure 66a)

À cœur, par contre, la couleur passe de rose (Sous Cuit et Bien Cuit) à brun lorsque la température de cuisson à cœur atteint 68 °C (échantillon Trop Cuit), avec la diminution de la coordonnée a^* , de la saturation (C_{ab}^*) et le déplacement de la valeur h_{ab} vers la zone des jaunes (figure 66a). À la fois pour la tranche et pour la surface, les échantillons TC présentent des valeurs de L^* plus élevées par rapport aux autres degrés de cuisson.

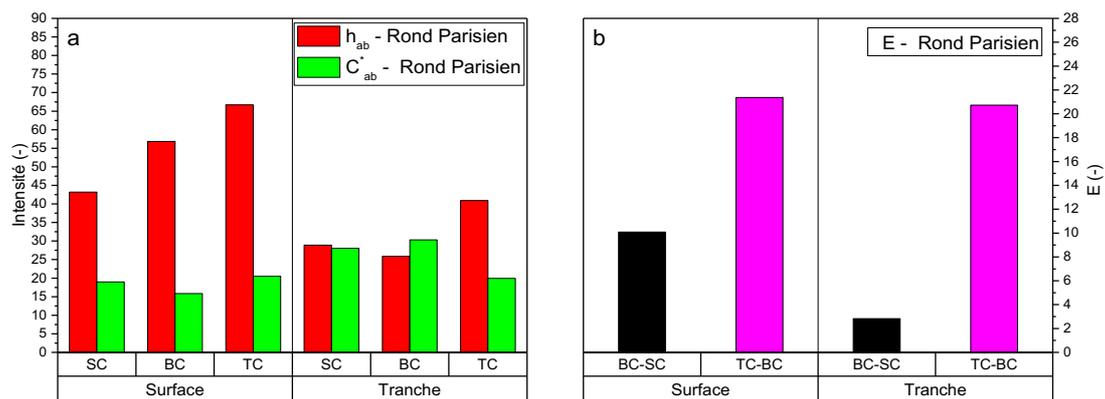


Figure 66 : Tendances des indices de teinte (h_{ab}) et de saturation (C_{ab}^*) (a) ; Différence globale de couleur (ΔE) (b) en fonction du degré de cuisson pour la matrice rond parisien.

La figure 66b montre l'évolution du paramètre ΔE en comparant les échantillons deux à deux : Sous Cuit et Bien Cuit, Bien Cuit et Trop Cuit. Le paramètre ΔE indique une variation de la couleur entre deux échantillons. La colorimétrie indique que les 3 types de cuisson ont globalement, des couleurs différentes en surface, ce qui semble en contradiction avec les résultats de l'analyse sensorielle. Au niveau de la tranche, par contre, la couleur de l'échantillon Sous Cuit et Bien Cuit est assez similaire, alors qu'entre les échantillons Bien Cuit et Trop Cuit la différence est très nette. Ces résultats de colorimétrie sont de très bons indices du changement de la couleur faisant suite à la dénaturation de la myoglobine entre les degrés de cuisson Bien Cuit et Trop Cuit, avec des températures à cœur de l'ordre de 52 et 68 °C (Hunt et al., 1999; Sen et al., 2011; Yancey et al., 2011).

Le tableau 9 présente les valeurs des coordonnées cartésiennes Lab^* mesurées à la surface et à cœur d'échantillons de blanc de poulet en fonction du degré de cuisson.

Tableau 9 : Valeurs des coordonnées cartésiennes mesurées selon le standard CIE-Lab* (1974) en surface et à cœur d'échantillons de blanc de poulet. L'expérience a été répétée une fois.

Blanc de Poulet	Paramètre	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
Surface	L^*	87,26	88,66	90,60
	a^*	1,71	3,16	3,51
	b^*	19,50	19,76	15,12
Tranche	L^*	89,61	93,41	93,16
	a^*	7,57	7,63	5,75
	b^*	25,55	21,23	14,74

La couleur à la surface du blanc de poulet présente un léger changement d'une teinte beige foncée à plus claire, en augmentant le degré de cuisson. À l'intérieur de l'échantillon, le changement de couleur est similaire à celui de surface (figure 67a).

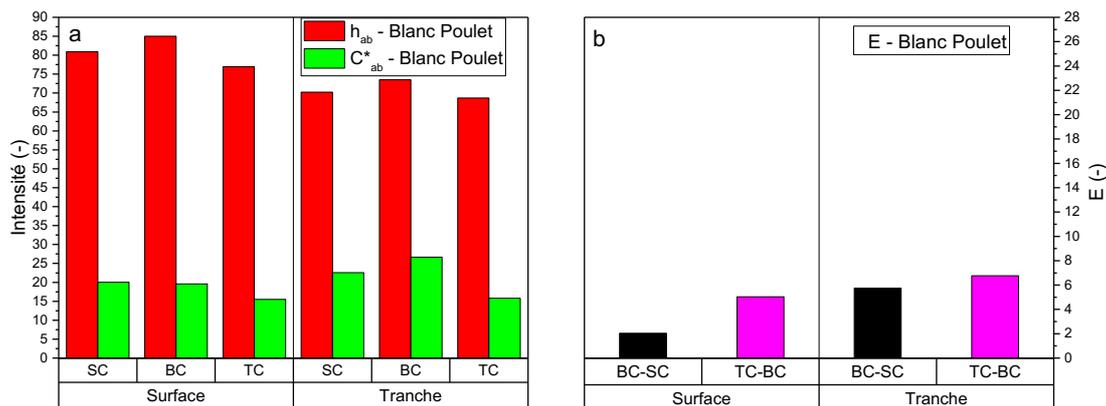


Figure 67 : Tendances des indices de teinte (h_{ab}) et de saturation (C^*_{ab}) (a) ; différence globale de couleur (ΔE) (b) en fonction du degré de cuisson pour la matrice blanc de poulet.

L'évolution globale de la couleur, paramètre ΔE (figure 67b) ne montre pas de variations importantes de couleur entre les trois degrés de cuisson. À cœur, par contre, les différences sont un peu plus nettes. Ces résultats ne sont pas en accord avec l'analyse sensorielle, puisque les juges ont détecté des différences significatives sur les trois degrés de cuisson, pour la surface et le cœur.

Le tableau 10 présente les valeurs des coordonnées cartésiennes Lab* mesurées à la surface et à cœur d'échantillons de dos de cabillaud en fonction du degré de cuisson.

Tableau 10 : Valeurs des coordonnées cartésiennes mesurées selon le standard CIE-Lab* (1974) en surface et à cœur des échantillons de dos de cabillaud. L'expérience a été répétée une fois.

Dos de Cabillaud	Paramètre	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
Surface	L*	72,25	76,29	76,78
	a*	-2,34	-2,12	-1,71
	b*	2,19	5,13	7,14
Tranche	L*	57,12	77,16	81,96
	a*	-2,11	-2,53	-1,58
	b*	-3,34	3,72	4,30

Les résultats obtenus lors des mesures de colorimétrie à la surface des échantillons de dos de cabillaud ne mettent pas en évidence de différences très importantes (indices a* et b*). À l'intérieur de la tranche, la tendance semble être la même (figure 68a).

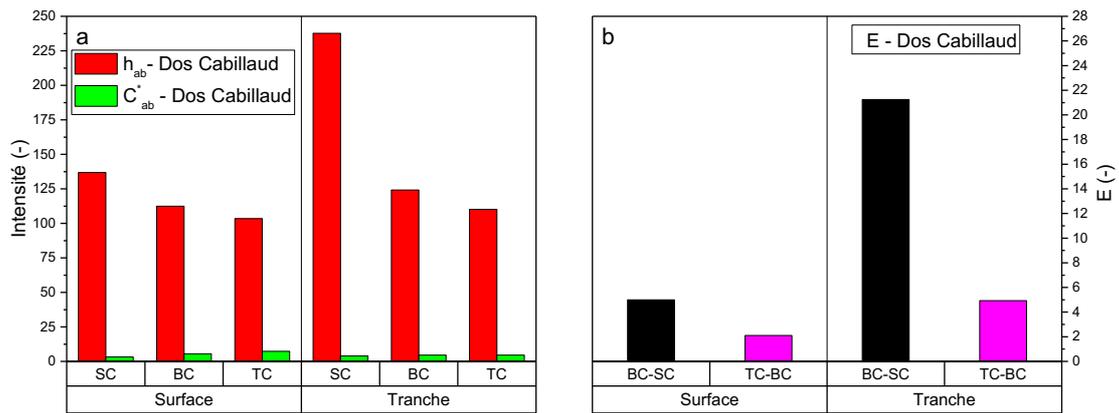


Figure 68 : Tendances des indices de teinte (h_{ab}) et saturation (C_{ab}^*) (a) ; différence globale de couleur (ΔE) (b) en fonction du degré de cuisson pour la matrice dos de cabillaud.

Globalement, en surface et à cœur, la variation de la couleur se passe entre le degré de cuisson Sous Cuit et Bien Cuit, alors qu'entre l'échantillon Bien Cuit et Trop Cuit, le changement de couleur est beaucoup moins important (figure 68b). Cette évaluation est discordante par rapport aux résultats obtenus par évaluation sensorielle qui ne montraient que des différences à partir de l'échantillon Trop Cuit.

Au regard des résultats obtenus à partir de ces analyses de colorimétrie et d'évaluation sensorielle, nous pouvons penser que les paramètres macroscopiques qui discriminent les degrés de cuisson sont associés à la dénaturation des protéines : changement de texture et changement de couleur. Nous avons donc caractérisé les niveaux de dénaturation des protéines des trois matrices selon le degré de cuisson par calorimétrie. L'objectif des expériences menées par calorimétrie était d'observer la disparition des pics endothermiques des différentes protéines du muscle suite à l'application d'un barème de cuisson. La figure 69 présente les thermogrammes de la matrice bœuf "rond parisien" cuite à cœur à 45 °C (Sous Cuit, rouge), 52 °C (Bien Cuit, vert) et 68 °C (Trop Cuit, bleu).

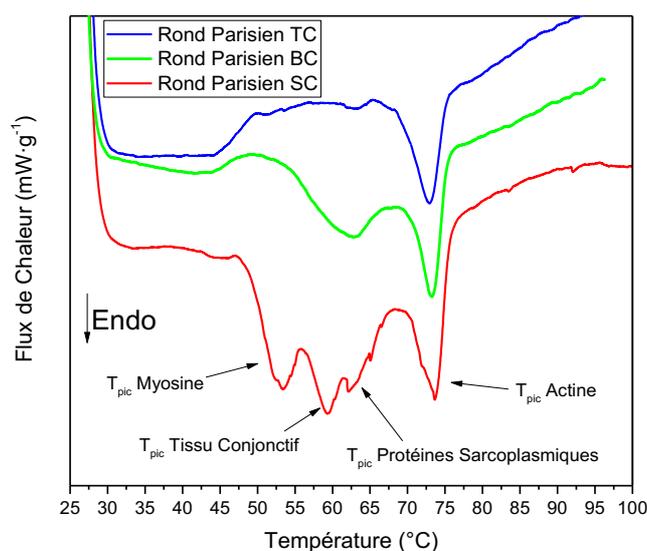


Figure 69 : Thermogrammes obtenus pour la matrice bœuf "rond parisien" : la courbe rouge correspond au degré de cuisson Sous Cuit (SC), 45 °C à cœur ; la courbe verte, au degré de cuisson Bien Cuit (BC), 52 °C à cœur ; la courbe bleue, au degré de cuisson Trop Cuit (TC), 68 °C à cœur. Les expériences ont été réalisées entre 25 et 100 °C, en appliquant une rampe de T° de $0,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Le tableau 11 présente le détail des températures de dénaturation (T_{pic}) et de début de dénaturation (T_{onset}) de chacun des échantillons de “rond parisien” étudiés.

Tableau 11 : Détail des températures de début de pic et du pic de dénaturation de la matrice bœuf. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de trois répétitions (trois cuissons différentes).

Barème de Cuisson Rond Parisien	Paramètre	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
Pic 1	T_{onset}	45,77 ± 0,22	/	/
	T_{pic}	52,62 ± 1,42	/	/
Pic 2	T_{onset}	54,96 ± 1,54	/	/
	T_{pic}	59,69 ± 0,65	/	/
Pic 3	T_{onset}	61,98 ± 0,16	53,79 ± 0,80	/
	T_{pic}	63,22 ± 1,04	62,37 ± 1,08	/
Pic 4	T_{onset}	69,54 ± 0,50	68,19 ± 1,61	68,35 ± 1,06
	T_{pic}	72,99 ± 0,41	73,14 ± 0,24	72,54 ± 0,41

Le thermogramme de l'échantillon Sous Cuit présente plusieurs pics de dénaturation qui sont liés aux différentes familles de protéines qui composent la viande. En particulier,

- le premier pic endothermique est lié aux filaments de myosine. Il débute vers 45 °C et montre son maximum vers 52 °C (Wright et al., 1977) ;
- ensuite, le thermogramme montre deux pics proches : un vers 60 °C qui est associé au tissu conjonctif (Wright et al., 1977) et le suivant vers 63 °C associé aux protéines sarcoplasmiques (Rodger et Wilding, 1990) ;
- le dernier pic est observé vers 73 °C et il est associé à la dénaturation de l'actine ou du complexe actomyosine (Wright et al., 1977).

En appliquant le barème de température correspondant à l'échantillon Bien Cuit (52 °C), deux phénomènes sont observés : la disparition du pic endothermique de la myosine, puisque sa température de dénaturation est atteinte et la fusion des deux pics correspondants au tissu conjonctif et aux protéines sarcoplasmiques. En effet, un pic unique (assez large) est observé débutant vers 54 °C et son maximum vers 63 °C. Le pic de l'actine, vers 73 °C, reste inaltéré. L'application du troisième barème de température, Trop Cuit à 68 °C, dénature les protéines du tissu conjonctif et sarcoplasmique et tend à réduire l'énergie associée au pic de l'actine, qui commence se dénaturer vers 68 °C.

La figure 70 présente les thermogrammes de la matrice blanc de poulet cuite à cœur à 56 °C (Sous Cuit, rouge), 66 °C (Bien Cuit, vert) et 76 °C (Trop Cuit, bleu).

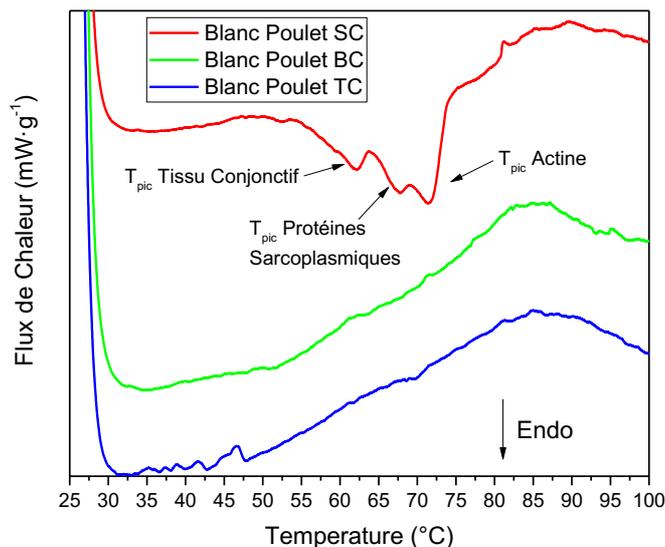


Figure 70 : Thermogrammes obtenus pour la matrice blanc de poulet : rouge, le degré de cuisson Sous Cuit (SC), 56 °C à cœur ; vert, le degré de cuisson Bien Cuit (BC), 66 °C à cœur ; bleu, le degré de cuisson Trop Cuit (TC), 76 °C à cœur. Les expériences ont été réalisées entre 25 et 100 °C, en appliquant une rampe de T° de 0,5 °C·min⁻¹.

Le tableau 12 présente le détail des températures de dénaturation (T_{pic}) et de début de dénaturation (T_{onset}) des différents pics observés sur ces échantillons.

Tableau 12 : Détail des températures de début de pic et du pic de dénaturation de la matrice blanc de poulet. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de trois répétitions (3 cuissons différentes).

Barème de Cuisson Blanc Poulet		Paramètre	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
Pic 1	T_{onset}		58,97 ± 0,88	/	/
	T_{pic}		61,61 ± 0,29	/	/
Pic 2	T_{onset}		65,22 ± 0,39	/	/
	T_{pic}		67,80 ± 0,20	/	/
Pic 3	T_{onset}		69,73 ± 0,52	/	/
	T_{pic}		71,49 ± 0,09	/	/

Le thermogramme de l'échantillon Sous Cuit (cuisson à cœur de 56 °C), présente trois pics de dénaturation : vers 60 °C, vers 68 °C et vers 71 °C, assignés aux protéines du tissu conjonctif, aux protéines sarcoplasmiques et à l'actine, respectivement (Wright et al., 1977; Rodger et Wilding, 1990). Le pic de la myosine n'est pas observé, puisque à la température de 56 °C, la protéine est déjà dénaturée. Selon ces thermogrammes, l'application du barème de cuisson à température plus élevée, 66 °C (protocole Bien Cuit) est capable de dénaturer le collagène, les protéines sarcoplasmiques, ainsi que l'actine, puisque nous n'observons plus de pics pour les échantillons de blanc de poulet cuits avec ce protocole de cuisson. Donc, toutes les familles de protéines sont dénaturées dès l'application du protocole Bien Cuit.

La figure 71 présente les thermogrammes obtenus pour la matrice dos de cabillaud cuite à cœur à 50 °C (Sous Cuit, rouge), 60 °C (Bien Cuit, vert) et 80 °C (Trop Cuit, bleu).

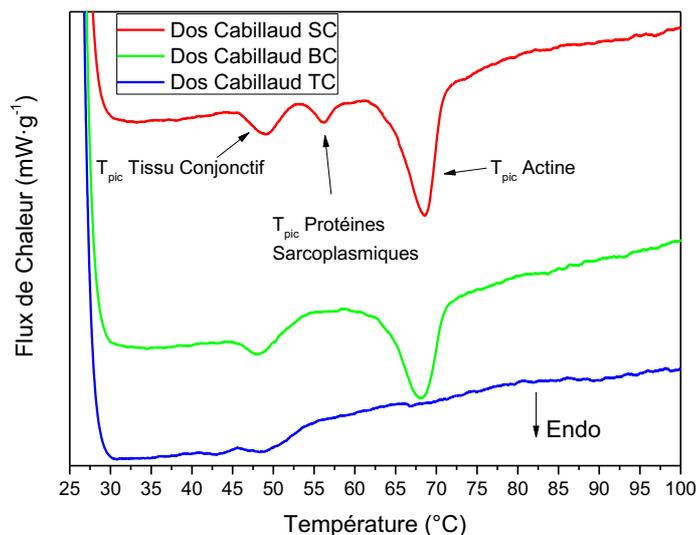


Figure 71 : Thermogrammes obtenus pour la matrice dos de cabillaud : rouge, le degré de cuisson Sous Cuit (SC), 50 °C à cœur ; vert, le degré de cuisson Bien Cuit (BC), 60 °C à cœur ; bleu, le degré de cuisson Trop Cuit (TC), 80 °C à cœur. Les expériences ont été réalisées entre 25 et 100 °C, en appliquant une rampe de T° de 0,5 °C·min⁻¹.

Le tableau 13 récapitule le détail des températures de dénaturation (T_{pic}) et de début de dénaturation (T_{onset}) des échantillons de dos de cabillaud.

Tableau 13 : Détail des températures de début de pic et du pic de dénaturation de la matrice dos de cabillaud. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart type de trois répétitions (trois cuissons).

Barème de Cuisson Dos Cabillaud	Paramètre	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
Pic 1	T_{onset}	45,41 ± 0,31	45,48 ± 0,69	/
	T_{pic}	49,28 ± 0,67	47,91 ± 0,10	/
Pic 2	T_{onset}	53,74 ± 0,10	/	/
	T_{pic}	56,11 ± 0,11	/	/
Pic 3	T_{onset}	59,53 ± 0,77	61,88 ± 0,12	/
	T_{pic}	67,87 ± 0,98	67,75 ± 0,22	/

Le thermogramme de l'échantillon Sous Cuit présente trois pics endothermiques : le premier vers 50 °C, le deuxième vers 56 °C et le troisième vers 68 °C qui pourraient être attribués selon la littérature aux protéines du tissu conjonctif, aux protéines sarcoplasmiques et à l'actine, si la succession des événements est respectée (Rodger et Wilding, 1990).

En appliquant le protocole Bien Cuit (60 °C), les protéines du tissu conjonctif sont dénaturées, d'où la disparition du pic à plus faible température, les sarcoplasmiques doivent être en partie affectées mais il reste un petit pic, et l'actine elle reste native. La cuisson à 80 °C (protocole Trop Cuit) dénature toutes les protéines dont l'actine.

L'objectif des trois barèmes de cuisson était de produire trois types d'échantillons différents pour construire des bases de données, à partir de mesures réalisées avec des méthodes spectroscopiques (infrarouge et fluorescence), afin d'intégrer des capteurs dans des fours pour piloter la cuisson de viande et de poisson de façon automatique. La création et la validation de trois protocoles de cuisson (Sous Cuit, Bien Cuit et Trop Cuit) menant à des échantillons

différents, en termes de degré de cuisson, ont été faites par les partenaires industriels du projet Opticook en étudiant les caractéristiques macroscopiques (aspect et texture) par analyses sensorielles. La calorimétrie nous a permis d'étudier les échantillons préparés sur deux matrices viande et une matrice poisson selon les protocoles des industriels au niveau moléculaire. Cet outil rend compte de l'effet de la cuisson sur la structure des protéines qui constituent le muscle (myosine, tissu conjonctif ou collagène, protéines sarcoplasmiques, actine) et permet d'observer leur état, natif ou dénaturé, après l'application des protocoles de cuisson proposés. Les résultats obtenus sur les différentes matrices avec la calorimétrie indiquent que les protocoles de cuisson choisis ne permettent pas toujours de produire des échantillons avec des niveaux de dénaturation des protéines très différents. Par exemple, le barème de cuisson Bien Cuit (66 °C) de la matrice blanc de poulet, dénature toutes les protéines, exactement comme le protocole Trop Cuit (76 °C). Le tableau 14 résume les résultats des mesures macroscopiques (analyses sensorielles et mesure de la couleur), de calorimétrie et les différences apportées par rapport aux degrés de cuisson.

Tableau 14 : Résumé des résultats obtenus avec les mesures sensorielles, colorimétriques et calorimétriques. Les annotations indiquent si ces barèmes de cuisson apportent des différences entre les échantillons : ++ : très différents ; + : un peu différents ; - : pas de différence.

Paramètres	Rond Parisien	Blanc Poulet	Dos Cabillaud
Brillant	+	+	++
Couleur Cœur	+	++	+
Couleur Surface	+	++	+
Émiettement	/	/	+
Séparation Myomères	/	/	-
Fibrosité	-	-	+
Sensoriel			
Granulosité	+	++	/
Jutosité	+	+	+
Tendreté	++	-	/
Fermeté	/	/	+
Adhérence	/	/	+
Fondant	/	/	+
Pâteux	/	/	-
Couleur			
Surface	++	+	+
Tranche	+	+	+
Calorimétrie	++	+	++

Analyses spectroscopiques

Parlons d'abord du niveau moléculaire. Ceci permet d'identifier des outils de suivi de cuisson. Nous avons cherché à déterminer si les signatures spectroscopiques relatives aux évolutions de structure des protéines de la viande et du poisson seraient des marqueurs discriminants du degré de cuisson et universels donc valables pour toutes les matrices. Nous avons utilisé différentes spectroscopies nous permettant d'observer différentes sondes présentes dans les protéines et donc différents niveaux de leurs structures :

- le visible qui permet plus particulièrement d'étudier l'état d'oxydation du fer des hémoprotéines ;
- la spectroscopie dans le moyen infrarouge (MIR), qui donne des informations sur la structure secondaire des protéines, mais aussi sur les autres constituants (l'eau par exemple) ;
- la spectroscopie de fluorescence, pour suivre l'évolution de l'environnement des résidus de tryptophanes des différentes protéines de la matrice.

La spectroscopie dans le visible a été réalisée en collectant des spectres entre 350 et 900 nm. Un exemple de spectres obtenus sur des échantillons de rond parisien aux différents degrés de cuisson (Sous Cuit, Bien Cuit et Trop Cuit) est présenté en figure 72.

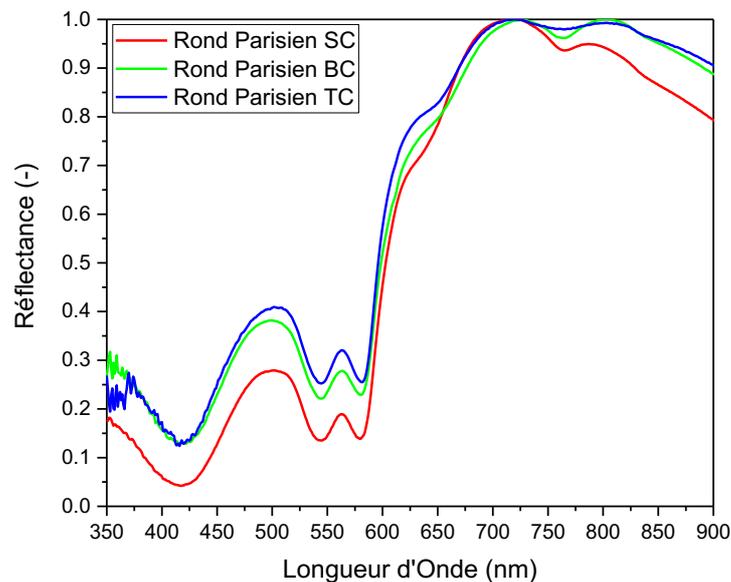


Figure 72 : Exemples de spectres obtenus par réflectance dans le visible d'échantillons de bœuf aux différents degrés de cuisson.

À partir de ces spectres, nous avons observé l'évolution des valeurs de réflectance à 544 et 580 nm pour suivre le passage des hémoprotéines de leur forme oxy- à met- et rendre compte du changement de couleur (du rouge vif à brun) (Liu et al., 2000). La figure 73 présente les valeurs du rapport selon l'équation (3)

$$ratio = \frac{I_{580}}{I_{544}} \quad (3)$$

par matrice, en fonction du degré de cuisson.

Signatures spectroscopiques du degré de cuisson de la viande et du poisson

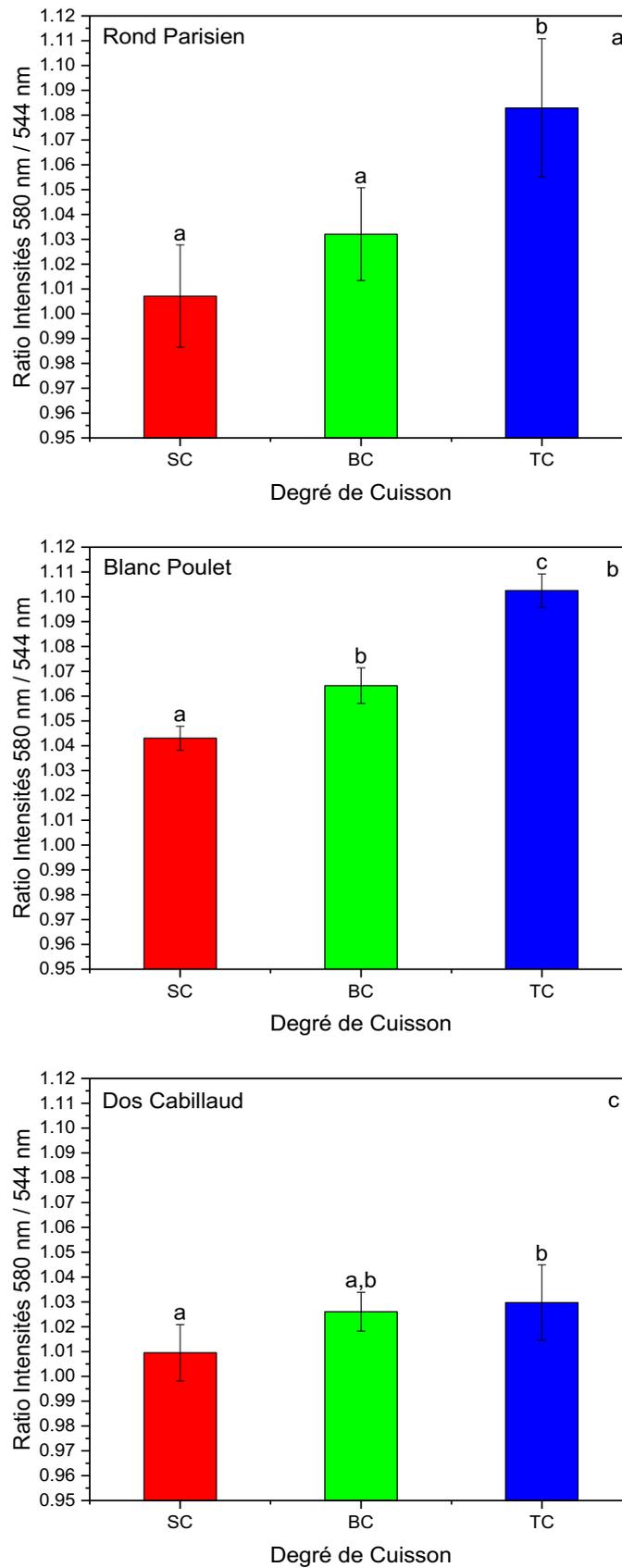


Figure 73 : Évolution du rapport d'intensité (580 nm/ 544 nm) en fonction du degré de cuisson pour les matrices rond parisien (a), blanc de poulet (b) et dos de cabillaud (c). Les lettres correspondent aux groupes auxquels les échantillons appartiennent et ont été déterminées par un test de Tukey ($\alpha = 5\%$). Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$).

Pour les trois matrices, le degré de cuisson Bien Cuit tend à avoir des valeurs du ratio plus élevées, ce qui semble indiquer que les protocoles de cuisson Sous Cuit et Bien Cuit (entre 45 et 66 °C, en général) sont dans l'intervalle de température de la dénaturation des hémoprotéines. Pour les matrices "rond parisien" et "blanc de poulet", le ratio augmente en appliquant le protocole de cuisson Trop Cuit. Pour ces deux matrices, les températures à cœur des protocoles de cuisson des échantillons Bien Cuit (52 °C et 66 °C, respectivement) ne dépassent pas la température de dénaturation des protéines sarcoplasmiques (63, 67 et 75 °C, respectivement) (Wright et al., 1977; Rodger et Wilding, 1990). Pour le dos de cabillaud, ce rapport reste constant entre les protocoles de cuisson Bien Cuit et Trop Cuit (cuisson à cœur de 60 et 80 °C) ce qui semble en cohérence avec nos données de calorimétrie (figure 73) et la littérature qui indiquent que la température de dénaturation des protéines sarcoplasmiques de cette matrice est située vers 56 °C (Rodger et Wilding, 1990). Cet outil est donc mal adapté au suivi de la cuisson de la matrice cabillaud.

Afin d'approfondir l'étude de l'impact de la température sur les changements de structure des protéines, nous avons réalisé des expériences de spectroscopie dans le moyen infrarouge pour sonder la structure secondaire des protéines. Nous avons analysé des spectres entre 1000 et 4000 cm^{-1} pour chaque matrice et chaque degré de cuisson. La figure 74 présente un exemple de spectres correspondant aux différents degrés de cuisson (Sous Cuit, Bien Cuit et Trop Cuit) pour le bœuf.

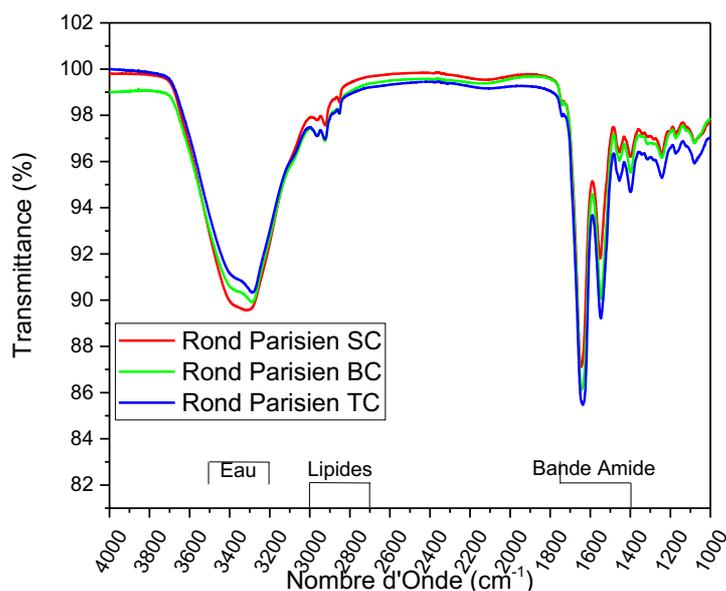


Figure 74 : Exemples de spectres obtenus dans l'infrarouge moyen d'échantillons de bœuf aux différents degrés de cuisson.

Sur chacun de ces spectres, nous retrouvons bien les bandes amides de la protéine entre 1800 et 1200 cm^{-1} , la bande caractéristique des vibrations de l'eau entre 3500 et 3200 cm^{-1} et celles des lipides entre 3000 et 2700 cm^{-1} .

La déconvolution des spectres et l'analyse des pics ont permis de trouver les 30 nombres d'onde les plus répétitives et les plus communes parmi les trois matrices et les trois degrés de cuisson. Ensuite, l'analyse en composantes principales a permis de projeter ces 30 variables sur le plan représenté par les premier et deuxième facteurs. La figure 75 présente la projection de ces 30 variables sur le plan.

Signatures spectroscopiques du degré de cuisson de la viande et du poisson

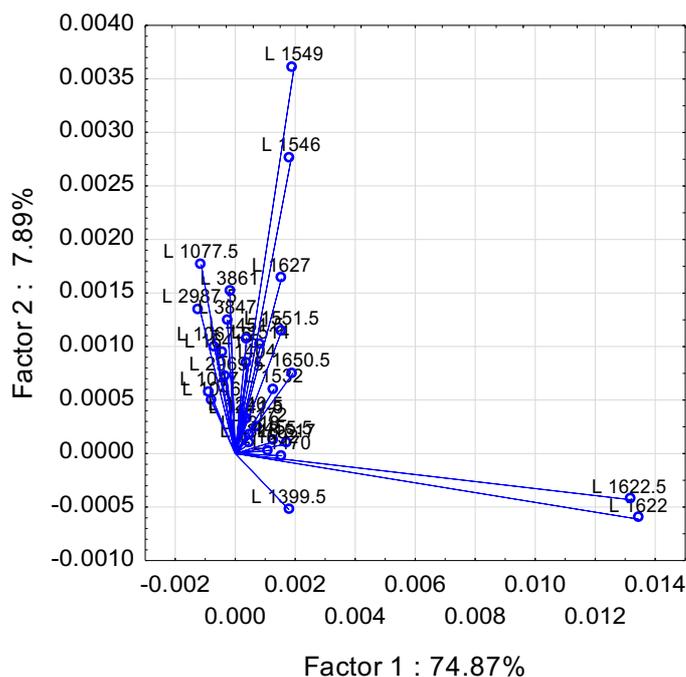


Figure 75 : Exemple de représentation graphique de l'analyse en composantes principales à partir des spectres FTIR : projection des 30 variables (nombres d'onde les plus représentatifs) sur le plan des facteurs 1 et 2.

Ensuite, l'analyse en composantes principales a permis d'affiner la réduction du nombre de variables en enlevant les valeurs redondantes. Cet affinage a permis de passer de 30 variables (environ 83 % de la variabilité expliquée) à 14 qui expliquent environ 81 % des phénomènes qui se passent dans les échantillons pendant la cuisson. La figure 76 présente la projection sur le plan des 14 nombres d'onde restants.

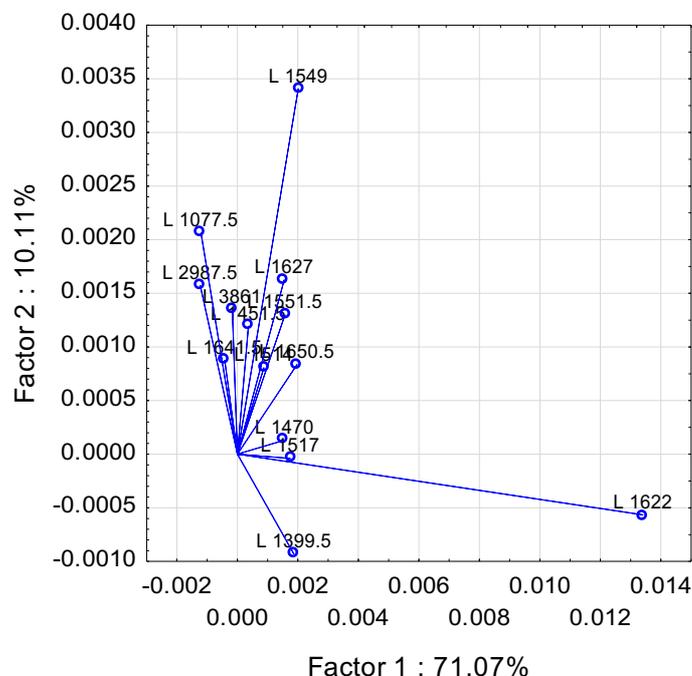


Figure 76 : Représentation graphique, issue de l'analyse en composantes principales, de la projection des 14 variables restantes sur le plan (facteurs 1 et 2).

La figure 77 présente le zoom des 14 nombres d'onde sélectionnés centré sur les coordonnées (0,0).

Signatures spectroscopiques du degré de cuisson de la viande et du poisson

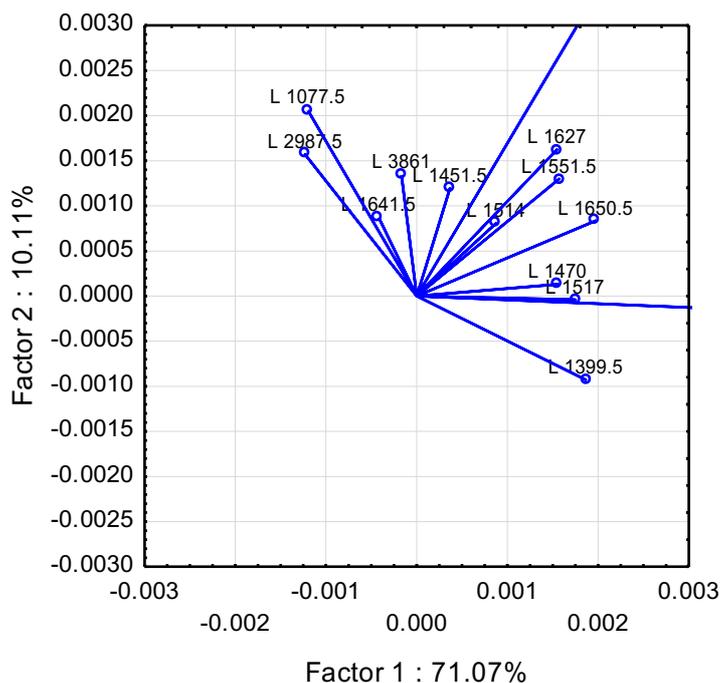


Figure 77 : Zoom centré sur les coordonnées (0,0) de la projection des 14 variables sur le plan (facteurs 1 et 2) représenté en figure 76.

Dans une analyse d’infrarouge, ces quatorze nombres d’onde peuvent servir à suivre les cuissons. Les variables choisies représentent tout le spectre infrarouge et tous les constituants de nos matrices, puisqu’elles correspondent à des nombres d’onde relatifs à des vibrations de groupements impliqués dans la structure des protéines (CO, NH, COOH...), mais aussi à des vibrations caractéristiques des groupements de l’eau (OH), des sucres (OH) ou des lipides (CH₃, COOH,...). La figure 78 présente la projection des individus en fonction des deux facteurs explicatifs obtenue pour la matrice “rond parisien” selon leur degré de cuisson.

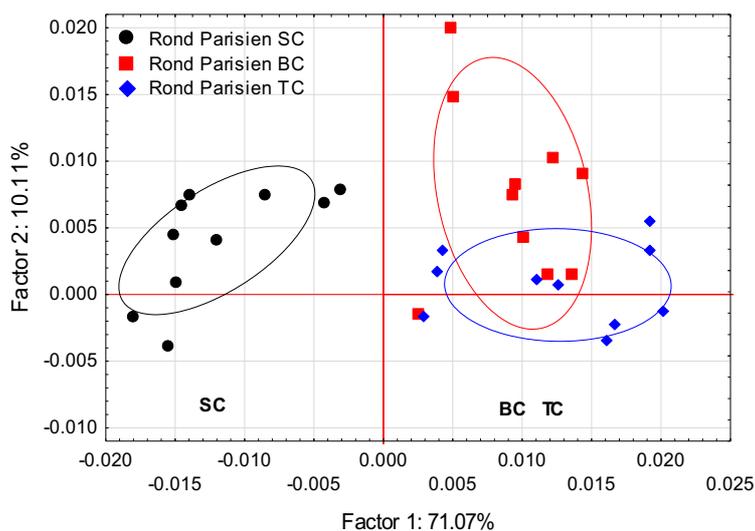


Figure 78 : Représentations graphiques de l’analyse en composantes principales à partir des spectres FTIR des différentes matrices selon leur degré de cuisson : projection des individus sur le plan des facteurs 1 et 2 pour la matrice rond parisien. Les ellipses représentent la région de confiance ($\alpha = 0.05$). Le graphique présente la matrice groupée selon les 3 degrés de cuisson. Dans les cas du rond parisien, l’analyse a mis en évidence que les échantillons SC sont différents par rapport aux BC et TC, par contre ces deux autres degrés de cuisson sont similaires entre eux (superposition des ellipses).

La figure 79 présente la projection des individus en fonction des deux facteurs explicatifs obtenue pour la matrice “blanc de poulet” selon leur degré de cuisson.

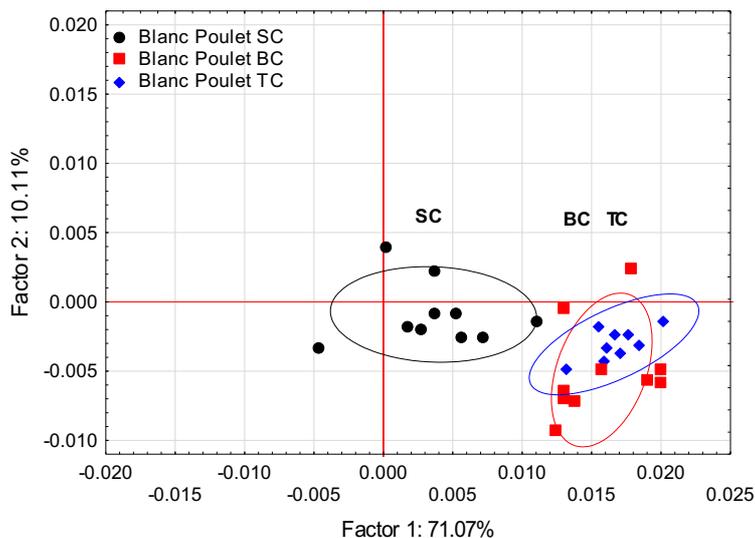


Figure 79 : Représentations graphiques de l’analyse en composantes principales à partir des spectres FTIR des différentes matrices selon leur degré de cuisson : projection des individus sur le plan des facteurs 1 et 2 pour la matrice blanc de poulet. Les ellipses représentent la région de confiance ($\alpha = 0.05$). Le graphique présente la matrice groupée selon les 3 degrés de cuisson. Dans les cas du blanc de poulet, l’analyse a mis en évidence que les échantillons SC sont différents par rapport aux BC et TC, par contre ces deux autres degrés de cuisson sont similaires entre eux (superposition des ellipses).

La figure 80 présente la projection des individus en fonction des deux facteurs explicatifs obtenue pour la matrice “dos de cabillaud” selon leur degré de cuisson.

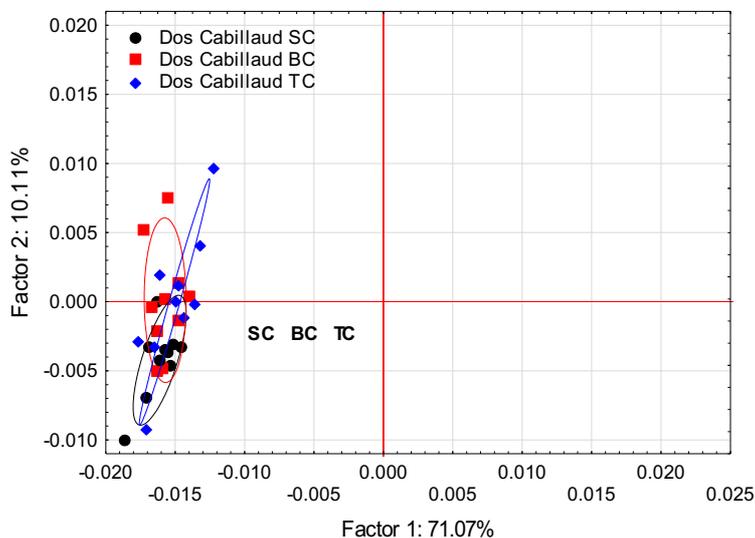


Figure 80 : Représentations graphiques de l’analyse en composantes principales à partir des spectres FTIR des différentes matrices selon leur degré de cuisson : projection des individus sur le plan des facteurs 1 et 2 : pour la matrice dos de cabillaud. Les ellipses représentent la région de confiance ($\alpha = 0.05$). Le graphique présente la matrice groupée selon les 3 degrés de cuisson. Les trois degrés de cuisson (SC, BC et TC) sont similaires dans le cas du dos de cabillaud (superpositions des individus).

Les variables choisies sont capables de séparer les trois degrés de cuisson en deux groupes pour les deux matrices viandes : le degré de cuisson Sous Cuit est différent par rapport aux degrés de cuisson Bien Cuit et Trop Cuit. Alors que, le moyen infrarouge ne semble pas nous permettre

avec ce traitement des données de mettre en évidence de différence pour les trois degrés de cuisson de la matrice “dos de cabillaud”.

Pour aller plus loin dans l’analyse de nos spectres, nous avons réalisé une analyse statistique de données en utilisant un test ANOVA couplé à un test de Tukey (tableau 15).

Tableau 15 : Intensités moyennes des 8 nombres d’ondes utilisés pour l’analyse ANOVA à 1 facteur, en fonction du degré de cuisson appliqué. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de neuf répétitions \pm l’intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$) de la matrice rond parisien (a), blanc de poulet (b) et dos de cabillaud (c). Les lettres correspondent aux groupes auxquels les échantillons appartiennent et ont été déterminées par un test de Tukey ($\alpha = 5\%$).

Variables	Rond Parisien (a)		
	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
L. 1399,5	96,39 \pm 0,27 ^a	95,45 \pm 0,35 ^b	95,72 \pm 0,43 ^b
L. 1451,5	96,66 \pm 0,39 ^a	96,04 \pm 0,27 ^{a,b}	96,21 \pm 0,27 ^a
L. 1549	92,36 \pm 0,91 ^a	90,07 \pm 0,69 ^b	90,39 \pm 0,82 ^b
L. 1551,5	92,32 \pm 0,89 ^a	90,23 \pm 0,66 ^b	90,52 \pm 0,79 ^b
L. 1627	89,34 \pm 0,74 ^a	87,01 \pm 0,87 ^b	87,07 \pm 1,05 ^b
L. 1641,5	87,66 \pm 0,83 ^a	86,20 \pm 0,83 ^{a,b}	86,73 \pm 0,93 ^b
L. 1650,5	87,82 \pm 0,83 ^a	86,66 \pm 0,75 ^a	87,25 \pm 0,86 ^a
L. 2987,5	98,02 \pm 0,34 ^a	97,13 \pm 0,70 ^b	98,64 \pm 0,38 ^a

Variables	Blanc de Poulet (b)		
	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
L. 1399,5	96,27 \pm 0,38 ^a	95,39 \pm 0,28 ^b	95,17 \pm 0,33 ^b
L. 1451,5	96,87 \pm 0,31 ^a	96,01 \pm 0,19 ^b	95,94 \pm 0,26 ^b
L. 1549	91,79 \pm 0,64 ^a	89,86 \pm 0,52 ^b	89,72 \pm 0,75 ^b
L. 1551,5	91,89 \pm 0,63 ^a	90,00 \pm 0,50 ^b	89,87 \pm 0,73 ^b
L. 1627	89,04 \pm 0,72 ^a	86,56 \pm 0,50 ^b	86,31 \pm 0,69 ^b
L. 1641,5	88,54 \pm 0,89 ^a	86,27 \pm 0,47 ^b	86,21 \pm 0,66 ^b
L. 1650,5	89,12 \pm 0,97 ^a	86,83 \pm 0,45 ^b	86,78 \pm 0,62 ^b
L. 2987,5	97,70 \pm 0,91 ^a	98,07 \pm 0,52 ^a	97,93 \pm 0,30 ^a

Variables	Dos de Cabillaud (c)		
	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Cuit
L. 1399,5	96,32 \pm 0,26 ^a	96,21 \pm 0,34 ^a	95,56 \pm 0,26 ^b
L. 1451,5	96,84 \pm 0,22 ^a	96,97 \pm 0,25 ^a	96,37 \pm 0,23 ^b
L. 1549	92,84 \pm 0,56 ^a	92,54 \pm 0,58 ^a	91,39 \pm 0,60 ^b
L. 1551,5	92,88 \pm 0,54 ^a	92,62 \pm 0,56 ^a	91,49 \pm 0,56 ^b
L. 1627	89,24 \pm 0,49 ^a	88,90 \pm 0,54 ^a	87,68 \pm 0,57 ^b
L. 1641,5	88,34 \pm 0,52 ^a	88,28 \pm 0,52 ^a	87,33 \pm 0,53 ^b
L. 1650,5	88,64 \pm 0,50 ^a	88,73 \pm 0,52 ^a	87,86 \pm 0,47 ^b
L. 2987,5	97,01 \pm 0,56 ^a	97,47 \pm 0,67 ^a	97,22 \pm 0,45 ^a

Dans le cas de la matrice “dos de cabillaud”, les nombres d’ondes caractéristiques des groupements associés aux protéines (1399,5 – 1451,5 – 1549 – 1551,5 – 1627 – 1641 – 1650 cm^{-1}) indiquent que des différences significatives sont présentes entre le degré de cuisson Trop Cuit et les deux autres degrés Sous Cuit et Bien Cuit. Seul le nombre d’onde à 2987,5 cm^{-1} (correspondant à des groupements caractéristiques des lipides) ne montre pas de différences significatives sur les trois degrés de cuisson.

Dans le cas des matrices “rond parisien” et “blanc de poulet”, la plupart des nombres d’ondes relatifs aux protéines montre des différences significatives entre le degré de cuisson Sous Cuit et les degrés Bien Cuit et Trop Cuit.

L'analyse statistique des variables confirme les observations faites par l'analyse en composantes principales : il y a des différences entre le degré de cuisson Sous Cuit et les degrés de cuisson Bien Cuit et Trop Cuit pour les deux matrices viande. Pour la matrice cabillaud, si l'on focalise l'analyse sur les nombres d'ondes caractéristiques des protéines, le degré de cuisson Trop Cuit est différent des degrés de cuisson Sous Cuit et Bien Cuit. Ces résultats sont une première démonstration que l'observation par spectroscopie dans le moyen infrarouge des protéines peut permettre de discriminer des degrés de cuisson.

En conclusion, le FTIR permet la discrimination de certains degrés de cuisson et pas tous. Il convient donc d'étudier l'impact des barèmes de cuisson par un autre outil spectroscopique : la fluorescence.

La spectroscopie de fluorescence a été utilisée pour étudier un autre niveau de structure des protéines et plus particulièrement pour observer les changements de l'environnement physico-chimique qui entoure les résidus tryptophane suite à l'application de la température. Nous avons utilisé la spectroscopie de fluorescence en incidence rasante en excitant les résidus de tryptophane à 291 nm et en collectant l'émission de fluorescence entre 300 et 500 nm. La figure 81 présente un exemple de spectres d'émission de fluorescence enregistrés sur la matrice "bœuf" en fonction du degré de cuisson.

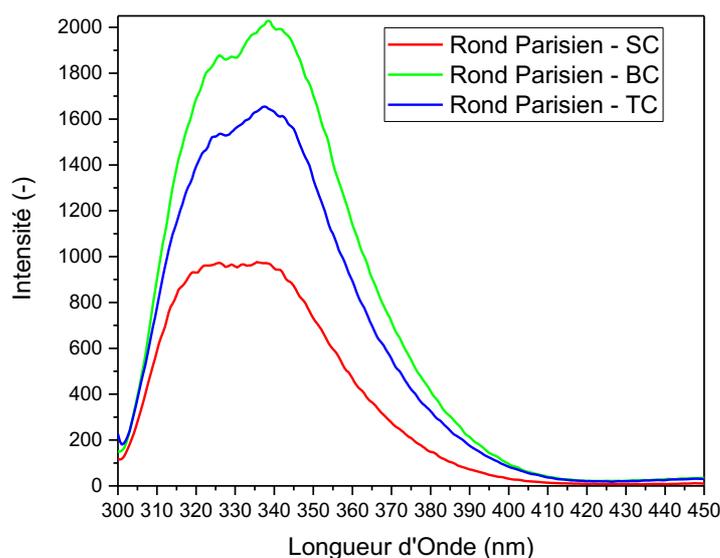


Figure 81 : Exemples de spectres d'émission de fluorescence obtenus pour la matrice "rond parisien" en fonction du degré de cuisson suite à une excitation à 291 nm.

D'après les spectres bruts enregistrés, des différences d'intensité d'émission importantes sont observées selon le degré de cuisson appliqué. La déconvolution des spectres a permis de détecter deux bandes pour l'ensemble des échantillons. La figure 82 présente les variables, intensité maximale et longueur d'onde correspondante, obtenues suite à la déconvolution pour toutes les matrices et selon le degré de cuisson.

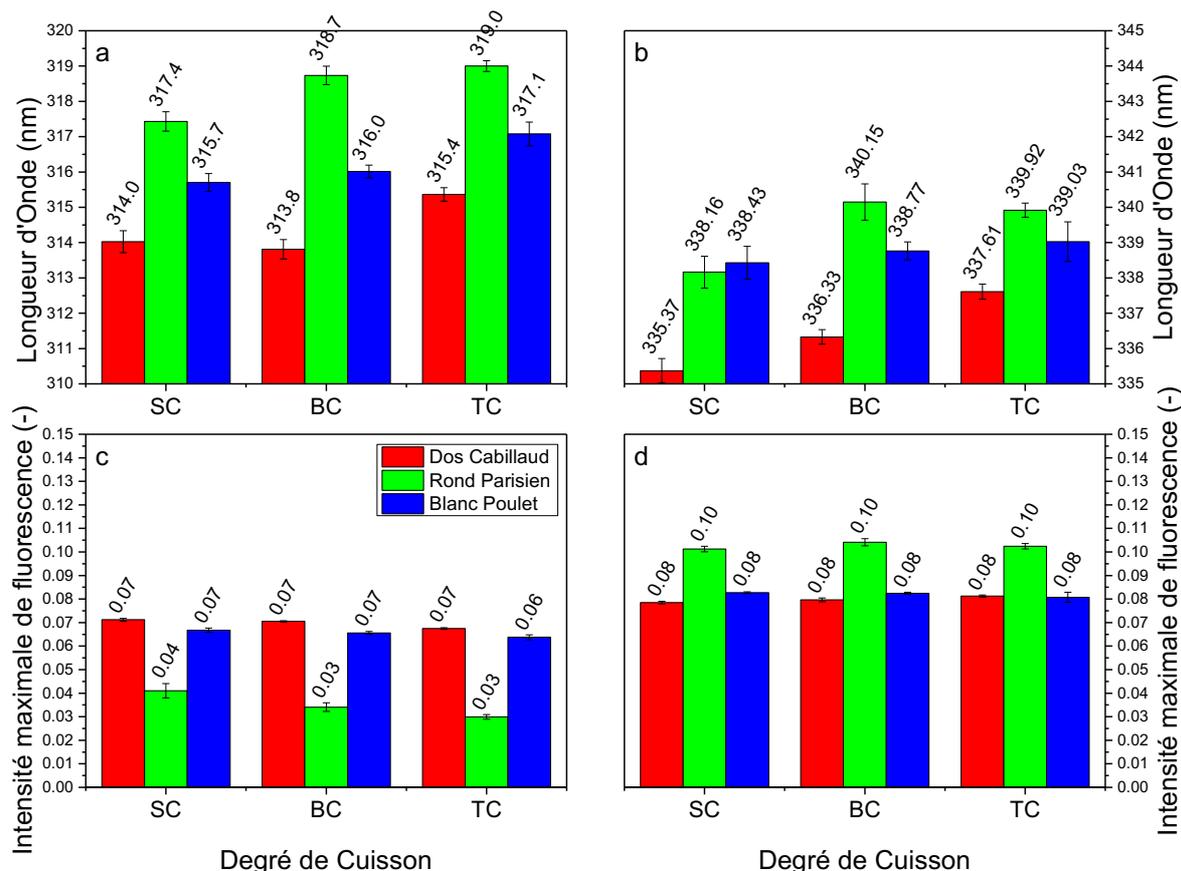


Figure 82 : Représentation des intensités maximales (c et d) et des longueurs d'ondes correspondantes (a et b) des deux bandes détectées, en fonction du degré de cuisson pour les trois matrices étudiées. Les barres représentent l'intervalle de confiance calculé en prenant en compte 9 répétitions et 5 % comme degré de confiance (α).

Les longueurs d'ondes des deux bandes détectées tendent à se déplacer vers des longueurs d'ondes plus élevées en augmentant le degré de cuisson. Cela est lié au changement d'environnement des résidus de tryptophanes, d'un environnement apolaire, vers un milieu plus polaire, suite aux changements conformationnels des protéines. Selon la littérature, les bandes que nous observons suite à cette déconvolution peuvent être associées aux deux fractions protéiques majoritaires de ces matrices à savoir la myosine avec dont le maximum d'émission de fluorescence a été observé vers 340 nm et la myoglobine (ou l'hémoglobine) dont le maximum se situe vers 325 nm. Il est cependant difficile à partir de ces mesures réalisées sur des matrices complexes de corréler les modifications que nous observons selon le degré de cuisson à une fraction protéique spécifique. Nous avons par la suite travaillé sur un mélange de protéines (système modèle), la myosine et l'hémoglobine, afin d'assigner les changements observés sur le système complexe à des changements de structure de ces deux protéines.

Système modèle

Nous avons purifié la myosine et l'hémoglobine à partir du muscle de poulet et du sang de porc. Pour la myosine, la purification est bien décrite dans la littérature (Margossian et Lowey, 1982), mais nous avons dû adapter ce protocole afin d'obtenir une protéine conservant sa structure native suite à cette purification et afin d'optimiser sa concentration. Suite à l'optimisation de ce protocole de purification, nous avons étudié par calorimétrie et spectroscopie de fluorescence l'impact de la température sur les protéines isolées ou en mélange.

Nous avons, dans un premier temps, étudié la dénaturation thermique des deux protéines par calorimétrie. La figure 83 présente la comparaison des thermogrammes obtenus sur un échantillon de myosine purifiée et sur un échantillon de blanc de poulet avant la purification (figure 83a) et sur un échantillon d'hémoglobine purifiée et un échantillon de muscle de porc (figure 83b).

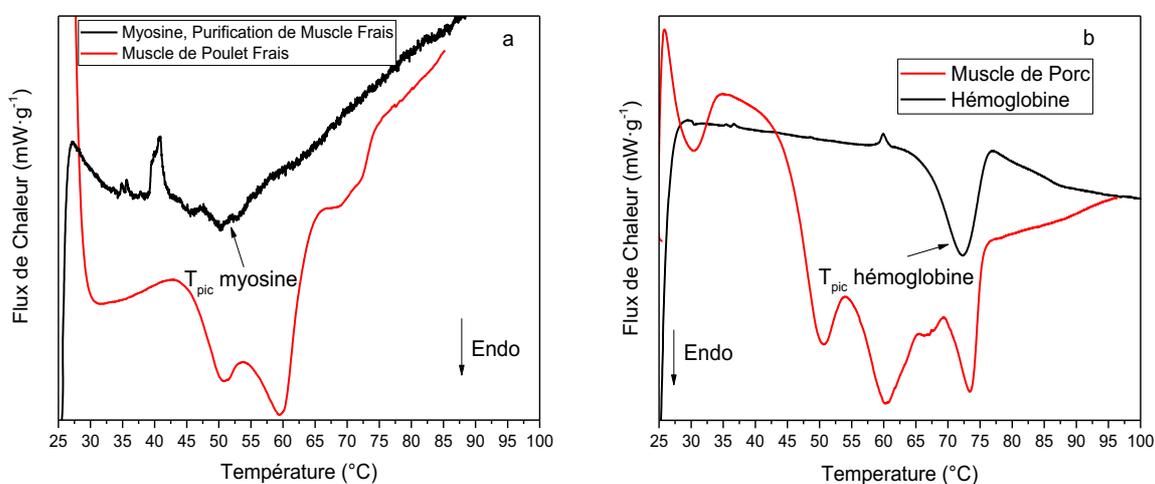


Figure 83 : a) Thermogramme de la myosine purifiée (courbe noire) et du muscle de poulet frais (courbe rouge). b) Thermogramme de l'hémoglobine purifiée (courbe noire) et du muscle de porc (courbe rouge). Les expériences ont été réalisées par micro-DSC : 25-100 °C, 0,5 °C·min⁻¹.

Le thermogramme de la myosine laisse apparaître un pic de dénaturation vers 50 °C, qui correspond au premier pic de la courbe du poulet frais (courbe rouge). Ces résultats nous indiquent que la protéine purifiée conserve sa structure native puisque sa température de dénaturation reste la même avant et après la purification. La courbe de l'hémoglobine laisse apparaître un pic de dénaturation endothermique à 72 °C.

Nous avons ensuite étudié l'impact de la température sur ces deux protéines isolées ou en mélange (dans un ratio identique à celui que l'on retrouve dans le muscle et dans le tampon adéquat à la purification de la myosine) au niveau macroscopique en observant les changements de turbidité. La figure 84 présente des photographies de tubes contenant des solutions d'hémoglobine chauffées à différentes températures.

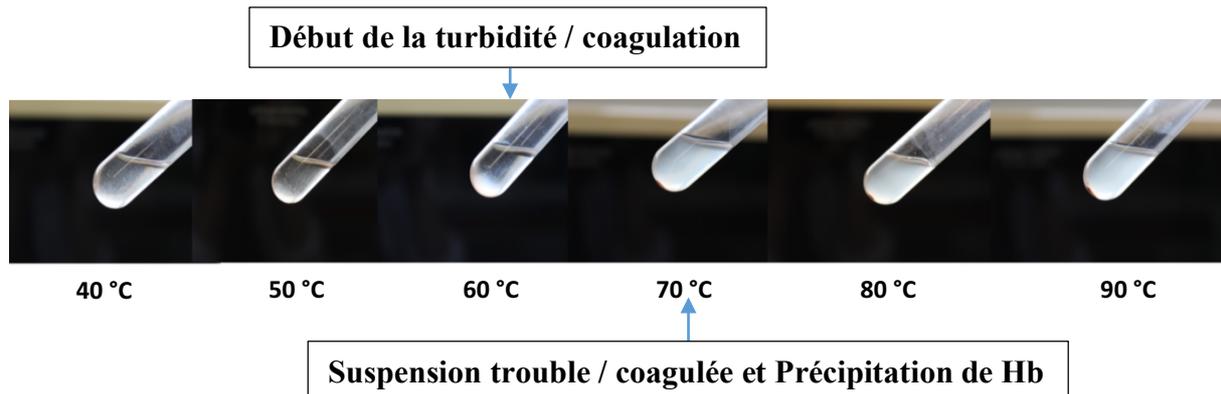


Figure 84 : Photographies de tubes contenant des suspensions d'hémoglobine (0,62 % des protéines totales) en fonction de la température de chauffage (de 40 à 90 °C), suspensions chauffées dans un bain d'huile à 100 °C. L'expérience a été répétée trois fois.

Nous n'avons pas observé de changement de turbidité des échantillons d'hémoglobine jusqu'à 60 °C. À partir de 60 °C, par contre, la suspension commence à devenir trouble. À partir de 70 °C, la suspension est complètement trouble et l'hémoglobine précipite sur le fond du tube. Cette température critique, est la même que celle que nous avons observée par calorimétrie (figure 83a). La figure 85 présente des photographies de tubes contenant des solutions de myosine, chauffées à différentes températures.

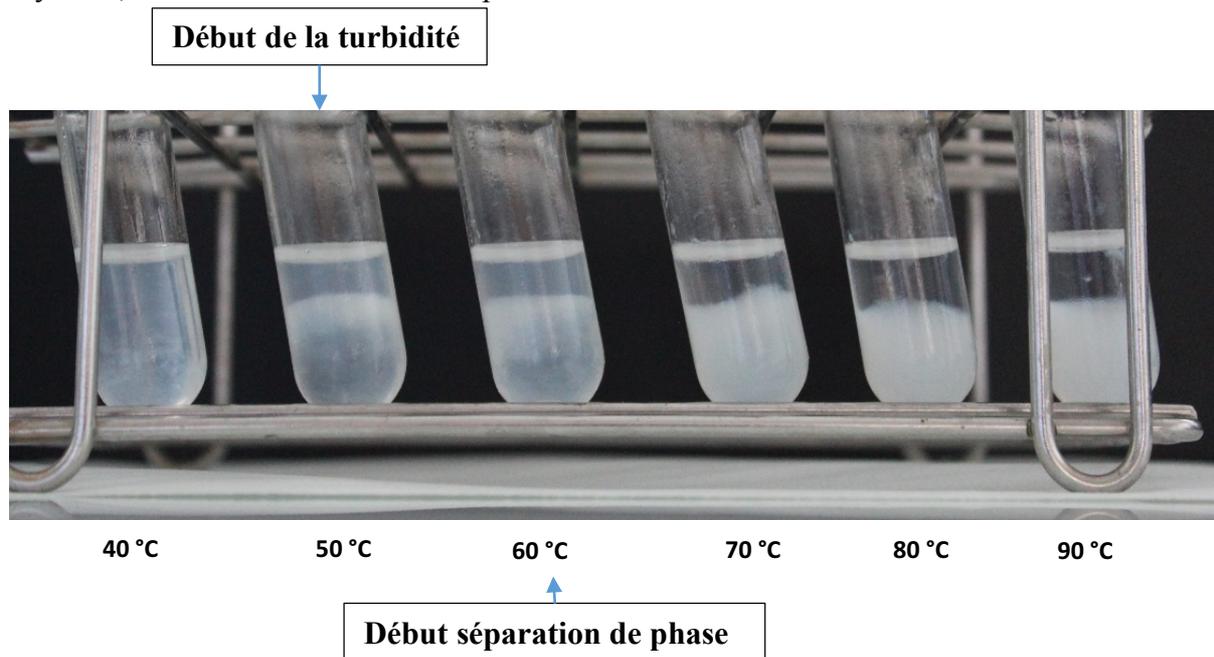


Figure 85 : Photographies de tubes contenant des suspensions de myosine ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en fonction de la température de chauffage (de 40 à 90 °C), les tubes ont été chauffés dans un bain d'huile à 100 °C. L'expérience a été répétée trois fois.

Le chauffage de la myosine montre des changements de turbidité dès la température de 50 °C. Cette température critique est en accord avec la température de dénaturation de la myosine observée en calorimétrie (figure 83a) (Wright et al., 1977; Wright et Wilding, 1984). En augmentant la température, la suspension devient de plus en plus trouble du fait de la coagulation-agrégation des protéines suite à leur dénaturation et une séparation de phase est même observée (Locker, 1956).

Nous avons répété la même expérience sur le mélange de myosine et d'hémoglobine. La figure 86 présente les effets de la température sur les mélanges de myosine-hémoglobine.

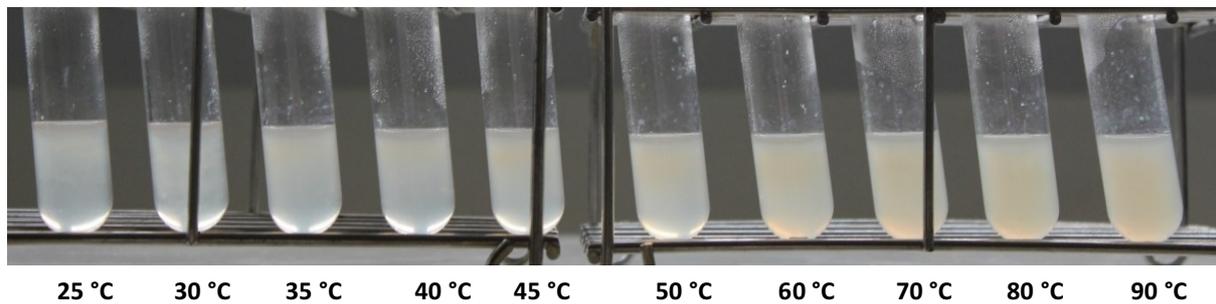


Figure 86 : Photographies de tubes contenant des suspensions du mélange myosine-hémoglobine (ratio environ 30:1) en fonction de la température de chauffage. Le chauffage a été réalisé dans un bain d'huile à 100 °C. L'expérience a été répétée trois fois.

Le mélange initial est légèrement trouble. Après l'application de la température, les échantillons deviennent un peu plus troubles et une coloration brune est observée. Par contre, nous n'observons pas de séparation de phase. Il est possible que l'hémoglobine interagisse avec la myosine de façon à réduire l'interaction myosine-myosine, donc d'empêcher la création d'agrégats qui provoque la séparation de phase sur les échantillons de myosine isolée. Quels sont les changements de structure que les deux protéines isolées ou en mélange subissent suite à l'application de la température et comment peuvent-ils être observés ?

Pour répondre à cette dernière question, nous avons voulu faire des observations à l'échelle moléculaire par spectroscopie de fluorescence des tryptophanes. Les spectres de fluorescence collectés ont été normalisés par les valeurs d'absorbance mesurées à 291 nm. Pour chaque spectre, l'intensité maximale et la longueur d'onde de ce maximum d'intensité ont été déterminées. La figure 87 présente les spectres obtenus pour les échantillons de myosine chauffés à différentes températures.

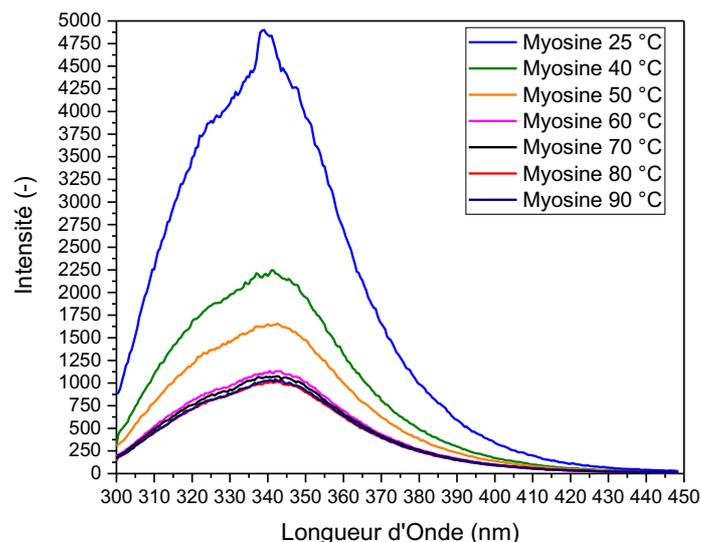


Figure 87 : Exemples de spectres de fluorescence de la myosine collectés avant et après avoir chauffé l'échantillon à différentes températures. La figure montre qu'en augmentant la température, l'intensité maximale tend à diminuer. En particulier, la courbe de la myosine à 25 °C est la plus intense (courbe bleue), puis la myosine à 30 °C (courbe verte claire). Ensuite, la courbe foncée, orange et magenta, correspondent aux suspensions de myosine chauffées à 40, 50 et 60 °C. Les dernières courbes représentent la myosine chauffée à 70, 80 et 90 °C, courbes noire, rouge et bleu foncée, respectivement.

Le tableau 16 présente les valeurs d'intensité et de longueur d'onde correspondant aux échantillons de myosine chauffés.

Tableau 16 : Valeurs d'intensité maximale et de longueur d'onde correspondante en fonction de la température atteinte dans le tube lors d'une immersion en bain d'huile à 100 °C des échantillons de myosine. Les données reportées correspondent aux valeurs moyennes et aux écarts types de 4 répétitions.

Température (°C)	Longueur d'onde (nm)	Intensité (-)
25	342,7 ± 0,8	6232,27 ± 67,64
40	342,7 ± 0,8	2834,07 ± 33,05
50	342,7 ± 0,8	2342,39 ± 218,54
60	342,7 ± 0,8	2050,46 ± 420,04
70	342,7 ± 0,8	1608,58 ± 82,66
80	342,7 ± 0,8	1508,68 ± 38,37
90	342,7 ± 0,8	1511,80 ± 68,47

Les données reportées dans le tableau montrent que les valeurs de longueur d'onde restent constantes en fonction de la température de chauffage, autour de 342,7 nm. Cette position correspond à la longueur d'onde des résidus tryptophanes de la myosine exposés au solvant. À partir de ces données, nous avons évalué la perte d'intensité en fonction de la température de chauffage, en considérant que l'échantillon "pas chauffé" avait 100 % d'intensité. La figure 88 montre la perte d'intensité en fonction de la température des échantillons de myosine chauffés.

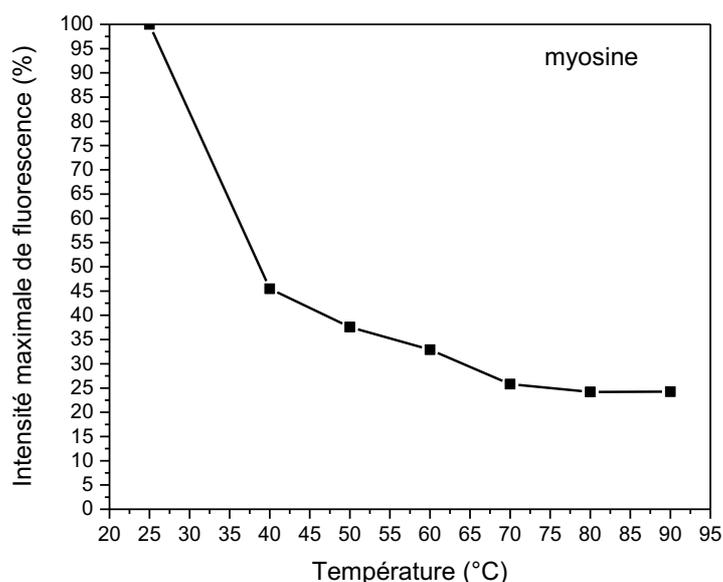


Figure 88 : Évolution de l'intensité de fluorescence des échantillons de myosine en fonction de la température atteinte par la suspension.

La figure 88 montre que la myosine isolée perd la moitié de son émission de fluorescence vers 40 °C. Cela peut être lié au fait que le phénomène d'agrégation observé (figure 85) provoque un effet quenching de l'émission de fluorescence.

Ensuite, nous avons réalisé les mesures de fluorescence sur les mélanges myosine-hémoglobine (30:1). Le tableau 17 présente les données caractéristiques des spectres, intensité maximale et longueur d'onde correspondant à ce maximum.

Tableau 17 : Valeurs d'intensité maximale et de longueur d'onde correspondant à ce maximum, en fonction de la température atteinte dans le tube lors d'une immersion en bain d'huile à 100 °C des échantillons du mélange myosine-hémoglobine. Les données présentées correspondent aux valeurs moyennes et aux écarts types de quatre répétitions.

Température (°C)	Longueur d'onde (nm)	Intensité (-)
25	341,4 ± 1,1	3154,78 ± 342,38
30	339,5 ± 1,2	2832,03 ± 800,42
35	340,6 ± 1,5	2308,47 ± 803,54
40	341,0 ± 0,7	2203,41 ± 597,17
45	341,0 ± 0,4	1844,23 ± 581,75
50	340,6 ± 1,1	1564,98 ± 408,92
60	341,8 ± 2,1	1261,87 ± 314,23
70	339,8 ± 1,4	1087,17 ± 315,34
80	342,1 ± 1,0	877,10 ± 234,10
90	342,3 ± 1,3	875,58 ± 316,65

Les données présentées dans le tableau 17 montrent que la valeur de longueur d'onde du maximum d'intensité de fluorescence ne change pas pendant le chauffage : il a une valeur moyenne de 340,94 nm. La présence d'hémoglobine (à cette concentration) ne semble pas perturber l'émission de fluorescence de la myosine. La figure 89 montre l'évolution de l'intensité en fonction de la température des échantillons du mélange myosine-hémoglobine chauffés.

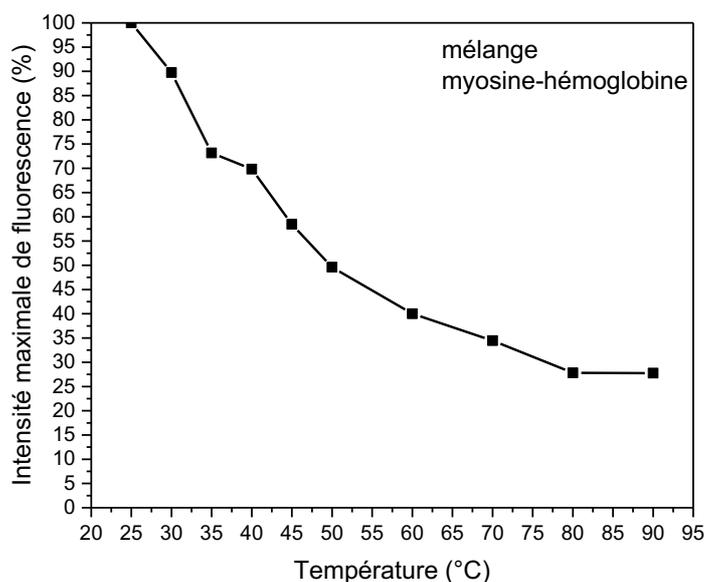


Figure 89 : Évolution de l'intensité de fluorescence des échantillons du mélange myosine-hémoglobine (ratio 30:1) en fonction de la température de la suspension de mélange myosine-hémoglobine.

L'intensité de fluorescence du mélange diminue progressivement lorsque l'on augmente la température, avec la perte de 50 % du signal émis autour de 50 °C. Ce résultat nous montre qu'il y a bien un effet de la présence de l'hémoglobine sur la structure de la myosine lors du chauffage. La température de demi-dénaturation est plus haute, ce qui est en accord avec les observations macroscopiques. Les changements de turbidité se produisent eux aussi à plus haute température et il n'y a pas de séparation de phase.

Résumé des principaux résultats et schéma de synthèse

Les résultats de cette première partie montrent que les protéines sont des marqueurs spectroscopiques adaptés pour suivre la cuisson de la viande et du poisson. Les techniques spectroscopiques (fluorescence, visible, proche et moyen infrarouge) nous ont permis d'observer la dénaturation des protéines. Les changements des spectres observés selon le degré de cuisson correspondent au niveau moléculaire à des modifications de la structure de la myosine et de l'hémoglobine. Ces changements de conformation des fractions protéiques (niveau moléculaire) sont responsables au niveau macroscopique des changements de tendreté (contraction des fibres) ou de couleur (passage de l'oxy-Hb à la met-Hb). La figure 90 récapitule les principaux résultats de cette approche au niveau moléculaire.

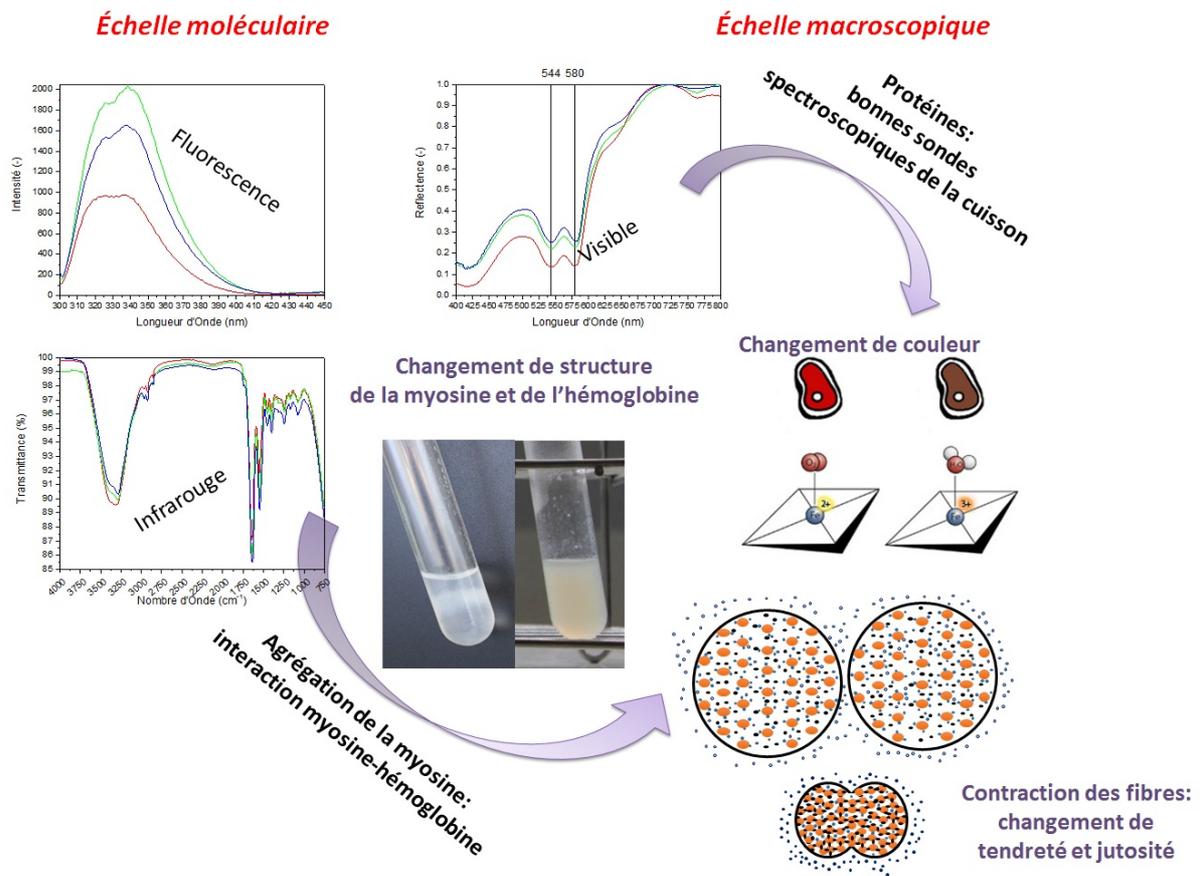


Figure 90 : Schéma de synthèse : techniques spectroscopiques utilisées pour observer à l'échelle moléculaire la dénaturation des protéines et rendre compte des observations macroscopiques (changement de couleur, de tendreté et de jutosité) selon le degré de cuisson de viande et de poisson.

Partie 2 : Échelle microscopique

Contraction des fibres et libération du jus selon les degrés de cuisson étudiés par RMN et tomographie de neutrons

Dans la première partie de la thèse, nous avons étudié l'effet de la température sur les fractions protéiques de viande et de poisson, grâce à différentes méthodes spectroscopiques (visible, infrarouge et fluorescence), qui nous ont donné des informations sur l'échantillon au niveau moléculaire. Le but était de trouver une (ou des) signature(s) spectroscopique(s) commune(s) aux différentes matrices du projet Opticook, associée(s) aux changements de structure des fractions protéiques, et discriminant le degré de cuisson. Pour trouver ces signatures spectroscopiques "universelles", nous avons travaillé à la fois sur les matrices complexes et sur un système modèle constitué de myosine et d'hémoglobine. L'ensemble des résultats obtenus nous a indiqué qu'il n'existe pas d'outil spectroscopique unique qui permette de suivre les différentes étapes de la cuisson de l'ensemble des matrices étudiées mais que la combinaison de la spectroscopie de fluorescence, et des spectroscopies dans le visible et l'infrarouge, est nécessaire pour discriminer le degré de cuisson. Comme supposé au début de cette étude, les marqueurs moléculaires qui sont alors sollicités sont la myosine, le collagène et les hémoprotéines. Nous avons pu constater dans cette première partie, que les changements de structure que subissent ces protéines à certaines températures clés, sont associées à des changements à d'autres échelles de structure (microscopique...) au travers d'interactions (agrégation, gels, séparation de phase,...) ou de la libération du jus.

Dans cette deuxième partie, nous avons voulu observer les échantillons à cette échelle (microscopique) afin de coupler des mesures qui permettraient de faire sur un même échantillon des observations en ligne (c'est-à-dire pendant la cuisson) aux différentes échelles moléculaires et microscopiques (Chapitre "résultats", partie 3). Nous avons étudié l'impact des barèmes de cuisson sur les modifications de structure de la matrice, qui impliquent à cette échelle microscopique, les myofibrilles et provoquent la libération du jus. Nous avons réalisé des mesures sur des échantillons de bœuf cuits à plusieurs degrés de cuisson en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN-bas champ) et la tomographie de neutrons.

Une des conclusions de la première partie était que les barèmes de cuisson choisis ne mettent pas en évidence les différences parmi les trois degrés de cuisson, surtout entre le protocole Sous Cuit et Bien Cuit. Ceci était sans doute associé au fait que les températures à cœur entre ces deux échantillons étaient trop proches : 45 et 52 °C, respectivement. Nous avons gardé le protocole Sous Cuit (SC), et le protocole Trop Cuit (TC) (68 °C), en ajoutant le protocole dit Trop Trop Cuit (TTC), avec une sortie de l'échantillon du four quand sa température à cœur était de 90 °C. Pour valider ces différents degrés de cuisson, nous avons réalisé des mesures de calorimétrie sur les différents échantillons après cuisson. La figure 91 montre les thermogrammes des échantillons de viande cru et cuits à plusieurs températures à cœur.

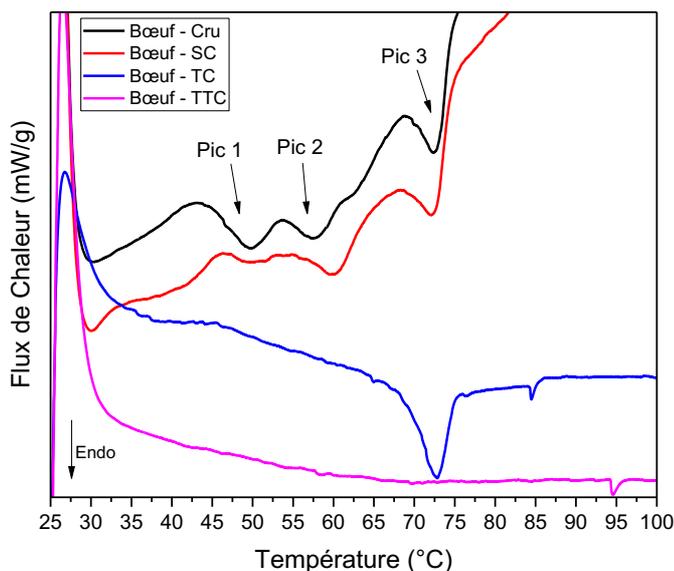


Figure 91 : Thermogrammes obtenus sur des échantillons de viande de bœuf : Cru (noir), Sous Cuit (SC, rouge), Trop Cuit (TC, vert), Trop Trop Cuit (TTC, magenta).

Le tableau 18 récapitule les températures des transitions observées par calorimétrie (pics endothermiques) de la viande, après la cuisson au four.

Tableau 18 : Températures de transition (de début du pic de dénaturation et du pic) observées dans la viande après la cuisson. 10 répétitions ont été réalisées pour chaque barème de cuisson appliqué.

Barème de Cuisson Rond Parisien	Paramètre	Cru	Sous Cuit	Bien Cuit	Trop Trop Cuit
Pic 1	T _{onset}	46,84 ± 2,24	46,48 ± 0,59	/	/
	T _{pic}	50,32 ± 1,84	50,62 ± 1,39	/	/
Pic 2	T _{onset}	55,09 ± 0,64	52,98 ± 2,30	/	/
	T _{pic}	58,35 ± 1,32	56,62 ± 2,24	/	/
Pic 3	T _{onset}	69,61 ± 0,34	68,91 ± 0,44	67,32 ± 1,96	/
	T _{pic}	72,86 ± 0,28	72,32 ± 0,51	71,60 ± 1,68	/

Ces mesures de calorimétrie valident les barèmes de température que nous allons appliquer aux échantillons étudiés par RMN bas champ et tomographie de neutrons. L'échantillon Cru montre 3 pics endothermiques relatifs à la myosine, aux protéines sarcoplasmiques et du tissu conjonctif et à l'actine, respectivement vers 50, 60 et 75 °C. En appliquant les nouveaux barèmes de température, les pics endothermiques vont disparaître un à un (Bertram et al., 2006b). L'échantillon Sous Cuit (45 °C à cœur) ne montre plus le pic endothermique de la myosine. Par contre, les pics endothermiques des autres protéines (sarcoplasmiques, tissu conjonctif et actine) sont toujours présents. L'échantillon Trop Cuit (68 °C à cœur) ne met plus en évidence que le pic de l'actine, alors que toutes les autres familles de protéines sont dénaturées. Enfin l'échantillon Trop Trop Cuit (90 °C à cœur) ne laisse plus apparaître aucun pic endothermique, en effet à cette température toutes les protéines sont dénaturées.

La figure 92 présente les teneurs en eau des échantillons de viande selon les différents protocoles de cuisson, en mettant en évidence des différences significatives lorsque les températures à cœur atteignent 68 °C et 90 °C (protocoles de cuisson Trop Cuit et Trop Trop

Contraction des fibres et libération du jus selon les degrés de cuisson étudiés par RMN et tomographie de neutrons

Cuit). Les teneurs en eau des échantillons Cru et Sous Cuit sont d'environ 72,5 %, alors qu'elles diminuent à 70 % et 60 % pour les échantillons Trop Cuit et Trop Trop Cuit (Lawrie et Ledward, 2006).

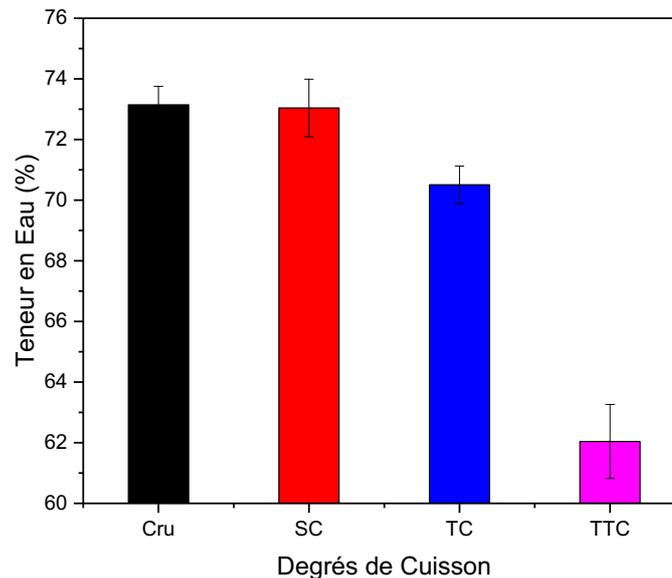


Figure 92 : Teneurs en eau des échantillons de viande selon le degré de cuisson. L'analyse a été réalisée par séchage en étuve (température 104 °C). 33 échantillons par degré de cuisson ont été analysés.

La figure 92 montre que la rétention d'eau des échantillons est très influencée par l'état des protéines, natives ou dénaturées, donc par l'organisation structurale des myofibrilles et du tissu conjonctif suite aux traitements thermiques. Il est en effet connu que les protéines du muscle sont responsables de la rétention de l'eau dans la viande (Hamm, 1960).

Les effets de la température et du mode de cuisson sur la distribution de l'eau dans la viande ont déjà été très étudiés car ils ont une grande répercussion sur la texture finale du produit cuit. Ainsi plusieurs populations d'eau ont été décrites dans la littérature (Hamm, 1960; Offer et Knight, 1988b), allant de l'eau de structure très peu mobile et en forte interaction avec les protéines fibrillaires (seulement 4 %), à l'eau très mobile associée aux protéines solubles ou se trouvant à l'intérieur des filaments.

Nous avons utilisé la RMN bas champ pour étudier plus précisément l'impact de nos barèmes de température sur ces différentes populations d'eau. Comme dans la littérature, différentes séquences, nous ont permis de nous focaliser sur ces différentes fractions. Dans un premier temps, nous avons appliqué une séquence de type CPMG pour étudier la fraction mobile, en accumulant 32 acquisitions, avec un temps de relaxation, τ , de 500 μ s, entre le pulse de 90° et 180°, en prenant 4 s de temps entre une acquisition et la suivante. Mille échos ont été enregistrés par acquisition. La figure 93 présente des exemples de spectres CPMG enregistrés pour les échantillons Cru, Sous Cuit, Trop Cuit et Trop Trop Cuit.

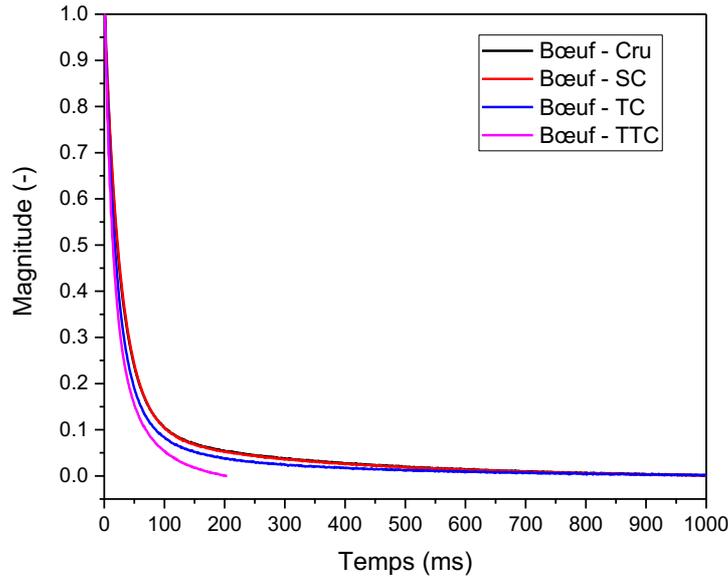


Figure 93 : Exemples de courbes RMN obtenues en utilisant la séquence CPMG (τ de 500 μ s). La courbe noire représente l'échantillon Cru, la rouge l'échantillon Sous Cuit, la bleue l'échantillon Trop Cuit, la magenta l'échantillon Trop Trop Cuit.

Nous avons analysé ces courbes en les décomposant en fonction exponentielle décroissante à deux composantes qui ajuste bien la courbe expérimentale. Donc, il y a au moins 2 populations “statistiques” détectées par l'équation (15).

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{x}{t_2}} \quad (15)$$

La figure 94 présente les temps de relaxations T_2 de ces deux populations, et leur intensité (magnitude) relative, en fonction du degré de cuisson.

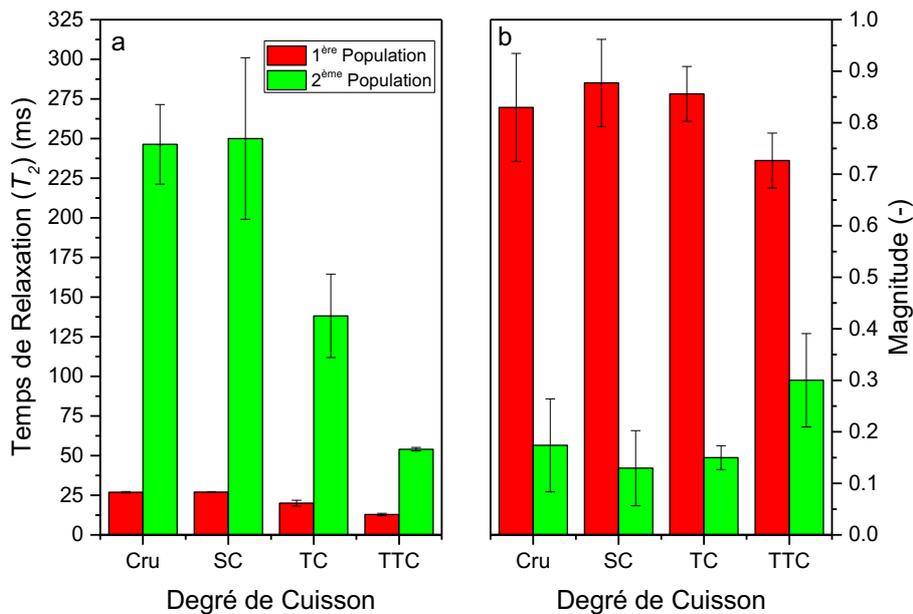


Figure 94 : Représentation des temps de relaxation T_2 (a) et de leurs magnitudes (b) des deux populations de protons en fonction du degré de cuisson, suite aux traitements des courbes obtenues par la séquence CPMG. On trouve en vert, la population de protons la plus mobile et en rouge, la population de protons la moins mobile.

Le temps de relaxation de la population la plus mobile (en vert) tend à diminuer d'environ 250 ms à environ 50 ms, en augmentant le degré de cuisson des échantillons. Pour rappel, plus un temps de relaxation est court, moins les protons qui sont concernés sont mobiles. L'évolution de son intensité est moins nette. Elle a tendance à augmenter avec l'augmentation du degré de cuisson. La réduction du temps de relaxation, donc la tendance de la deuxième population à devenir plus rigide peut être liée à la réduction de la teneur en eau suite à l'application des barèmes de cuisson (figure 92). La population la moins mobile (en rouge) tend à relaxer plus rapidement en augmentant le degré de cuisson (de 25 à 15 ms), en mettant en évidence une population de plus en plus rigide, alors que la magnitude tend à diminuer. Cette diminution des temps de relaxation des deux fractions de protons (mobile et rigide) des échantillons en augmentant le degré de cuisson peut être associée aux changements physicochimiques qui se produisent pendant la cuisson : la dénaturation des protéines avec une réorganisation de la microstructure musculaire et la perte en jus.

Compte tenu de la sensibilité de la séquence CPMG pour la partie mobile de l'échantillon, avec un T_2 le plus petit détecté autour de 15 ms, nous avons voulu étudier la composante en plus forte interaction des différents échantillons, en utilisant les séquences de l'écho de Hahn et de l'écho de Solide. La figure 48 montre des exemples de courbes enregistrées avec ces deux séquences, l'écho de Hahn (a) et à l'écho de Solide (b) et la figure 95 montre la différence entre l'écho de Hahn et l'écho de Solide en fonction du degré de cuisson.

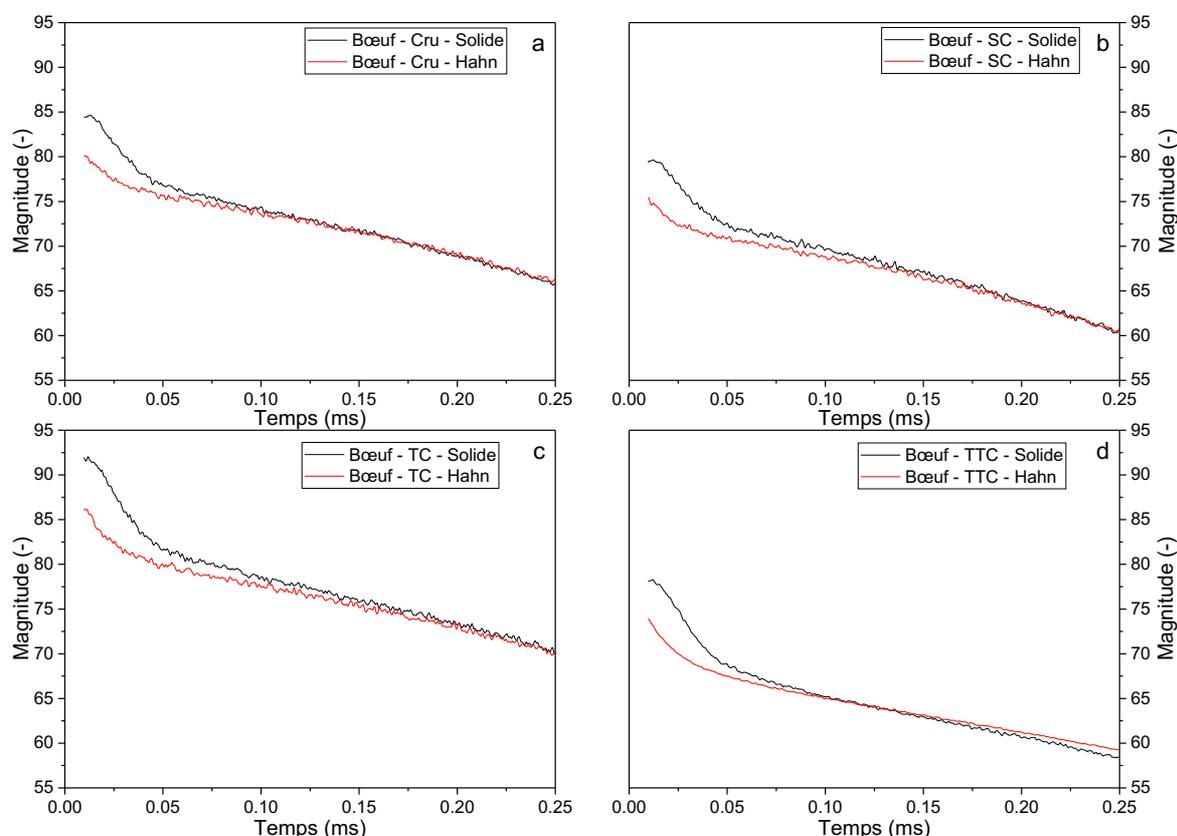


Figure 95 : Exemples de courbes RMN obtenues en utilisant la séquence des échos de Hahn (rouge) et de Solide (noir) (τ 9.5 μ s) en fonction du degré de cuisson : (a) Cru ; (b) Sous Cuit ; (c) Trop Cuit ; (d) Trop Trop Cuit. La différence entre la courbe rouge et la courbe noire correspond à la fraction la plus rigide, c'est à dire à la fraction des protons en forte interaction avec la matrice. Cette différence semble évoluer selon le degré de cuisson.

Contraction des fibres et libération du jus selon les degrés de cuisson étudiés par RMN et tomographie de neutrons

L'analyse des courbes a débuté par l'analyse des données obtenues avec les échos de Hahn (composante moins mobile, entre 0,05 et 0,9 ms), puis a été suivie par celle des résultats obtenus avec les échos de Solide (fraction de protons en forte interaction dipolaire, entre 0 et 0,1 ms) (Fujimoto et al., 1972).

La déconvolution des spectres a été réalisée au travers de l'équation de Weibull (16) et de l'équation Gaussienne (19) mettant en évidence deux populations de protons. La figure 96 présente les résultats des ajustements des courbes, obtenus en utilisant les séquences des échos de Hahn et du Solide en fonction du degré de cuisson.

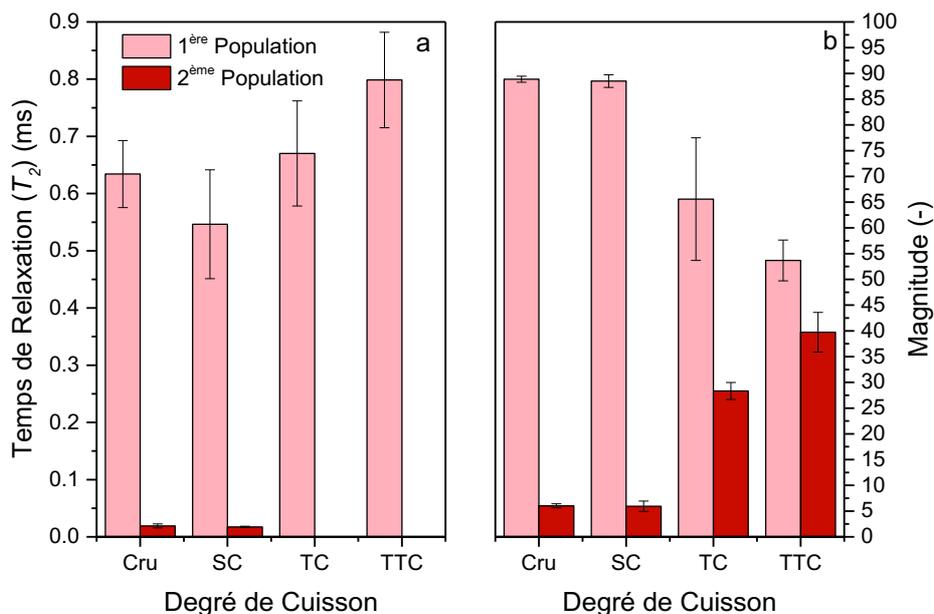


Figure 96 : Représentation des temps de relaxation T_2 (a) et des magnitude (b) des trois populations de protons obtenues après les expériences des échos de Hahn et de Solide en fonction du degré de cuisson.

Ces résultats nous montrent que quelle que soit la fraction de protons considérée, le degré de cuisson Sous Cuit est assez proche du Cru, alors que le Trop Cuit et le Trop Trop Cuit sont différents.

Le temps de relaxation T_2 de la population plus mobile (en rose) tend à augmenter en fonction du degré de cuisson (de 500 à 900 μ s). Cette fraction de protons devient donc plus mobile en augmentant le degré de cuisson. Il est possible qu'une fraction de l'eau en très forte interaction avec la matrice, se libère suite à la dénaturation des myofibrilles et du tissu conjonctif. Par contre, suite à ces dénaturations de nouvelles interactions interprotéiques sont créées avec de nouvelles structures plus rigides, qui se traduisent en RMN par la diminution des temps de relaxation de la fraction de protons en forte interaction dipolaire observée avec l'écho de Solide et l'augmentation de son amplitude. Cette population (rouge foncé) des échantillons Cru et Sous Cuit (45 °C) est caractérisée par des temps de relaxation de l'ordre de 10 μ s et de faible intensité. Pour ce qui concerne les échantillons Trop Cuit et Trop Trop Cuit, l'amplitude de ces fractions de protons rigides est plus importante, alors que leur T_2 tend être plus faible.

Nous avons déterminé, le nombre de protons des échantillons analysés par les trois séquences de RMN et comparé ces résultats avec le nombre de protons obtenus à partir de la matière sèche.

Contraction des fibres et libération du jus selon les degrés de cuisson étudiés par RMN et tomographie de neutrons

La figure 97 présente la comparaison du nombre de protons issus des séquences RMN et issu des analyses de la matière sèche.

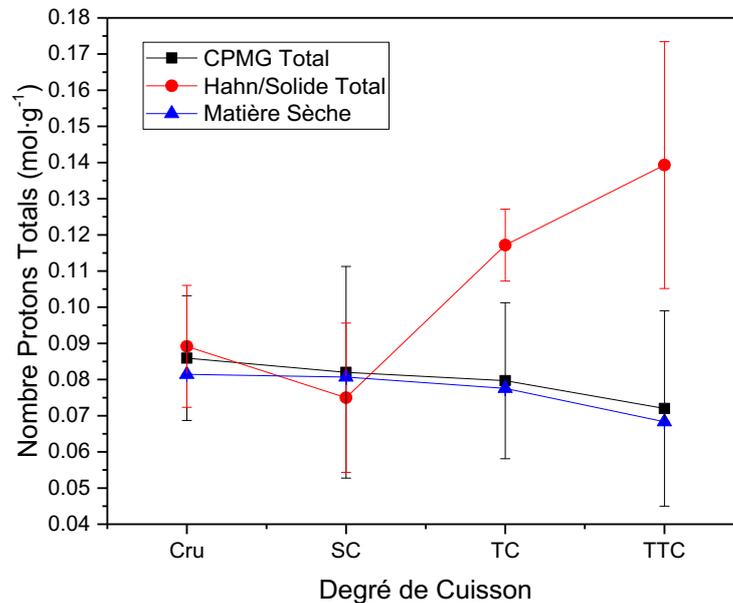


Figure 97 : Représentation du nombre de protons des séquences RMN de CPMG (noir), des échos de Hahn et de Solide (ensemble, rouge) et issu de la matière sèche (bleu) en fonction du degré de cuisson.

La figure 97 montre que les nombres de protons évalués par la séquence CPMG et par matière sèche sont similaires et que ce nombre diminue lorsque l'on augmente le degré de cuisson. Cela peut être mis en relation avec la perte en eau qui se produit lors de la cuisson. Le nombre de protons évalué à l'aide de l'écho de Hahn et de l'écho de Solide tend à augmenter à température plus élevée.

Une expérience complémentaire à ces mesures de temps de relaxation est la mesure des coefficients de diffusion des protons en utilisant la RMN à gradient de champ pulsé. Nous avons utilisé la séquence de *Stejskal-Tanner* qui ajoute un gradient bipolaire à la séquence de Hahn : un avant le pulse de 180° et un après (Stejskal et Tanner, 1965). L'application de ces deux gradients de champ a pour but de marquer magnétiquement les spins. L'expérience est caractérisée par plusieurs paramètres : le temps d'application de chaque gradient (δ) de 0.5 ms ; le temps entre le début de l'application des deux gradients (Δ) de 7.5 ms. Nous avons fait varier l'intensité du gradient (G) entre 5 et 75 %, par rapport à la force du champ magnétique du générateur de gradient (4 T·m⁻¹). La figure 98 présente l'évolution du coefficient de diffusion en fonction du degré de cuisson de différents échantillons de viande.

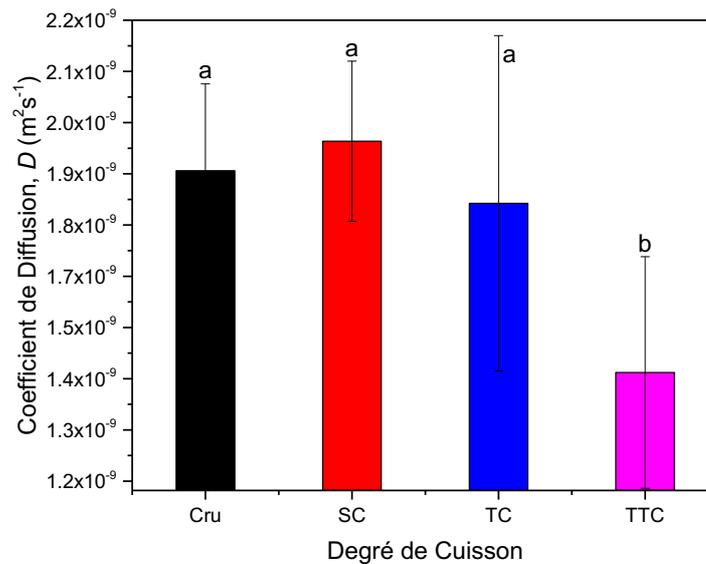


Figure 98 : Représentation de l'évolution du coefficient de diffusion, D ($m^2 \cdot s^{-1}$), en fonction du degré de cuisson d'échantillons de viande de bœuf. Les lettres indiquent l'appartenance de l'échantillon au groupe a ou b, d'après l'ANOVA à 1 facteur et le test de comparaison des moyennes de Tukey ($\alpha = 0.05$; taille de l'échantillon : trois répétitions). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance.

L'échantillon Cru présente une valeur du coefficient de diffusion, D , d'environ $1,8-1,9 \times 10^{-9} m^2 \cdot s^{-1}$ ce qui est en accord avec les résultats déjà obtenus sur ce type d'échantillon et trouvés dans la littérature (Morvan et Leroy-Willig, 1995). Le coefficient de diffusion de l'échantillon Sous Cuit (45 °C) tend à augmenter, par rapport au Cru. Cette augmentation peut être mise en relation avec la dénaturation du filament de myosine. En effet, la dénaturation change les interactions entre la myosine et l'eau, de façon à rendre l'eau plus mobile (figure 94, deuxième population représentée en vert). La réduction de la diffusion pour les deux autres échantillons, Trop Cuit (68 °C) et Trop Trop Cuit (90 °C) est à imputer à la teneur en eau réduite (-2,5 et -12 %), et à l'effet de la réorganisation de la microstructure fibrillaire et extracellulaire qui se produit à température plus élevée.

Pour approfondir ces résultats de RMN, nous avons réalisé des expériences de tomographie de neutrons, afin d'observer la contraction des fibres de l'échantillon de viande, donc d'observer la formation de zones plus ou moins denses en fibres en fonction du degré de cuisson et, d'étudier l'évolution de sa morphologie. Pour caractériser précisément ces changements de morphologie de l'échantillon d'autant plus nets que l'on augmente la température de cuisson et les défauts des échantillons de viande dans ces expériences de tomographie, nous nous sommes servis du logiciel d'analyse des images 3D Avizo Fire 8.1.1 (FEI, Hillsboro, Oregon USA) et du module "Porosities Analysis Wizard". Ce logiciel, permet de quantifier le volume occupé par les défauts dans les échantillons, et de les classer selon leur taille grâce à l'analyse des reconstructions 3D.

La figure 99 montre la visualisation de la distribution 3D des défauts, gros et petits, dans les échantillons Cru (a), Sous Cuit (b), Trop Cuit (c) et Trop Trop Cuit (d) après l'application de cette procédure d'analyse. Les zones que nous considérons comme "défaut" sont des zones qui possèdent des contrastes différentes par rapport à l'échantillon.

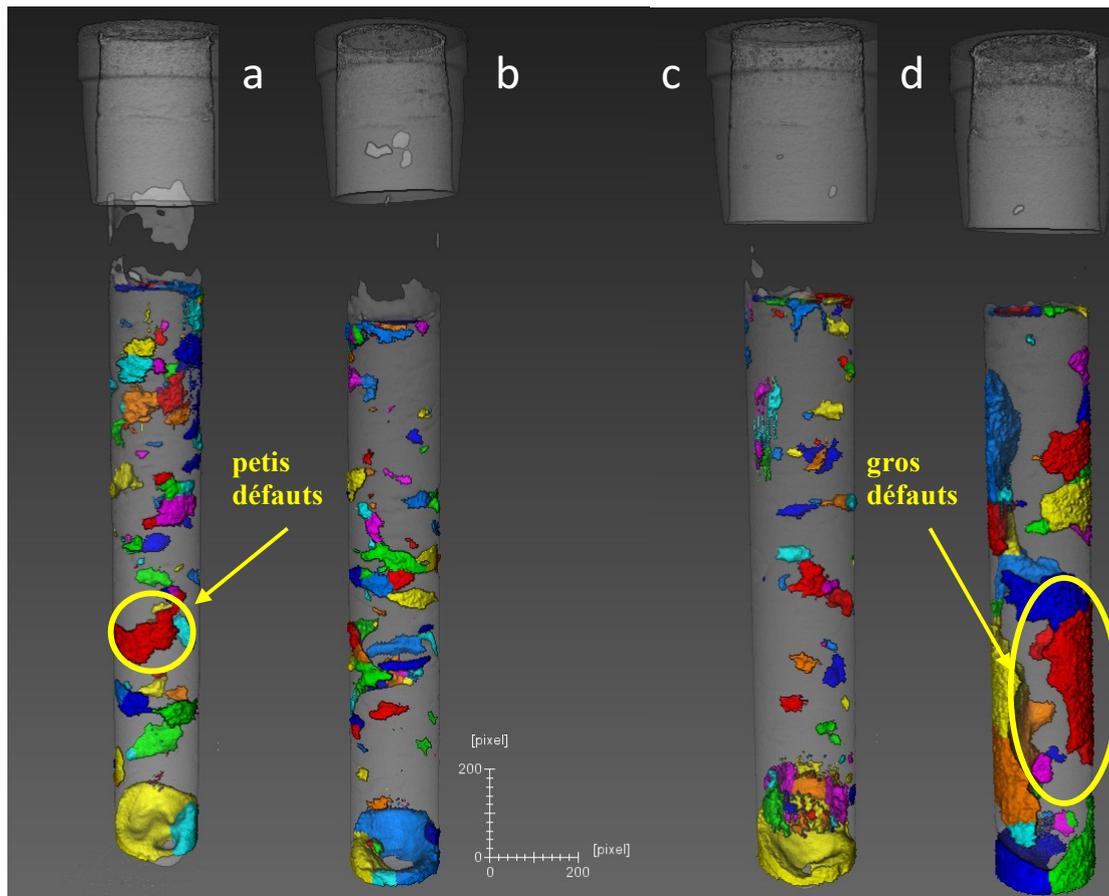


Figure 99 : Échantillons de viande reconstruits en 3D (a Cru, b Sous Cuit, c Trop Cuit, d Trop Trop Cuit). Les images montrent la visualisation en couleurs des défauts présents dans les échantillons, grâce à l'analyse d'images 3D réalisée avec le logiciel AVIZO. En effet, à partir de paramètres rentrés dans le *Wizard*, ce logiciel a rempli les défauts avec des "pièces" de pixels de plusieurs couleurs pour les séparer les uns des autres.

La figure 100 montre des exemples de visualisation de tranches présentées en échelle de gris (première ligne) et après l'analyse des défauts (deuxième ligne), pour les échantillons Cru (a), Sous Cuit (b), Trop Cuit (c), Trop Trop Cuit (d).

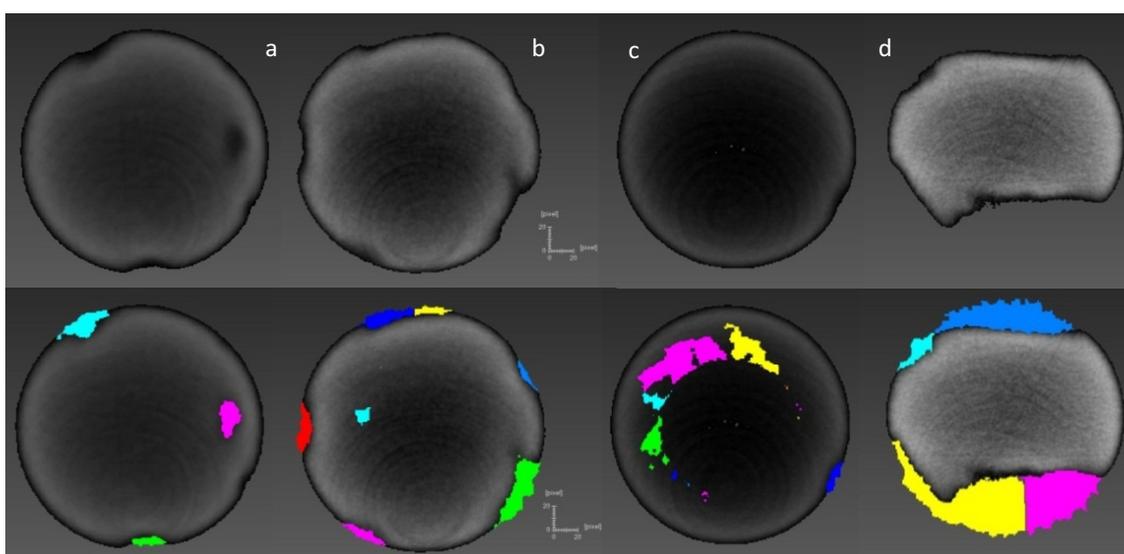


Figure 100 : Représentation de tranches des échantillons de viande reconstruits et analysés par AVIZO. La première ligne présente les tranches en échelle de gris, alors que la deuxième ligne présente les mêmes tranches avec les défauts remplis par des pixels colorés, après l'analyse des défauts. a) Cru, b) Sous Cuit, c) Trop Cuit, d) Trop Trop Cuit.

Contraction des fibres et libération du jus selon les degrés de cuisson étudiés par RMN et tomographie de neutrons

Les figure 99 et figure 100 montrent que les échantillons Cru et Sous Cuit sont caractérisés par la présence de défauts plutôt petits et localisés à la surface et à l'intérieur de l'échantillon même, alors que les défauts des échantillons Trop Cuit et Trop Trop Cuit sont localisés plutôt à la surface et ont une taille plus importante.

Nous avons d'abord analysé l'évolution de la morphologie. Nous avons déterminé le volume de l'échantillon contenu dans le tube d'aluminium (en px^3), en estimant son rayon et sa hauteur. Pour essayer de "corriger" le fait que le cylindre de viande n'était pas un cylindre parfait, nous avons fait la moyenne de six diamètres et six hauteurs. La figure 101 présente l'évolution de la morphologie en fonction du degré de cuisson.

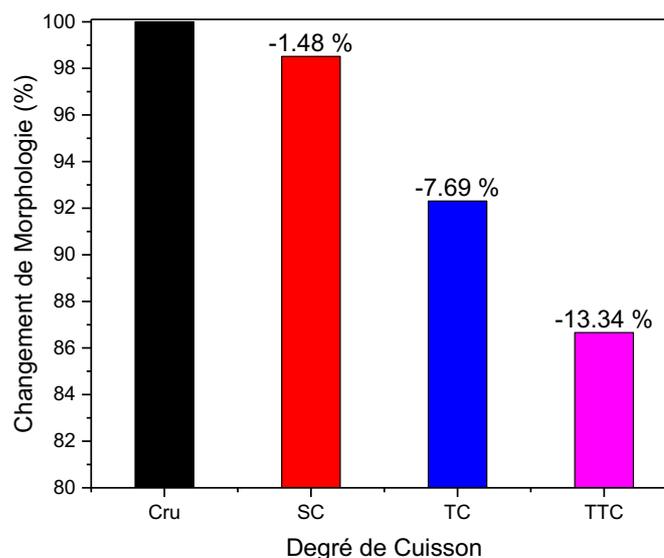


Figure 101 : Le graphique présente l'évolution de la morphologie, perte en volume, en fonction du degré de cuisson. Les valeurs sont présentées en pourcentage et les étiquettes expriment le pourcentage de perte. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque degré de cuisson.

Le graphique met en évidence que seulement petit changement de volume se produit sur l'échantillon Sous Cuit, alors qu'un changement plus important est observé à partir du degré de cuisson Trop Cuit.

Le logiciel AVIZO, à la fin de la procédure d'analyse des défauts, produit un tableau récapitulatif indiquant tous les défauts qui ont été détectés dans l'échantillon avec leur volume exprimé en pixel cube (px^3). La figure 102 présente le volume total de défauts par rapport au volume total de l'échantillon en fonction du degré de cuisson.

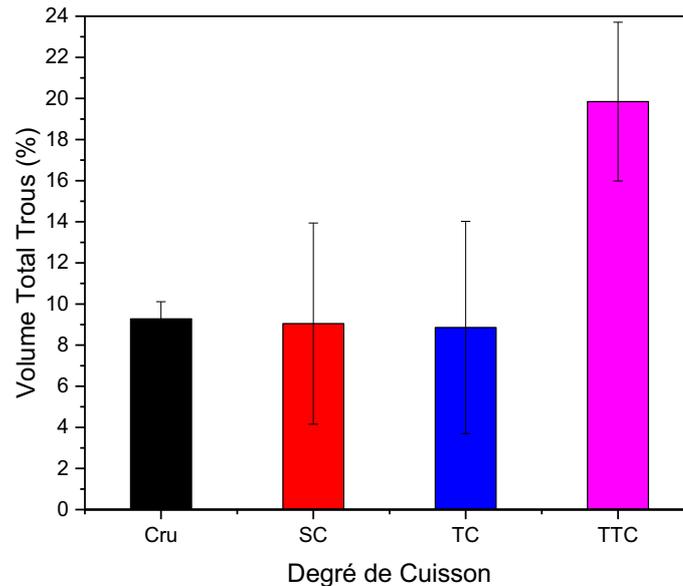


Figure 102 : Volume de défauts par rapport au volume total de l'échantillon, en fonction du degré de cuisson. 3 expériences ont été réalisées par degré de cuisson.

Le graphique met en évidence qu'il existe deux groupes dans les échantillons. Le premier groupe est composé des échantillons Cru, Sous Cuit et Trop Cuit. L'espace occupé par les défauts est similaire sur ces trois degrés de cuisson, mais les écarts type entre échantillons sont plus importants, pour les échantillons Sous Cuit et Trop Cuit. Le deuxième groupe est composé par le seul échantillon Trop Trop Cuit, pour lequel le volume occupé par les défauts est beaucoup plus important par rapport aux autres degrés de cuisson. Cette augmentation de volume de défauts pour l'échantillon Trop Trop Cuit peut être liée à une augmentation du nombre de défauts et/ou à l'augmentation de leur taille.

Nous avons alors cherché à déterminer la distribution de la taille des défauts en fonction du degré de cuisson. Nous avons choisi de séparer les défauts en deux groupes, les gros et les petits, en choisissant 0,075 % v/v (volume du défaut par rapport au volume total de l'échantillon) comme seuil. Cette répartition des défauts en fonction du degré de cuisson est montrée en figure 103.

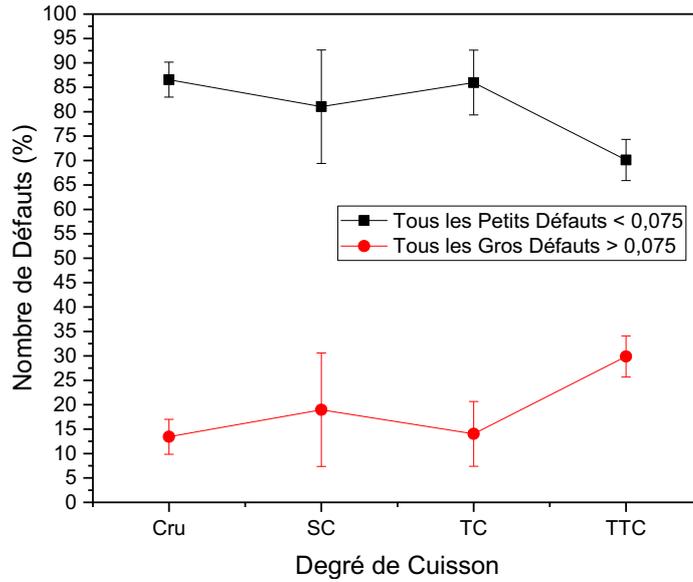


Figure 103 : Représentation des allures du nombre de défauts en fonction de leur taille et en fonction du degré de cuisson. Les défauts inférieurs à 0,075 % sont indiqués en noir et en rouge ceux qui sont supérieurs à 0,075. Le choix de ce seuil a été fait en observant que les changements de taille se vérifient entre le seuil 0,05 et 0,1 %. Le choix du seuil (0,075) a été fait à partir d’une étude préliminaire qui a considéré plusieurs autres seuils (de 0 à 2) qui ont indiqué que des changements de taille se vérifient en fonction de la température entre le seuil 0,05 et 0,1.

La figure 103 montre qu’environ 85 % des trous ont des petites tailles et que leur quantité ne diffère pas dans les échantillons Cru, Sous Cuit et Trop Cuit. Inversement, l’échantillon Trop Trop Cuit présente une quantité plus importante de gros défauts, environ 25 %, ce qui pourrait être lié à la contraction des fibres pendant la cuisson. Nous avons alors recherché si ces défauts étaient localisés à la surface ou à l’intérieur des échantillons. La figure 104 montre leur répartition en fonction du degré de cuisson.

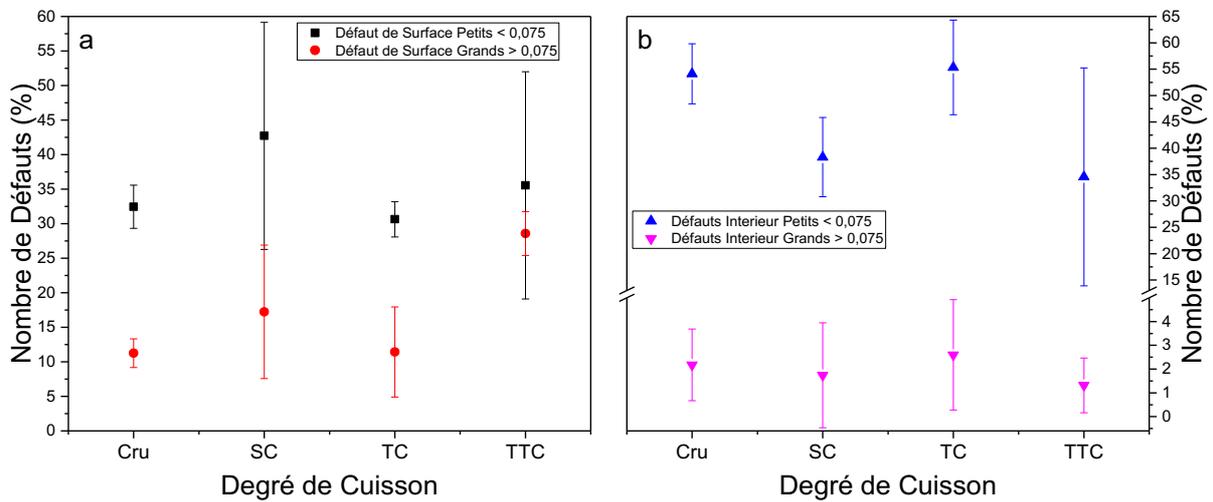


Figure 104 : Représentation des allures de défauts en surface et à l’intérieur de l’échantillon. La figure montre l’évolution des tailles des défauts (gros et petits) des morceaux de viande en fonction du degré de cuisson et en fonction de leur localisation : à la surface (lignes noir et rouge (a)) et à l’intérieur du morceau (lignes bleu et magenta (b)). La représentation des défauts de surface et internes, gros et petits, est présentée en pourcentage par rapport au contenu total, moyen, de défauts en fonction du degré de cuisson.

Les données mettent en évidence que les défauts de tailles supérieures au seuil de 0,075 ne sont pas à l’intérieur des échantillons quel que soit le degré de cuisson. Au contraire, ces gros défauts

Contraction des fibres et libération du jus selon les degrés de cuisson étudiés par RMN et tomographie de neutrons

sont plus à la surface et tendent à augmenter en fonction du degré de cuisson, en passant d'environ 10 % du Cru à environ 30 % du Trop Trop Cuit.

L'évolution des petits défauts est, par contre, plus variable, surtout à partir du degré de cuisson Sous Cuit. Cette variabilité plus importante pourrait être associée aux premiers changements structuraux que l'échantillon subit lorsque la température atteint 45 °C ce qui correspond au début de la dénaturation de la myosine et à la réduction du diamètre des myofibrilles et des fibres musculaires (Bendall et Restall, 1983; Offer et Trinick, 1983; Micklander et al., 2002). La diminution des petits défauts dans l'échantillon Trop Trop Cuit (90 °C) et l'augmentation des gros défauts de surface peuvent être liées à la fusion des micro-défauts à l'intérieur de l'échantillon et à sa surface ce qui permet de former des défauts de tailles plus importantes (figure 99 et figure 100 c et d). Ces changements sont peut-être dus à la dénaturation du collagène, de l'actine et à la contraction des fibres qui se passent entre 45 et 80 °C (Jackson et al., 1974; Offer et Trinick, 1983; Findlay et al., 1986; Tornberg, 1996; Micklander et al., 2002).

Résumé des principaux résultats et schéma de synthèse

Cette deuxième partie de la thèse, nous a permis de caractériser la structure des échantillons de bœuf à l'échelle microscopique (échelle des fibres). Les morceaux de bœuf ont été cuits selon les protocoles définis par les industriels (Sous Cuit, Trop Cuit) et en poussant la cuisson (Trop Trop Cuit). Nous avons réalisé des mesures de RMN bas champ en utilisant différentes séquences nous permettant de focaliser soit sur les protons les plus mobiles donc associés au jus (CPMG), soit sur les protons les plus rigides donc associés aux fibres (échos de Hahn et de Solide). En mettant en œuvre des expériences de RMN en mode gradient de champ, nous avons aussi mesuré les coefficients de diffusion de ces mêmes échantillons. Nous avons montré que la mobilité des protons des échantillons du barème de température Sous Cuit (45 °C) est assez proche de celle des échantillons Crus, et que celle des échantillons Trop Cuit (68 °C) est très similaire à celle des échantillons Trop Trop Cuit (90 °C). Par contre, nous n'observons pas de modification importante du coefficient de diffusion avant le barème Trop Trop Cuit. Ces résultats confirment (comme décrit dans la littérature et comme nous l'avons observé à l'échelle moléculaire) que la contraction musculaire (dénaturation des fibres) débute à faible température, mais que les changements importants de morphologie provoquant la libération du jus ont lieu à plus haute température. Les résultats de tomographie de neutrons avec l'analyse des images 3D obtenus en termes de quantité de défauts dans les échantillons et de changement de morphologie va dans le même sens : les modifications sont visibles sur l'échantillon Trop Trop Cuit donc après 68 °C. La figure 105 récapitule les événements qui se passent au niveau des myofibrilles (vision frontale et latérale) d'un muscle cru et cuit à faible et haute température. Dans un premier temps on peut observer la réduction du diamètre des myofibrilles (45-63 °C), puis la réduction de leurs longueurs (55-65 °C) (Bendall et Restall, 1983).

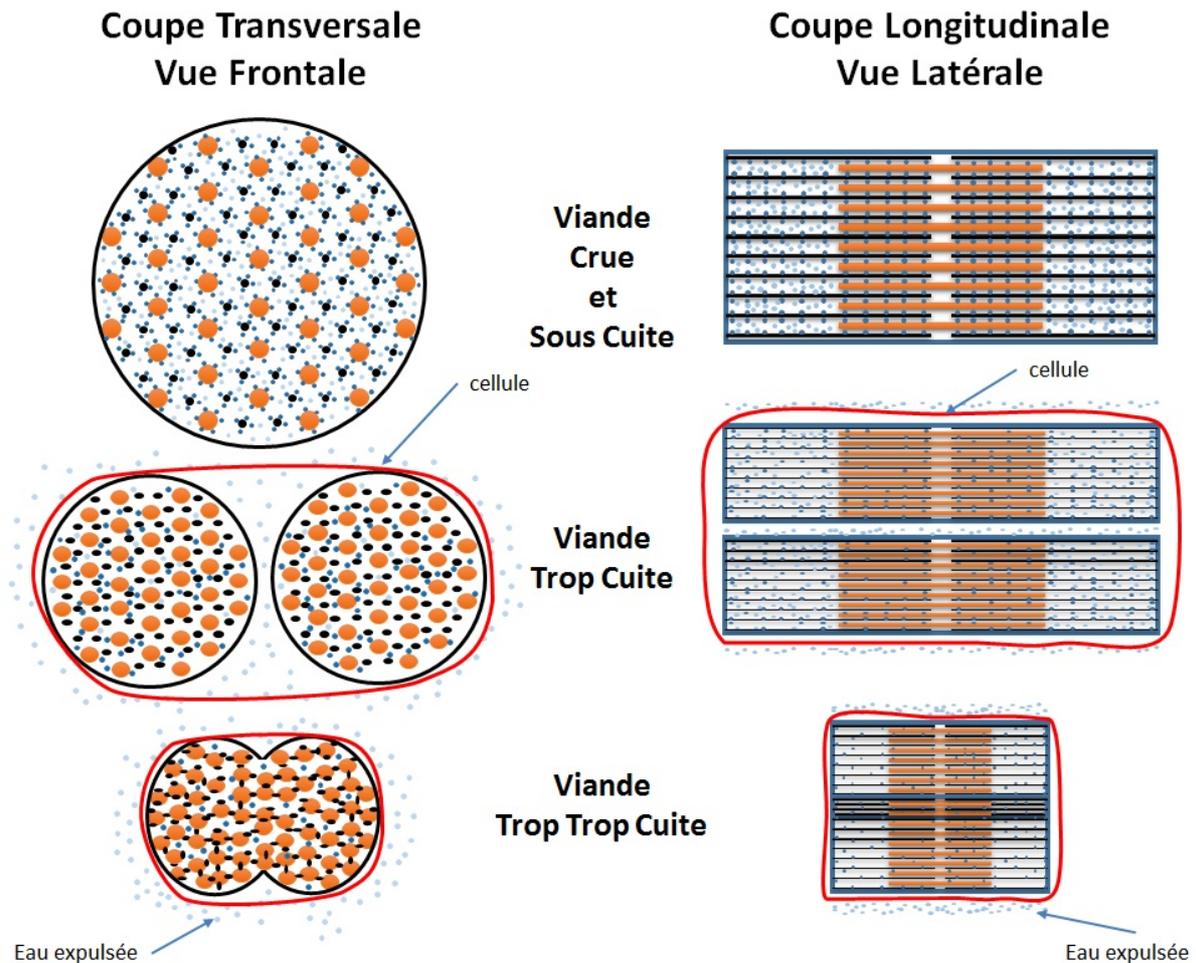


Figure 105 : Schéma de synthèse des événements observables au niveau microscopique lors de la cuisson.
Orange : filaments épais de myosine ; Noir : filaments minces d'actine ; Bleu foncé : eau en forte interaction avec les fibres ; Bleu clair : eau en faible interaction avec les fibres.
 a) présentation (vue frontale, gauche, et latérale, droite) de la structure d'une myofibrille à température ambiante : organisation très régulière des filaments de myosine et d'actine et de l'eau à l'intérieur de la structure myofibrillaire ;
 b) présentation de l'effet de la cuisson à température moyenne : la dénaturation de la myosine (42-55 °C) provoque la contraction latérale des myofibrilles (46-63 °C) et la sortie de l'eau vers les espaces intermyofibrillaires ;
 c) présentation de l'effet de la cuisson à haute température : la contraction du collagène, suite à sa dénaturation (57-66 °C) génère des forces longitudinales qui provoquent la réduction de la longueur des fibres musculaires (donc des myofibrilles). Les espaces disponibles pour l'eau diminuent et celle-ci tend à sortir vers la matrice extracellulaire. Pour finir, la dénaturation de l'actine se produit à plus haute température (76-80 °C), ce qui favorise la formation de nouvelles interactions, en créant des nouvelles structures. L'eau est alors définitivement exclue du muscle.

Partie 3 : Couplage moléculaire et microscopique

Suivi de la cuisson en ligne avec le couplage de l'imagerie neutronique et de la spectroscopie

Dans les deux précédentes parties de la thèse, nous avons recherché l'impact de la cuisson en observant ses effets sur la structure des protéines, en faisant des observations à différentes échelles. Nous avons observé, à l'échelle moléculaire, le système complexe (deux matrices viandes et une matrice poisson) et un système modèle (constitué de deux protéines de la viande), avec différentes méthodes spectroscopiques (visible, infrarouge et fluorescence) afin de détecter des signatures spectroscopiques communes à toutes les matrices, en fonction du degré de cuisson. Dans la deuxième partie, nous avons recherché les signatures de la cuisson à l'échelle microscopique, c'est-à-dire à l'échelle des fibres. Nous avons utilisé la RMN bas champ pour caractériser les évolutions de mobilité des protons associés au jus ou aux fibres en fonction du degré de cuisson. Nous avons caractérisé et visualisé ces changements structuraux par tomographie de neutrons. Nous avons en particulier déterminé la distribution des trous et leur localisation, à la surface et l'intérieur de l'échantillon. L'un des inconvénients de l'ensemble de ces mesures était leur réalisation après la cuisson, en utilisant des protocoles de cuisson validés selon des critères macroscopiques : changements de texture et de couleur.

Ainsi l'un des objectifs de cette dernière partie a été de faire des mesures en cours de cuisson en couplant les observations aux échelles moléculaires et microscopiques afin de s'affranchir du choix du protocole de cuisson. À l'échelle microscopique, nous avons utilisé l'imagerie de neutrons pour suivre la contraction des fibres et la migration du jus en fonction de la température. À l'échelle moléculaire, nous avons utilisé une fibre optique pour suivre la dénaturation des protéines de la viande par spectroscopie visible et de fluorescence. Ce couplage a été réalisé dans le four du programme Opticook.

Imagerie de neutrons

L'imagerie de neutrons est une technique capable d'observer à l'échelle microscopique (quelques centaines de micromètres de résolution) la structure d'objets d'une taille de l'ordre de quelques centimètres (Lehmann et al., 2011a; Lehmann et al., 2011b). Les expériences d'imagerie de neutrons sont réalisées en transmission. Les neutrons passent à travers la matière en interagissant très spécifiquement avec les hydrogènes qui la composent (Tanoi et al., 2009; Rudolph et al., 2012; Aregawi et al., 2013; Lagorce-Tachon et al., 2015). Cette sensibilité entre neutrons et hydrogène nous permet d'observer les changements morphologiques causés par la contraction des fibres musculaires ou par la migration du jus. Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions idéales d'observation par imagerie de neutrons d'échantillons de viande suite à l'application de plusieurs barèmes de température (*expériences offline*), puis nous avons mené des cuissons en ligne sur un four modèle et sur le four du programme Opticook (*expériences online*).

Les images de transmittance (T) collectées ont été converties en coefficient d'atténuation multiplié par l'épaisseur ($\Sigma * Zeta$) à travers l'équation de Beer-Lambert (26).

$$\Sigma \cdot Z = -\ln T \tag{26}$$

Cette équation a été intégrée avec des paramètres de corrections issus d'un ajustement des valeurs de transmittance de plusieurs épaisseurs d'eau, afin d'enlever les effets de la diffusion multiple liée à la trop grande épaisseur de l'eau et de l'échantillon. La figure 106 présente les données de transmittance mesurées (points noirs) en fonction de l'épaisseur d'eau (0-0,5 cm) et les deux ajustements avec des fonctions exponentielles : modèle 1 (30) (courbe noire) qui n'ajuste pas bien

$$y = e^{-A \cdot x} \tag{30}$$

et modèle 2 (25) (courbe rouge) qui par contre ajuste très bien les données expérimentales.

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} \tag{25}$$

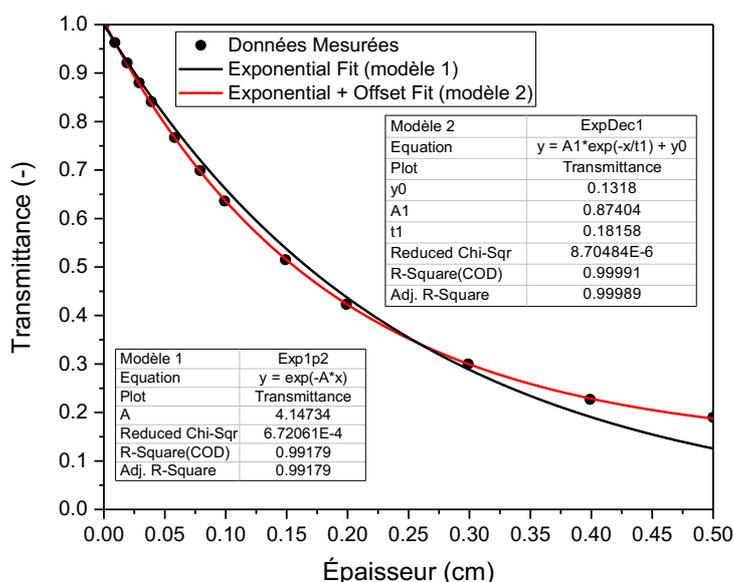


Figure 106 : Présentation des données expérimentales de transmittance en fonction de l'épaisseur d'une cuve d'aluminium remplie d'eau (les points noirs) et les ajustements réalisés par les équations (30) (courbe noire) et (25) (courbe rouge), dont les paramètres estimés ont permis de corriger l'effet de la diffusion multiple pour des épaisseurs supérieures à 2 mm.

À partir de ces paramètres estimés, nous avons corrigé l'équation (26) de façon suivante (31)

$$\Sigma \cdot Z = -\ln \left(\frac{T - a}{b} \right) \cdot c \tag{31}$$

où T est la transmittance et a , b et c sont les paramètres estimés

- a , 0,1318 (y_0) ;
- b , 0,87404 (A_1) ;
- c , 0,18158 (t_1).

Expériences offline

La première étape a été de trouver l'épaisseur la plus adéquate afin d'obtenir des valeurs de transmission d'environ 40%. Les tranches de bœuf (hauteur d'environ 3,5-4,5 cm et longueur d'environ 6 cm) ont été coupées à l'aide d'une trancheuse à jambon. Les épaisseurs ont été vérifiées à l'aide d'un pied à coulisse. Nous avons essayé plusieurs épaisseurs, 1, 2, 3 et 4 mm, et les images ont été collectées en positionnant l'échantillon dans un porte échantillon en aluminium le plus près possible du scintillateur. La figure 107 montre les images de tranches de quatre épaisseurs (à gauche) et de leur profil d'atténuation (à droite) pris à 36 mm (28 mm pour la tranche correspondante à 2 mm d'épaisseur).

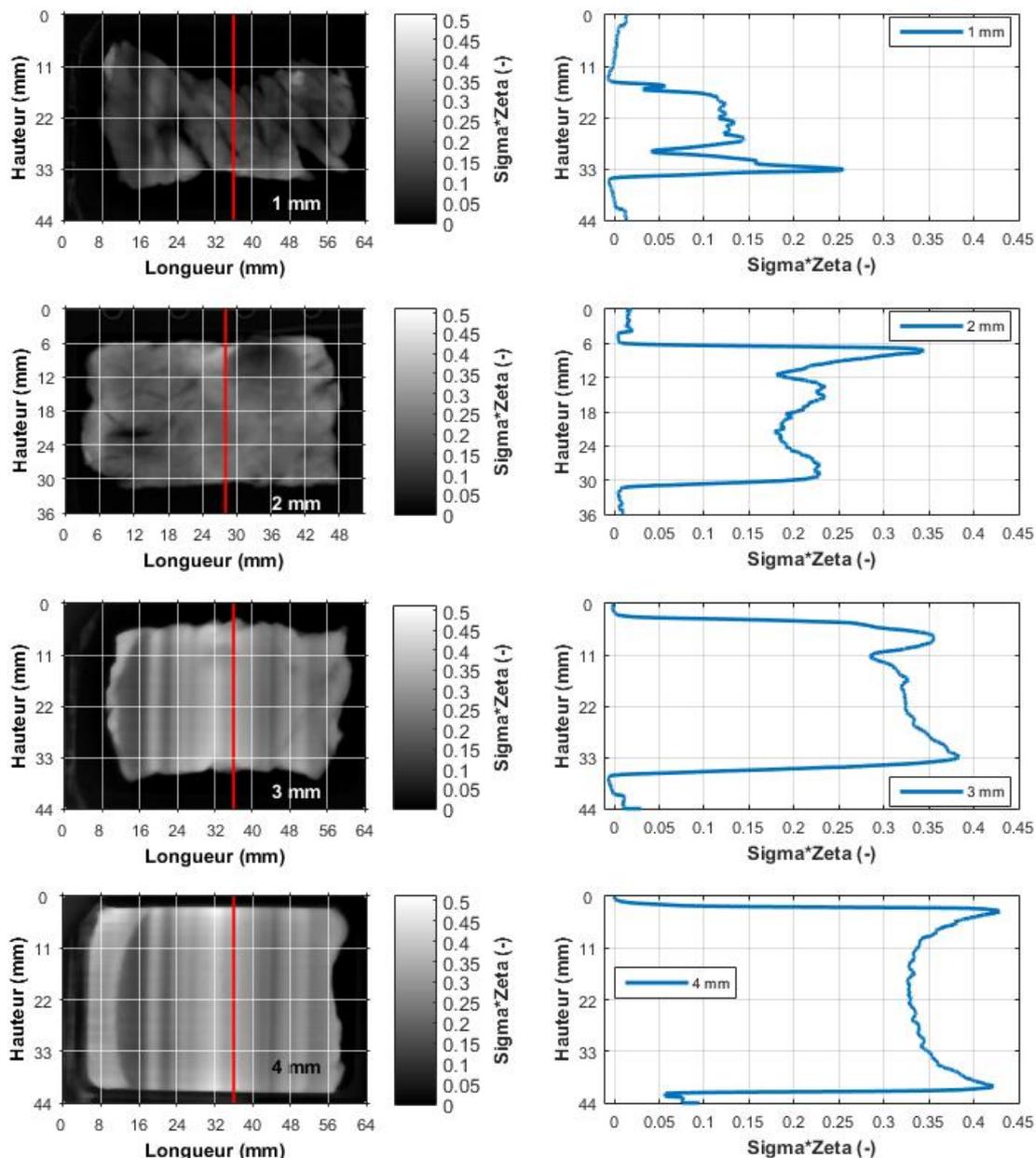


Figure 107 : Comparaison des images neutroniques (sur la gauche) et des profils de Sigma*Zeta correspondants (sur la droite) du rond parisien en fonction de l'épaisseur des tranches : 1, 2, 3 et 4 mm. Les profils ont été collectés à 36 mm (et 28 mm tranche de 2 mm d'épaisseur) (hauteur) des images et représentent le paramètre Sigma*Zeta en fonction de la position à l'intérieur de la cellule d'aluminium. Les valeurs de Sigma*Zeta proches de 0 (noir) sont liées au porte échantillon (en aluminium) alors que, les valeurs proches de 0,45 signifient l'absorption totale des neutrons par l'échantillon. Entre ces deux valeurs, l'absorption des neutrons par l'échantillon dépend de son épaisseur et de sa composition chimique (tissu maigre, tissu gras et teneur en eau).

Les profils montrent l'évolution de l'atténuation en fonction de la position dans le porte échantillon en aluminium. Les valeurs d'atténuation sont proches de 0, lorsque les neutrons rencontrent le porte échantillon en aluminium (c'est un matériau transparent aux neutrons). Elles sont supérieures à 0 (jusqu'à 0,4) lorsque les neutrons sondent l'échantillon. La valeur dépend de l'épaisseur de l'échantillon. La tranche de bœuf de 1 mm d'épaisseur montre une atténuation moyenne d'environ 0,1 ; celle de 2 mm d'épaisseur présente une valeur d'atténuation d'environ 0,2 ; alors que pour celles de 3 et 4 mm d'épaisseur, l'atténuation de neutrons est comprise entre 0,3 et 0,4. Nous avons choisi de travailler sur une tranche de 2 mm d'épaisseur, l'épaisseur maximale pour être à l'intérieur de l'intervalle de linéarité de l'atténuation de neutrons (figure 106).

Nous avons réalisé des cuissons de tranches de bœuf de 2 mm dans le four jusqu'à atteindre une température dans l'échantillon de 45, 52, 68 °C (les températures à cœur des barèmes de cuisson Opticook) et en plus 90 et 100 °C pour pousser les effets de la cuisson. Le suivi de la température a été réalisé en introduisant un thermocouple à l'intérieur du porte échantillon (figure 108) et en arrêtant la cuisson une fois que la température cible était atteinte.

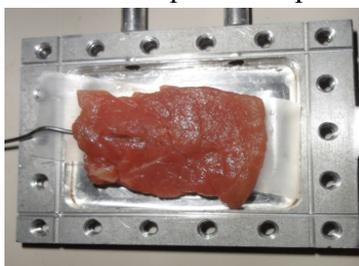


Figure 108 : Photographie d'un échantillon de viande de bœuf dans le porte échantillon en aluminium. La taille de l'échantillon était de 5 cm x 3 cm et de 2 mm d'épaisseur. Une sonde de température était placée dans l'échantillon pour suivre la température de cuisson.

La figure 109 montre la comparaison entre les images neutroniques obtenues pour l'échantillon cru et la même tranche cuite à 68 °C. Deux phénomènes sont observables : la réduction de la surface de l'échantillon cuit, à cause de la contraction des fibres et la migration du jus vers l'extérieur de la tranche. La ligne blanche sur l'image de l'échantillon cuit (à droite) représente le périmètre original de l'échantillon cru et elle met en évidence la différence de taille entre les deux échantillons.

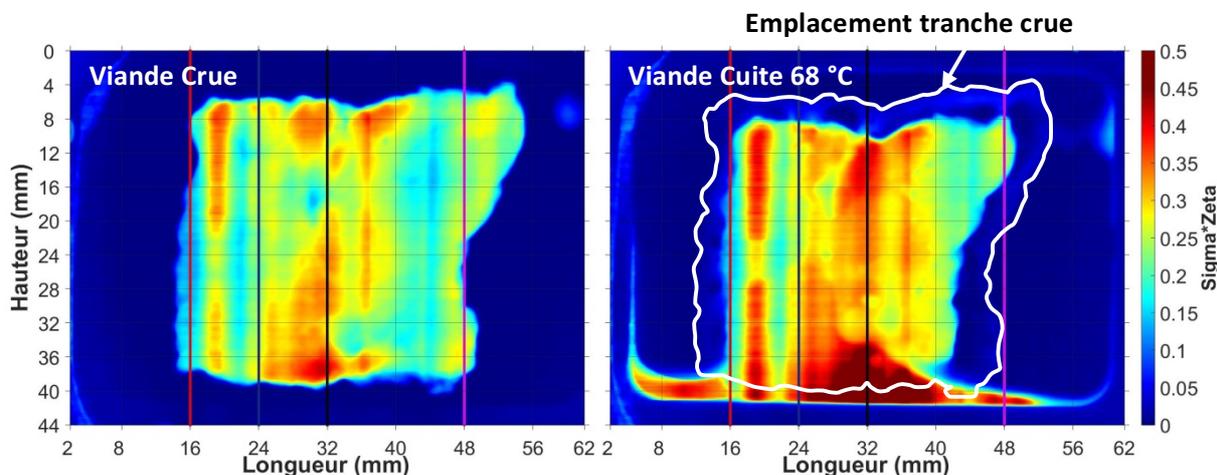


Figure 109 : Images neutroniques d'un échantillon de bœuf de 2 mm d'épaisseur, a) l'échantillon cru ; b) le même échantillon cuit à 68 °C. Les couleurs correspondent à différentes valeurs d'atténuation (de 0 à 0,5). Le périmètre initial (de l'échantillon cru) est montré par une ligne blanche superposée à l'image de l'échantillon cuit.

Nous avons comparé l'évolution des profils d'atténuation suite à la cuisson au niveau de quatre positions dans l'échantillon (16, 24, 32 and 48 mm) (figure 110).

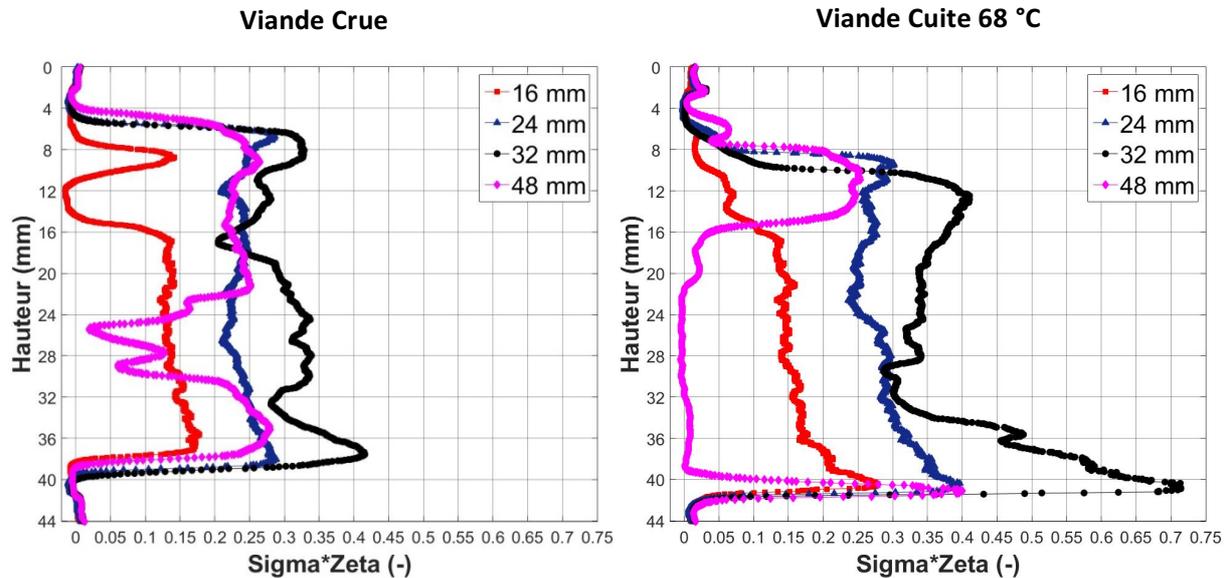


Figure 110 : Profils d'atténuation de neutrons pris à différentes positions des images (du haut vers le bas) : échantillon cru (a), échantillon cuit à 68 °C (b).

La figure 110 met en évidence les différences entre les atténuations des profils des échantillons cru et cuit. La comparaison des profils à 32 mm (les lignes de couleur noire) met en évidence des valeurs d'atténuation entre 0,3 et 0,4 pour les deux échantillons pour presque la totalité de la ligne de la tranche. L'atténuation dévient plus importante (jusqu'à 0,7) dans le cas de l'échantillon cuit quand les neutrons tapent contre le jus collecté en bas du porte échantillon.

La diminution de l'atténuation suite à la cuisson est associée à la contraction de l'échantillon. Le profil à 48 mm (magenta) de l'échantillon cuit montre la diminution de l'atténuation autour de 0 pour presque toute la hauteur de la tranche. D'autre part, sur l'échantillon cuit à 68 °C, la libération du jus est observée sur tous les profils par l'augmentation de l'atténuation (autour de 36-40 mm de hauteur de l'échantillon).

En analysant les images de chacun des degrés de cuisson et en estimant le périmètre des échantillons, nous avons évalué la perte en surface en fonction de la température (figure 111). Ces mesures ont été réalisées sur des tranches coupées parallèlement aux fibres (coupes longitudinales) ou perpendiculairement aux fibres (coupes transversales). Trois répétitions ont été menées par coupe et par température.

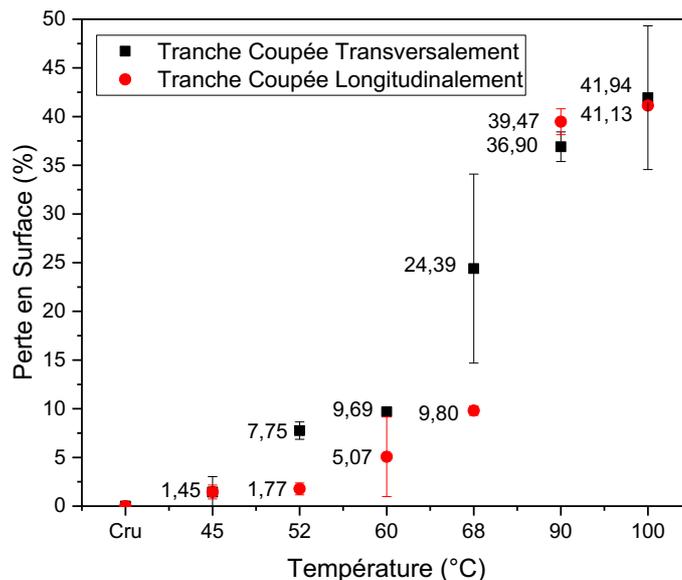


Figure 111 : Évolutions de la surface des tranches en fonction de la température de cuisson, pour les tranches coupées transversalement (perpendiculairement aux fibres) ou coupées longitudinalement (parallèlement aux fibres).

Cette figure 111 montre que pour les échantillons coupés perpendiculairement aux fibres, la perte en surface est d'environ 25 %, lorsque la température de l'échantillon atteint 68 °C et d'environ 42 %, lorsque la température arrive à 100 °C. Dans le cas de la découpe longitudinale (l'échantillon a été coupé dans la direction des fibres), la perte en surface (décrite en rouge) est de seulement 10 % à 68 °C mais atteint 40 % à 90 °C. Ce comportement confirme les données décrites dans la littérature qui indiquent que lors de la cuisson, la contraction des fibres dans le sens perpendiculaire se passe à température plus faible, que celle dans le sens longitudinal (Bendall et Restall, 1983; Offer et Trinick, 1983). Pour le suivi de l'évolution de la microstructure pendant la cuisson, il faudra donc tenir compte de cette contraction. Par rapport à d'autres techniques, l'imagerie de neutrons permet de réaliser ces mesures sans toucher l'échantillon, c'est-à-dire in situ dans le four sans le risque de l'étirer ou de le modifier (figure 123).

Expériences online

Four Modèle

Pour réaliser des suivis de morphologie des échantillons pendant la cuisson par imagerie de neutrons, nous avons utilisé une enceinte en acier équipée de hublots en quartz et d'un système de chauffage assuré par une résistance électrique en platine. La chaleur était transférée à la cellule en aluminium qui contenait l'échantillon de viande par conduction (figure 112).



Figure 112 : Photographie du four modèle utilisé pour la première expérience de cuisson en ligne de la tranche de viande par imagerie de neutrons (à gauche). Positionnement de la cellule en aluminium contenant l'échantillon à l'intérieur du four modèle (à droite).

La cellule en aluminium contenant l'échantillon cru a été posée sur la plaque en platine du four modèle, et chauffée à $2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$. La figure 113 présente la photographie de l'échantillon cru dans la cellule en aluminium et les cartographies neutroniques des échantillons de viande crue et cuite à 106 °C .

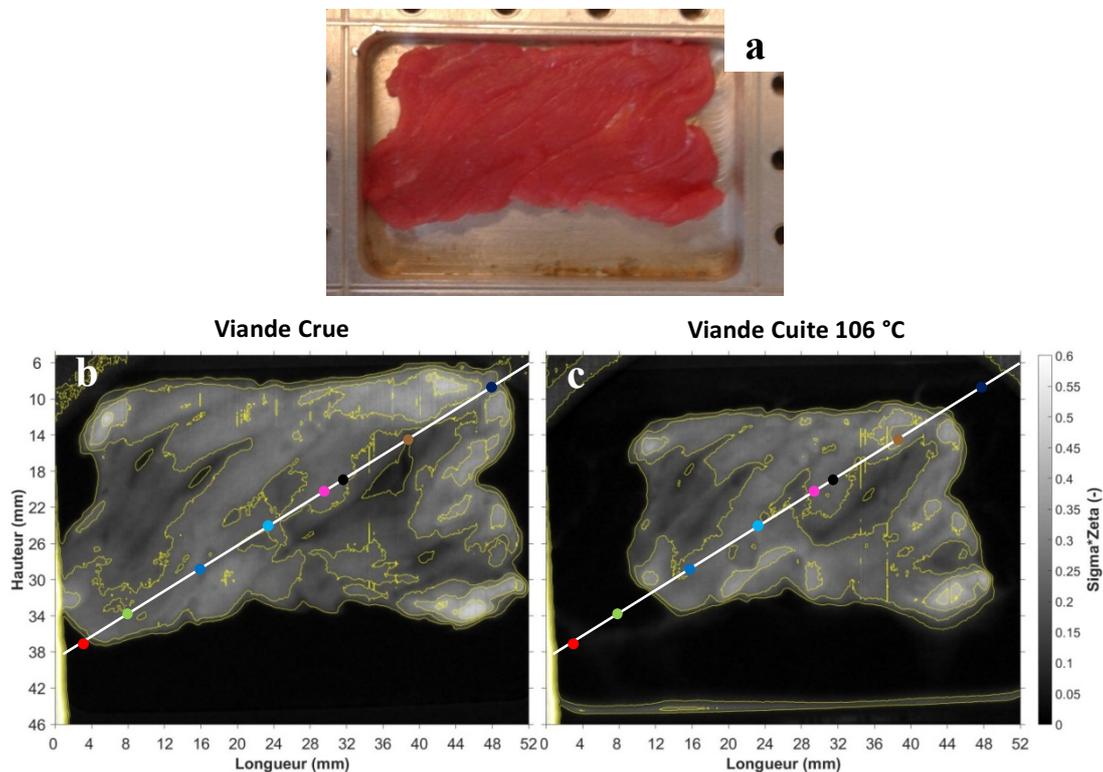


Figure 113 : Photographie de l'échantillon (a) cru et cartographies neutroniques réalisées sur les tranches : crue (b) et cuite à 106 °C (c). Les contours (lignes jaunes) représentent les niveaux de gris isointensité des valeurs Sigma*Zeta (de 0 à 0,6, par pas de 0,1 unité).

Aux images collectées par imagerie neutronique ont été superposées les représentations graphiques des contours indiquées par des lignes jaunes. Les contours mettent en évidence les zones à l'intérieur desquelles les valeurs d'atténuation ont une différence qui est inférieure à 0,1 unité. La comparaison entre les deux images montre que la distribution des contours à l'intérieur de l'échantillon n'est pas homogène. Cela peut être dû à la migration de l'eau, mais aussi à la contraction des fibres musculaires qui peut modifier l'épaisseur de l'échantillon. Nous avons voulu analyser ce qui se passe à l'intérieur de la tranche pendant la cuisson. Nous avons pour cela relevé les valeurs d'atténuation de certains points positionnés aux extrémités de

l'échantillon cru (rouge-point1, vert-point2, marron-point7 et bleu foncé-point8) et d'autres au centre (bleu-point3, bleu clair-point4, magenta-point5 et noir-point6). La figure 114 présente les valeurs d'atténuation pour chacun de ces points pour les images prises au cours de la cuisson (température de 31 à 106 °C).

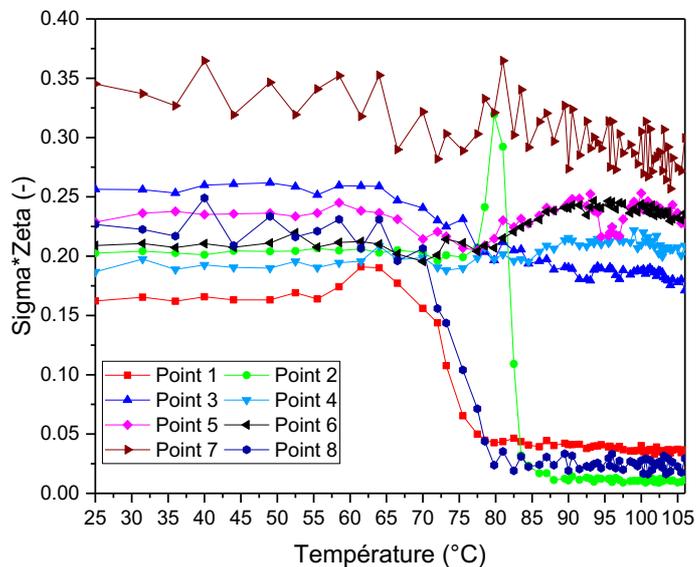


Figure 114 : Représentation des valeurs d'atténuation en fonction de la température de cuisson. Les coordonnées des points (pixel) sont : rouge (35;2,12) ; vert (31,4;8) ; bleu (26,56;16) ; bleu clair (21,72;24) ; magenta (18,04;29,8) ; noir (16,84;32) ; marron (12,04;40) ; bleu foncé (7,12;48).

Les courbes montrent que les changements de l'atténuation sont localisés au niveau des points situés sur les bords (rouge vert et bleu foncé) et qu'ils se produisent à partir de 65 °C. Cette température est une des valeurs clef de la contraction des protéines fibrillaires du tissu conjonctif. À l'intérieur de l'échantillon, de petits changements se produisent en augmentant la température (points bleu claire, magenta et noire). Le graphique en figure 115 représente un zoom sur les évolutions de l'atténuation de ces points centraux en fonction de la température.

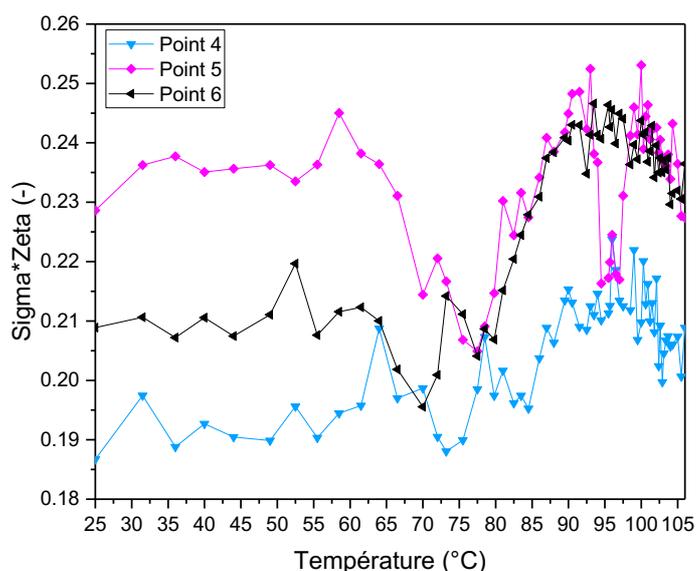


Figure 115 : Représentation des valeurs d'atténuation en fonction de la température de cuisson (zoom sur les points centraux des images pendant la cuisson en ligne, bleu clair (21,72;24) ; magenta (18,04;29,8) ; noir (16,84;32)).

Le graphique réalisé à partir des valeurs d'atténuation des points centraux (p4, p5, p6) indique une légère diminution de l'atténuation vers 65 °C puis une augmentation après 75-80 °C. À partir de 82 °C, l'absorption des neutrons à l'intérieur de l'échantillon semble donc être plus forte. Ceci pourrait être associé à une augmentation de l'épaisseur de la tranche suite à la contraction de l'échantillon.

Four Opticook : couplage neutrons et spectroscopies

Nous avons ensuite réalisé des mesures d'imagerie de neutrons pendant la cuisson de tranches de bœuf dans le four du programme Opticook en le positionnant sur la station d'imagerie. En effet, ce four est adapté pour réaliser des mesures de spectroscopie avec une fibre optique. Il est donc possible de faire sur un même échantillon des mesures à l'échelle moléculaire (spectroscopies) et des mesures à l'échelle microscopique (neutrons). La figure 116 présente la cellule échantillon qui a été développée pour réaliser ces mesures et le positionnement d'un échantillon et de la fibre optique avant la mesure couplée d'imagerie de neutrons et de réflectance dans le visible.

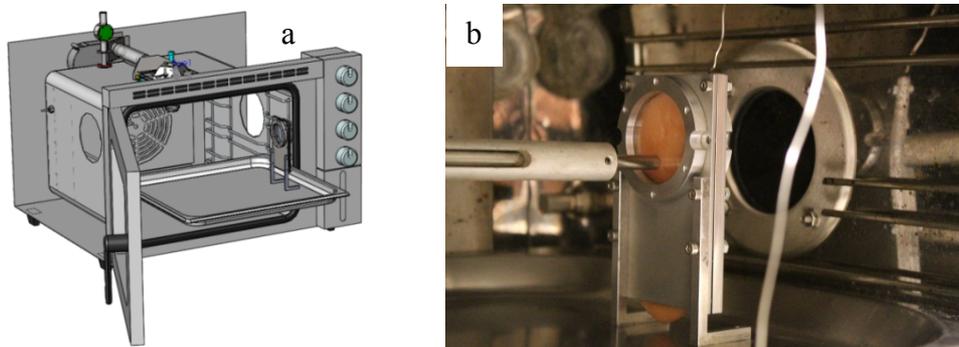


Figure 116 : Images du four équipé avec la cellule échantillon développée pour les mesures couplées a) Positionnement du porte échantillon à l'intérieur de la cavité du four ; b) Positionnement de la viande dans la cellule avec la fibre optique devant la fenêtre en quartz. Une sonde de température est aussi introduite dans l'échantillon.

Pour la réalisation des mesures spectroscopiques, nous avons utilisé un spectromètre développé par l'institut *FEMTO-ST*, partenaire du projet Opticook qui nous a permis de faire des mesures de fluorescence ou de réflectance dans le visible. Cet outil complètement portable était composé :

- d'une source laser excitant à 405 nm (expériences de spectroscopie de fluorescence) ou d'une lampe halogène (mesures de réflectance dans le visible) ;
- d'une fibre optique résistant à des températures allant jusqu'à 500 °C ;
- d'un spectromètre qui analyse le signal émis par l'échantillon (figure 57).

Nous avons réalisé des mesures de spectroscopie de fluorescence dans cette configuration (tranches de 2 mm et environ 10 cm de hauteur et 6 cm de largeur) sur des échantillons de blanc de poulet. Pour la cuisson en ligne et son suivi par fluorescence, nous n'avons pas réalisé de mesures sur le bœuf. En effet, pour les échantillons de bœuf, l'émission de fluorescence récoltée était trop faible à cause d'un transfert trop important associé aux hémoprotéines de ces échantillons.

La figure 117 présente des spectres d'émission de fluorescence dans le visible (excitation à 405 nm) obtenus sur des tranches de poulet de 2 mm en fonction de la température lors de la cuisson.

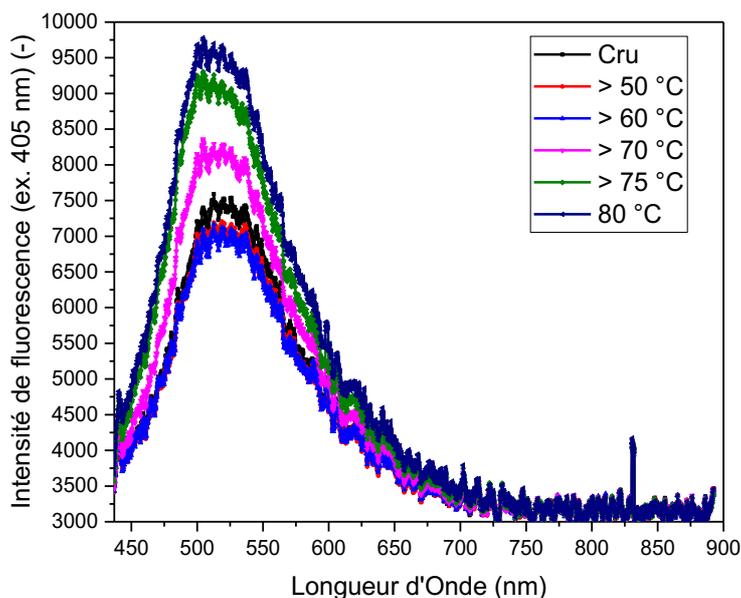


Figure 117 : Spectres d'émission de fluorescence, après excitation à 405 nm, d'une tranche de poulet de 2 mm. La cuisson et la collecte des données ont été réalisées online, en positionnant la fibre à l'intérieur du four. La température de l'échantillon a été suivie par un thermocouple positionné à l'intérieur de la cellule échantillon dans la tranche.

Les spectres présentent un maximum d'émission de fluorescence à 506 nm. L'intensité à cette longueur d'onde tend à diminuer entre l'échantillon cru et l'échantillon à 60 °C, puis après 60 °C, l'intensité augmente (figure 118). Cet intervalle de transition d'intensité de fluorescence correspond à l'intervalle de température de dénaturation des protéines du tissu conjonctif (figure 7b) (Lane et al., 2012; Su et al., 2014). Cette évolution de l'intensité de fluorescence est très encourageant pour la partie "développement" de capteurs du projet Opticook : nous avons trouvé une sonde interne qui peut être utilisée comme marqueur de la cuisson à températures moyennes pour pilotage automatique de la cuisson.

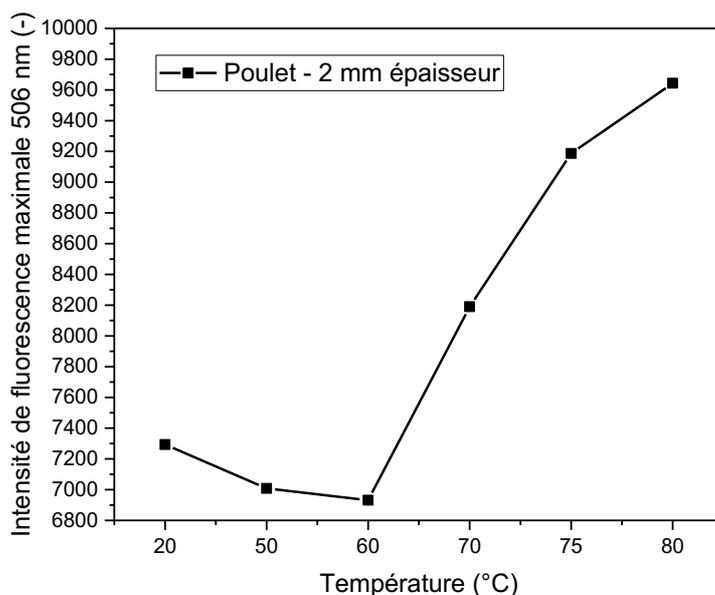


Figure 118 : Évolution des intensités de fluorescence à 506 nm de la matrice blanc de poulet en fonction de la température en cours de cuisson (tranche de 2 mm).

La spectroscopie de fluorescence dans le visible (excitation à 405 nm) est donc très intéressante pour la matrice poulet et, probablement, pour toutes les matrices qui possèdent une faible teneur en hémoprotéines : les viandes blanches et les poissons (le cabillaud par exemple). Pour les viandes rouges, par contre, il faudrait rechercher d'autres longueurs d'onde d'excitation, loin de l'excitation des hémoprotéines, comme par exemple dans l'UV (291 nm excitant les résidus de tryptophane). Dans ce cas, par contre, l'application dans un four est plus difficile à cause du coût du matériel plus élevé (hublot en quartz qui sépare la cavité du capteur).

Pour les échantillons de bœuf, afin de réaliser des mesures en ligne pendant la cuisson par spectroscopie et imagerie de neutrons, nous avons utilisé la fibre optique et le spectromètre en mode réflectance dans le visible. La figure 119 montre les spectres obtenus en cours de cuisson (donc à différentes températures) sur une tranche de 2 mm de bœuf (environ 10 x 6 cm² de hauteur et largeur).

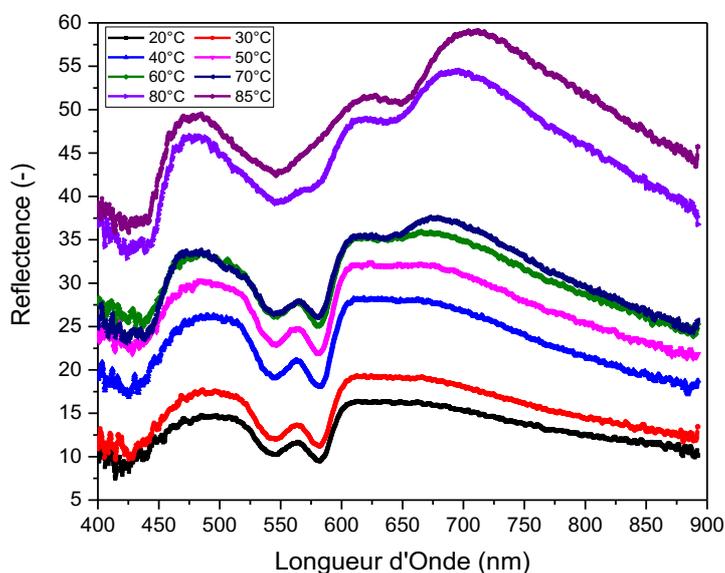


Figure 119 : Spectres collectés dans le visible en mode réflexion sur une tranche de rond parisien cuite au four. La cuisson et la collecte des données ont été réalisées online, en positionnant la fibre à l'intérieur du four. La température de l'échantillon a été suivie par un thermocouple positionné à l'intérieur de la cellule échantillon dans la tranche.

Comme le montre la figure 119, le spectre de l'échantillon cru (noir) présente deux bandes dans le visible qui sont classiquement observées sur les échantillons d'oxy-myoglobine ou d'oxy-hémoglobine positionnés à 544 et 580 nm. Plus la température augmente plus la bande à 580 nm diminue, avec l'apparition des hémoprotéines en état met-. Lors du passage de la forme oxy- à la forme met-, une bande apparaît vers 640 nm, ce qui a aussi déjà été observé dans la littérature (Zijlstra et Buursma, 1997). Il est ainsi classique de suivre le rapport des valeurs de transmissions ou d'absorbance entre 580 et 544 nm pour évaluer la quantité de hémoprotéines en état oxy-. La figure 120 présente l'évolution du rapport avec la température.

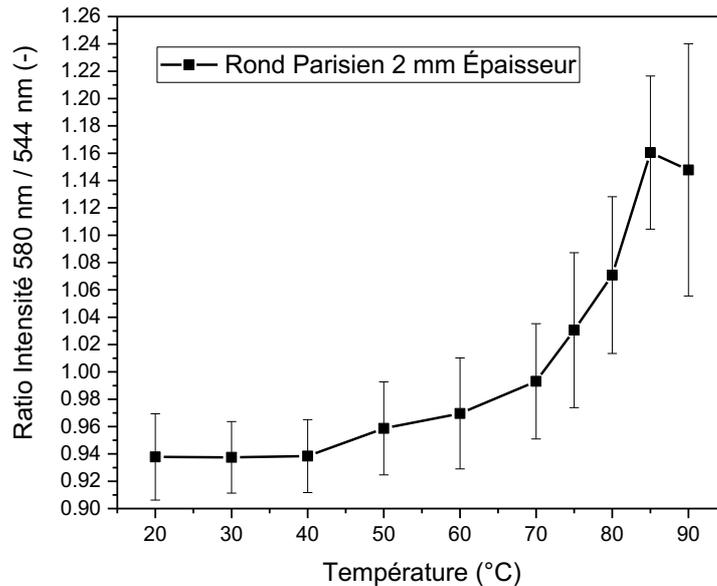


Figure 120 : Rapport entre les intensités des bandes observées en réflectance à 580 et 540 nm, en fonction de la température de cuisson. Ces mesures ont été répétées trois fois.

La figure 120 montre que le rapport d'intensité entre les deux longueurs d'onde commence à changer autour de 40-50 °C et, ensuite vers 70 °C (figure 7a), ce qui correspond à l'apparition de la met-myoglobine (Rodger et Wilding, 1990).

Nous avons ensuite réalisé des mesures d'imagerie neutronique couplées à ces mesures de réflectance dans le visible sur des tranches de bœuf. L'échantillon a été introduit dans le four froid, et la température du four a été imposée à 130 °C au début des mesures couplées neutron-spectroscopie visible. L'acquisition des images neutroniques a été réalisée après 30 secondes d'exposition. Les temps d'acquisition des valeurs de la température dans l'échantillon, et des spectres visibles étaient de 2 secondes.

Ainsi la séquence d'acquisition était la suivante :

- début de l'acquisition des images neutronique (temps 0) ;
- début de l'acquisition des spectres et de la température (30 secondes après le temps 0) ;
- début de la cuisson (four à 130 °C) et ouverture du faisceau de neutrons (60 secondes après le temps 0).

La figure 121 présente les rampes de température mesurées dans les échantillons lors des trois répétitions que nous avons réalisées. Ces profils de température sont assez similaires pour ces 3 échantillons ce qui semble indiquer que le procédé de cuisson utilisé est assez répétable. L'augmentation de la température était de 10,8 °C·min⁻¹ entre 100 et 400 secondes, de 4,8 °C·min⁻¹ entre 400 et 600 secondes puis de 1,2 °C·min⁻¹ entre 600 et 900 secondes.

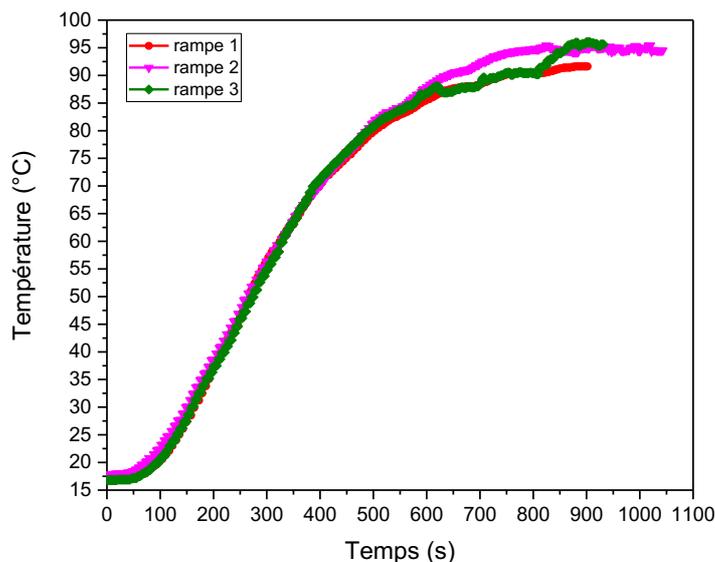


Figure 121 : Rampes de température mesurées pour les trois échantillons étudiés.

La montée de la température n'est pas linéaire dans tout l'intervalle temporel. Elle peut être subdivisée en trois parties: entre 100 et 400 secondes, la montée de température était de $10,8\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; entre 400 et 600 secondes, la rampe était de $4,8\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; entre 600 et 900 secondes, $1,2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Un exemple d'image obtenue avec les neutrons après soustraction du bruit de fond, normalisation par le faisceau vide et élimination du bruit correspondant aux pixels blancs dus aux rayons gamma, est présenté en figure 122a. Nous avons déterminé à partir de cette image le changement de morphologie en fonction de la température, en comptant le nombre de pixels constituant l'échantillon (figure 122b).

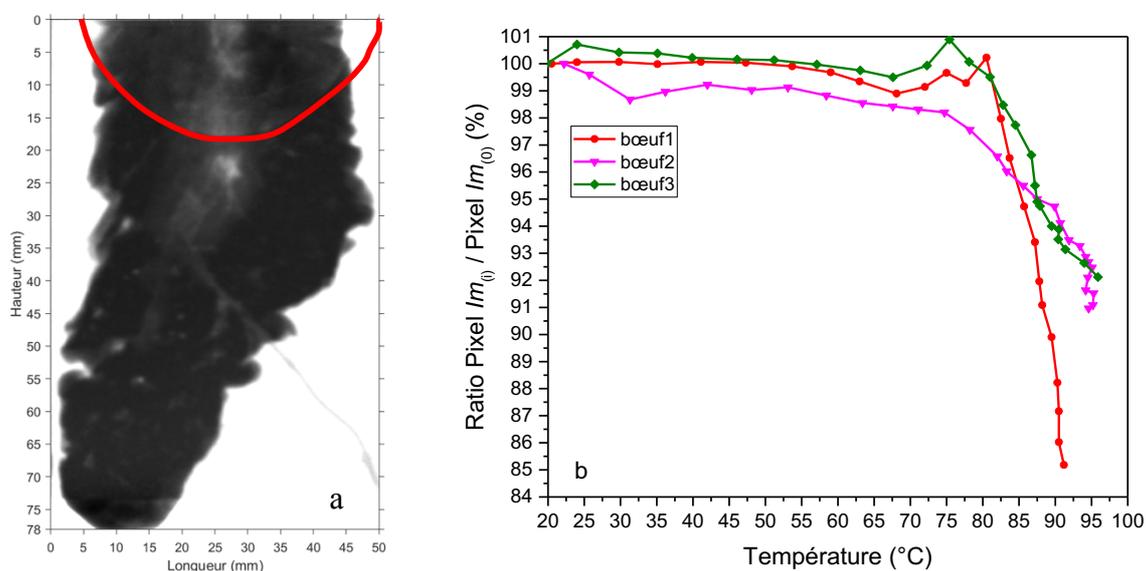


Figure 122 : a) Exemple d'image normalisée par le faisceau blanc, et nettoyée (filtre médian) pour enlever les pixels blancs associés aux rayons gamma. La partie de l'image tout en haut, à l'intérieur du demi-cercle est la partie du porte échantillon ouverte (hublot) correspondant à la zone analysée par spectroscopie (entourée en rouge). b) Évolution de la morphologie des trois échantillons étudiés en fonction de la température de cuisson.

La figure 122b présente le ratio du nombre de pixels constituant les échantillons suite à l'analyse d'une image obtenue à une température, par rapport à l'image initiale (temps 60 s) pour les trois répétitions. Les allures sont assez similaires pour les trois échantillons. Une légère

diminution du nombre de pixel est observée autour de 50-60 °C. La baisse la plus importante apparaît après 80 °C. La figure 123 présente les images enregistrées pour des températures de l'échantillon de 53 et 95 °C. Sur ces images, le contour de la première image enregistrée à 20 °C est indiqué en rouge.

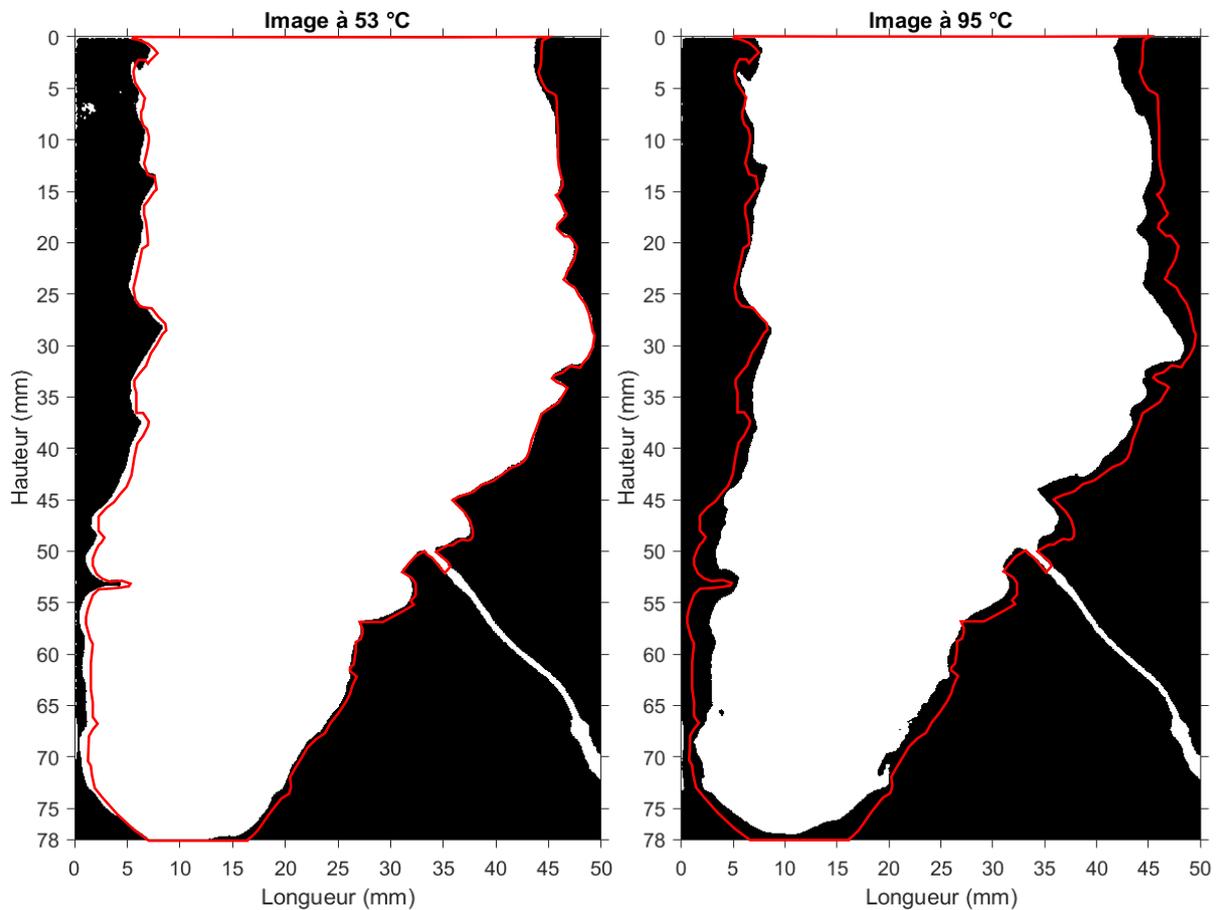


Figure 123 : Images d'un échantillon de bœuf à 53 °C (a) et 95 °C (b). Le contour rouge représente le périmètre de l'image initiale à 20 °C.

Les images de cette figure mettent en évidence que la différence de taille entre l'échantillon à 53 °C et celui à 20 °C est assez faible mais que cette différence augmente suite à un phénomène de contraction observé à 95 °C.

Nous avons cherché à suivre l'évolution du coefficient d'atténuation de certains points qui sont placés sur la diagonale de l'échantillon. Nous avons répété le traitement pour les trois répétitions (un exemple est montré en figure 124), en choisissant des points sur les bords de l'échantillon (points 1 et 10, noir et jaune foncé) et des points à l'intérieur de la tranche.

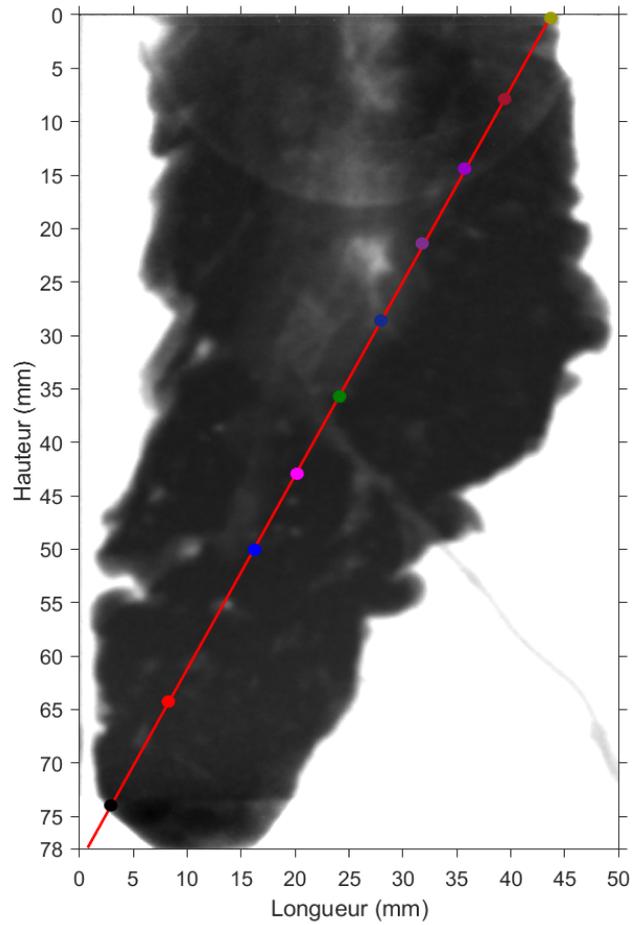


Figure 124 : Présentation des points choisis sur lesquels l'évolution de l'atténuation a été suivie. Les points noir et jaune foncé sont localisés sur les bords de la tranche ; les points rouge, bleu, magenta, vert, bleu foncé, violet foncé, violet, et rouge foncé représentent les points localisés à l'intérieur de la tranche.

Les graphiques (figure 125) présentent l'évolution des atténuations des points les plus externes sur la diagonale de l'échantillon : point 1 et point 10.

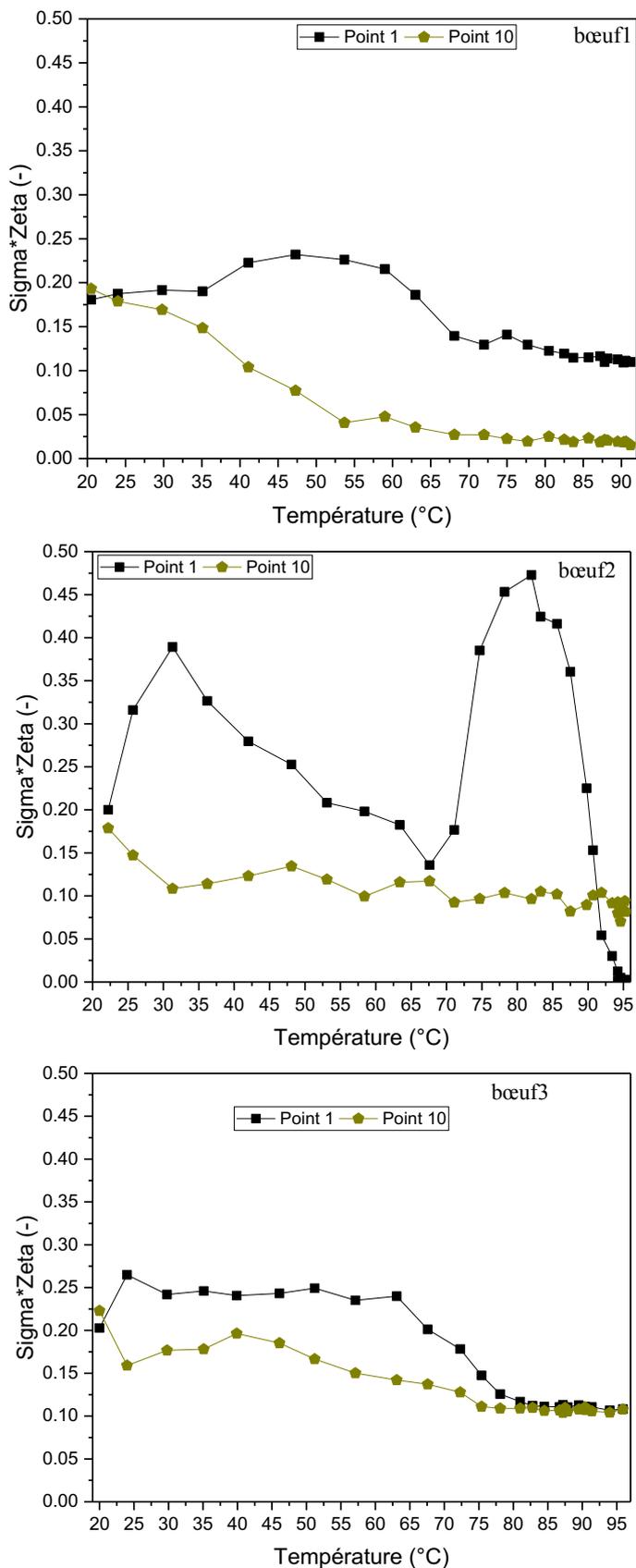


Figure 125 : Représentation des évolutions des valeurs d'atténuation des deux points externes de la diagonale (point 1 et point 10) ,en fonction de la température de cuisson, pour les trois tranches de bœuf considérées.

Les graphiques (figure 126) présentent l'évolution des atténuations des points centraux choisis sur la diagonale des échantillons : du point 2 au point 9.

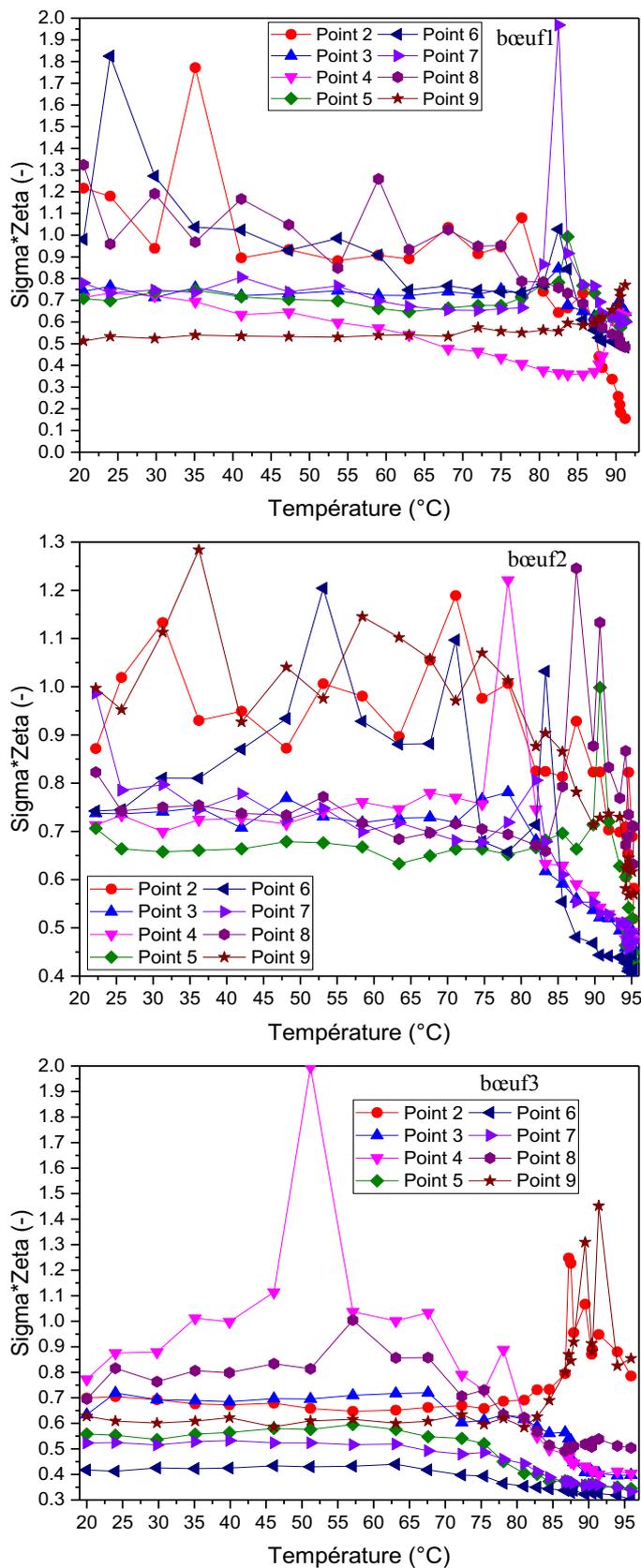


Figure 126 : Représentations des évolutions de l'atténuation des huit points centraux, en fonction de la température de cuisson. Zoom sur les points centraux des trois tranches considérées.

Nous remarquons d'abord que les évolutions des valeurs d'atténuation pour les points externes (points 1 et 10, noir et jaune foncé) sont très similaires (figure 125). La valeur d'atténuation du point jaune foncé tend à diminuer jusqu'à 0-0,1 (cellule vide) dès 40 °C, ce qui indique que la contraction des fibres a eu lieu à basse température. Cette plage de température correspond au début de la dénaturation de la myosine, donc au début du phénomène de la contraction des protéines myofibrillaires. L'allure du point noir (en bas à gauche) est similaire mais plus irrégulière. Ce comportement peut être expliqué par la libération du jus et le fait que des gouttes sortent de la tranche et doivent passer par ce point.

La figure 126 présente les valeurs d'atténuation des points centraux des trois tranches de bœuf pour les différentes températures.

Les valeurs d'atténuation ont une allure plus irrégulière : augmentation et diminution entre une température et la suivante. Cette tendance peut être associée à la migration du jus qui en passant par ces zones augmente le coefficient d'atténuation. Un autre facteur qui peut jouer sur le changement du coefficient d'atténuation est l'épaisseur. En effet, la contraction des fibres musculaires peut provoquer localement une augmentation de l'épaisseur de la tranche, donc être responsable aussi de l'augmentation du coefficient d'atténuation. Cette tendance commence vers 40 °C et se poursuit vers 65 °C. Dans cette plage de température, la dénaturation de la myosine et du tissu conjonctif s'enchaînent d'après la calorimétrie (figure 69) et la spectroscopie de fluorescence (figure 87, figure 117 et figure 118). La dénaturation de ces deux protéines cause la contraction des myofibrilles ce qui provoque des modifications des interactions entre ces protéines et l'eau, qui tend à migrer à l'extérieur de la matrice. Ces changements peuvent être mis en relation avec le changement du pH et de la perte en groupements acides et polaires de la viande qui provoque la formation de liaisons covalentes entre les protéines (ponts disulfures) (Hamm et Hofmann, 1965; Khan et Van Den Berg, 1965; Dubé et al., 1972)), donc la formation d'une réticulation plus serrée (Hamm et Deatherage, 1960). Nos expériences de RMN montrent ces changements, avec la fraction rigide qui devient plus importante en augmentant la température (figure 96a), ainsi que la fraction mobile qui diminue à cause de la perte en jus (figure 94a). Vers 70-80 °C, le coefficient d'atténuation tend à diminuer pour toutes les positions centrales et tous les échantillons. La contraction des fibres musculaires et du tissu conjonctif a eu lieu et l'eau initialement contenue dans la tranche est sortie.

Nous avons cherché à analyser les images obtenues aux différentes températures en nous focalisant aussi sur une zone de l'échantillon qui se trouvait au centre de la tranche. La figure 127 présente les cartographies des valeurs d'atténuation obtenues sur la portion de l'échantillon qui se trouvait à côté de la zone d'observation de la fibre optique, près du hublot de la cellule (figure 122).

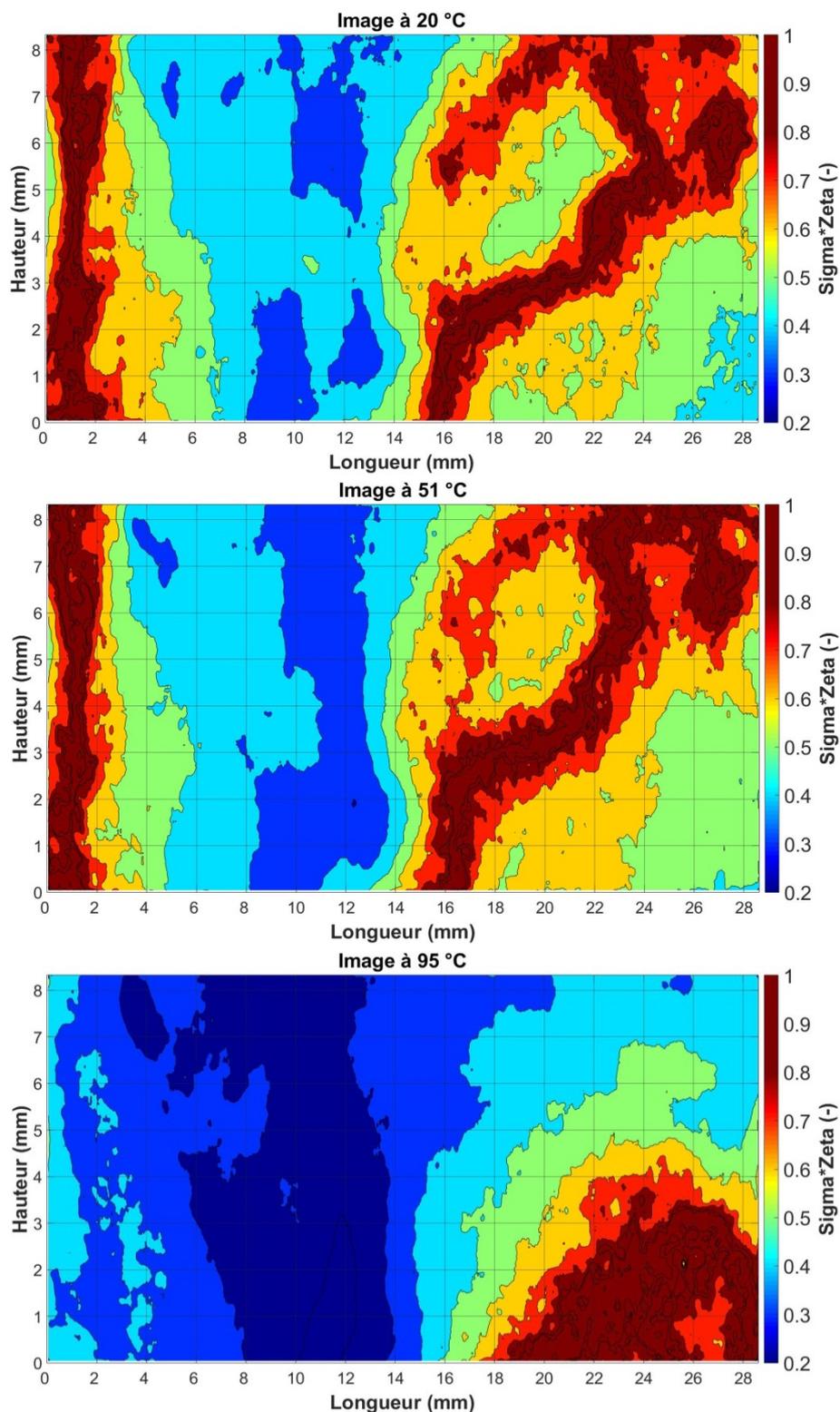


Figure 127 : Les figures présentent la cartographie 2D de la petite région de l'échantillon sélectionnée, dans la zone ouverte du porte échantillon (hublot dédié aux mesures optiques), la zone explorée par spectroscopie : a) image capturée à 20 °C ; b) image capturée à 51 °C ; c) image capturée à 95 °C. Les images présentent les niveaux d'intensités par des couleurs : 0,2 bleu foncé ; 0,2-0,3 bleu ; 0,3-0,4, bleu clair ; 0,5 vert ; 0,6 orange ; 0,7 rouge ; 0,8-1 rouge foncé. Les séries de cartographies produites à partir des images enregistrées pendant les cuissons, des trois répétitions, sont présentées dans les annexes 7, 8 et 9.

La cartographie des atténuations obtenue pour l'échantillon à 20 °C montre une zone centrale avec des valeurs d'environ 0,4 (zone bleue claire) et, autour de cette zone, des atténuations qui

vont de 0,5 à 1 (zones vertes, oranges et nuances de rouge). Plus la valeur d'atténuation est importante, plus l'échantillon est hydrogéné. Deux possibilités peuvent expliquer cette valeur d'atténuation plus faible sur la zone centrale : soit l'épaisseur est différente, à cause de la découpe non-homogène, soit il y a moins de jus dans cette partie. Si nous considérons que l'échantillon a été découpé de façon homogène, on peut émettre l'hypothèse qu'il y a moins de jus dans cette zone centrale. La tomographie pourrait être un outil qui permet de suivre la diffusion de l'eau dans l'échantillon au cours de la cuisson. La contrainte est la très longue durée de l'expérience (environ trois heures pour enregistrer 180 images), donc l'application d'un "vrai four" et d'une vraie rampe de température sera très difficile. Par contre, l'application d'une rampe très très lente ou l'imposition d'une température spécifique pourrait permettre d'observer la migration du jus.

Pour les cartographies de cette même zone obtenues à partir de l'analyse des images enregistrées à températures plus élevées, des atténuations autour de 0,3 à 50 °C et même autour de 0,2 à 95 °C apparaissent au cœur de l'échantillon (sous le hublot, nuances de bleu). Les zones avec une atténuation autour de 0,4-0,5 (zones bleue claire et verte) remplacent les zones avec une atténuation supérieure à 0,6 (nuances d'orange et de rouge). Globalement, plus la température augmente plus l'atténuation diminue sur cette zone centrale, ce qui peut sans doute être associé à la sortie du jus de la tranche. Les changements d'atténuation sont observés dès 50 °C, liés à la dénaturation de la myosine, même s'ils sont plus importants à 95 °C.

Les mesures de réflectance en cours de cuisson ont aussi été réalisées sur cette même zone. Nous avons observé des spectres dans le visible du même type que ceux qui sont présentés sur la figure 119. Ainsi en début de cuisson nous retrouvons sur ces spectres, les deux bandes caractéristiques des oxy-hémoprotéines puis en fin de cuisson l'apparition d'une bande vers 640 nm et la disparition de celle à 580 nm (met-hémoprotéines). L'évolution de la valeur du rapport des intensités de la bande à 580 nm par rapport à celle de la bande à 544 nm (équation (3)) est présentée sur la figure 128 les trois échantillons mesurés lors de ces expériences de cuisson en ligne et de couplage.

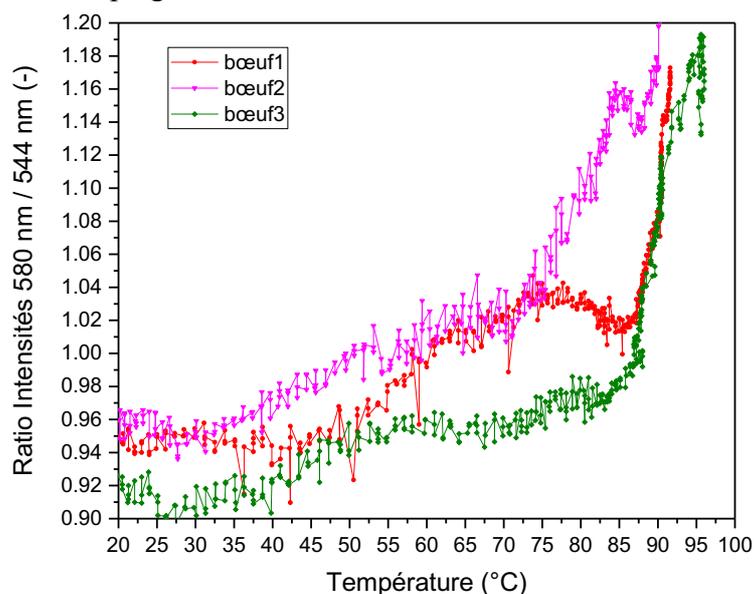


Figure 128 : Évolution du ratio entre les intensités à 580 et 544 nm en fonction de la température pour les trois échantillons.

Les trois courbes montrent une légère évolution du ratio à faible température entre 45 et 60 °C puis un changement important entre 70 et 87 °C selon l'échantillon.

Grâce à ce couplage entre l'imagerie de neutrons et la spectroscopie en mode réflectance dans le visible, dans un environnement échantillon réel (four semi-professionnel Opticook), nous avons pu observer pendant la cuisson sur un échantillon de bœuf :

- les changements de morphologie associés à la contraction des fibres, que nous avons observés par tomographie (figure 99, figure 100 et figure 101) et par imagerie de neutrons (figure 109, figure 111, figure 122b et figure 123),
- la migration du jus concomitante à cette contraction (voir les annexes 8, 9 et 10 présentant les séries d'images enregistrées pendant les trois expériences du couplage spectroscopie-imagerie),
- et les changements d'état d'oxydation des hémoprotéines, que nous avons observé par spectroscopie du visible (figure 120), ainsi que les modifications du tissu conjonctif sur le poulet (figure 118).

Tous ces événements débutent vers 50 °C et s'accroissent fortement après 70 °C.

Résumé des principaux résultats et schéma de synthèse

Les expériences couplées nous ont permis donc de suivre plusieurs événements biochimiques que se passent pendant la cuisson du muscle, en mettant de côté la variabilité liée à l'échantillon. Nous avons pu suivre l'évolution d'un échantillon de grosse taille, dans un environnement échantillon réel (le four Opticook) à travers l'imagerie de neutrons (morphologie et niveaux d'atténuation à l'échelle microscopique) et en couplant des mesures spectroscopiques de visible et fluorescence (suivi des hémoprotéines et du tissu conjonctif à l'échelle moléculaire).

La figure 129 présente les principaux résultats de la partie couplage (four, spectroscopie et imagerie des neutrons) : l'évolution du ratio (hémoprotéines met- et oxy-), la rampe de température en fonction du temps mettant en évidence les événements caractéristiques (le spectre du visible présentant les pics de réflexion des oxy- et met- hémoprotéines et les images des niveaux d'intensité de neutrons) à 3 températures clefs : 20, 50 et 87 °C.

Suivi de la cuisson en ligne avec le couplage de l'imagerie neutronique et de la spectroscopie

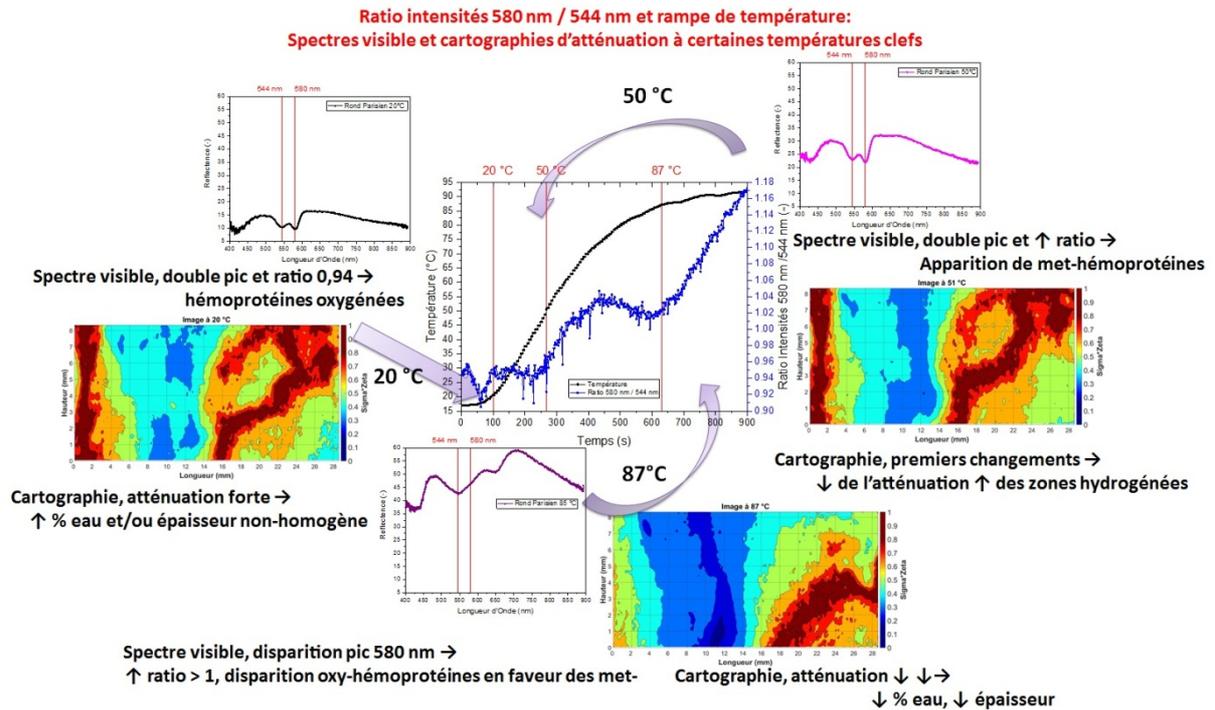


Figure 129 : Schéma de synthèse des résultats obtenus lors des expériences de couplage : cuisson en ligne dans le four Opticook, spectroscopie visible, imagerie de neutrons. On retrouve sur cette figure la corrélation entre le ratio des intensités à 580 et 544 nm (passage des formes oxy- à met- des hémoprotéines) et les images de neutrons, en fonction de la rampe de température. Les graphiques et les images des intensités de neutrons sur les côtés présentent les effets à certaines températures clefs 20, 50 et 90 °C : donc au début, au milieu et à la fin de la cuisson.

Discussion

Discussion

Afin d'équiper des fours semi-professionnels avec des capteurs spectroscopiques capables de piloter la cuisson de viande et de poisson, nous avons d'abord cherché à savoir si les protéines étaient les sondes spectroscopiques adaptées. Puis, nous avons essayé de coupler ces mesures spectroscopiques, qui donnent une signature du degré de cuisson à la surface de l'échantillon, à d'autres mesures qui rendent compte des transformations que se déroulent à l'intérieur de l'échantillon. Les trois parties du chapitre de résultats de ma thèse ont porté sur ces deux problématiques en étudiant les protéines à plusieurs échelles de structure (du moléculaire au macroscopique) et différents types d'échantillons (des systèmes complexes et modèles).

La première partie de la thèse a eu pour objectif d'établir les profils spectroscopiques d'échantillons de viande et poisson après cuisson selon des protocoles proposés par les partenaires industriels. Ces trois degrés de cuisson Sous Cuit, Bien Cuit et Trop Cuit ont été validés en utilisant des observations à l'échelle macroscopique, basées sur des analyses de la couleur et sur la texture par évaluation sensorielle. Nous avons réalisé des expériences de calorimétrie sur ces mêmes matrices crues (blanc de poulet, rond parisien et dos de cabillaud) afin de mesurer les températures de dénaturation caractéristiques des protéines du muscle. Les résultats de ces mesures de calorimétrie, les températures à cœur utilisées lors de la cuisson et le récapitulatif des données sensorielles qui ont permis d'établir ces protocoles sont présentés dans les tableau 19, tableau 20 et tableau 21.

Tableau 19 : Récapitulatif des protocoles de cuisson Opticook (températures à cœur et temps nécessaire pour que la température à cœur soit atteinte), des mesures de calorimétrie sur les échantillons crus et les résultats de l'analyse sensorielle et de la couleur avec la méthode Lab* de la matrice rond parisien.

Paramètres		a) Valeurs Rond Parisien		
Protocoles Opticook	Température à Cœur (°C)	45 (SC)	52 (BC)	68 (TC)
	Temps à Cœur (min)	66,20 ± 6,94	31,10 ± 2,34	49,59 ± 6,19
Calorimétrie	Sommet Pic (°C)	51	60	75
	Début/Fin Pic (°C)	45/54	55/67	70/75
	Fraction Protéique	Myosine	Collagène Hémoprotéines	Actine
Descripteurs Sensoriels	Brillant		+	
	Couleur Cœur		+	
	Couleur Surface		+	
	Fibrosité		-	
	Granulosité		+	
	Jutosité		+	
	Tendreté		++	
Couleur (Lab*)	Surface		++	
	Tranche		+	

Tableau 20 : Récapitulatif des protocoles de cuisson Opticook (températures à cœur et temps nécessaire pour que la température à cœur soit atteinte), des mesures de calorimétrie sur les échantillons crus et les résultats de l'analyse sensorielle et de la couleur avec la méthode Lab* de la matrice blanc de poulet.

Paramètres		b) Valeurs Blanc de Poulet			
Protocoles Opticook	Température à Cœur (°C)	56 (SC)		66 (BC)	76 (TC)
	Temps à Cœur (min)	13,08 ± 1,53		14,50 ± 1,71	22,03 ± 1,40
Calorimétrie	Sommet Pic (°C)	53	60		69
	Début/Fin Pic (°C)	48/56	58/64		64/72
	Fraction Protéique	Myosine	Collagène Hémoprotéines		Actine
Descripteurs Sensoriels	Brillant				+
	Couleur Cœur				++
	Couleur Surface				++
	Fibrosité				-
	Granulosité				++
	Jutosité				+
	Tendreté				-
Couleur (Lab*)	Surface				+
	Tranche				+

Tableau 21 : Récapitulatif des protocoles de cuisson Opticook (températures à cœur et temps nécessaire pour que la température à cœur soit atteinte), des mesures de calorimétrie sur les échantillons crus et les résultats de l'analyse sensorielle et de la couleur avec la méthode Lab* de la matrice dos de cabillaud.

Paramètres		c) Valeurs Dos de Cabillaud			
Protocoles Opticook	Température à Cœur (°C)	50 (SC)		60 (BC)	80 (TC)
	Temps à Cœur (min)	19,12 ± 1,38		16,27 ± 1,79	19,68 ± 1,46
Calorimétrie	Sommet Pic (°C)	38	50	56	69
	Début/Fin Pic (°C)	36/44	47/54	54/58	65/72
	Fraction Protéique	Myosine	Collagène Hémoprotéines		Actine
Descripteurs Sensoriels	Brillant				++
	Couleur Cœur				+
	Couleur Surface				+
	Émiettement				+
	Séparation Myomères				-
	Fibrosité				+
	Jutosité				+
	Fermeté				+
	Adhérence				+
	Fondant				+
	Pâteux				-
Couleur (Lab*)	Surface				+
	Tranche				+

Les descripteurs générés lors des mesures sensorielles (tendreté, jutosité, fibrosité, couleur en surface et à cœur, brillant...) font référence à des transformations qui touchent les différentes fractions protéiques, et qui sont associés à leur dénaturation. Cette observation est une première indication qui justifie le choix de certaines analyses spectroscopiques pour décrire de façon non intrusive le degré de cuisson. Il était important dans ce travail d'établir les profils thermiques de chacune des matrices par calorimétrie. La confrontation des températures de dénaturation (sommet du pic) obtenues par calorimétrie sur les trois matrices crues avec celles (à cœur) utilisées dans les protocoles de cuisson montre que les températures des protocoles sont la plupart du temps de part et d'autre des pics de dénaturation des différentes fractions protéiques. Par contre, selon la matrice étudiée, pour un certain degré de cuisson, la température cible choisie pour aboutir à ce degré de cuisson n'affecte pas la même protéine. Par exemple, pour le niveau sous cuit de la matrice rond parisien, lors de l'arrêt de la cuisson (45 °C) la myosine n'est pas encore complètement dénaturée. Pour le cabillaud (50 °C) et pour le poulet (56 °C) par contre, les températures de dénaturation de la myosine sont atteintes lorsque l'on stoppe la cuisson. Ceci indique qu'il faudra que les programmes de pilotage du four suivent bien les indications des capteurs pour s'adapter à tout type de viande et poisson. D'autres fractions protéiques ont même déjà été affectées. Comme nous l'avons montré dans les résultats, pour le poulet, la calorimétrie réalisée sur les échantillons cuits (figure 70, tableau 12) nous a indiqué que toutes les protéines sont dénaturées pour les degrés de cuisson bien cuit et trop cuit. Un autre paramètre qui est assez variable selon la matrice considérée est le gradient de température appliqué pour aboutir à la température cible à cœur. Or nous avons pu observer sur notre système modèle au niveau macroscopique (apparition de turbidité) et au niveau moléculaire (température de changement d'environnement des résidus tryptophanyls mesurée par fluorescence) que la façon d'appliquer la température est importante. La figure 130 montre l'état macroscopique de la myosine chauffée en utilisant une rampe de température rapide (bain d'huile à 100 °C) ou plus lente (bain d'huile à 65 °C). Plus la rampe est rapide plus la turbidité est importante et plus les protéines s'agrègent. L'échantillon chauffé rapidement jusqu'à 50 °C présente une séparation de phase alors que celui qui a été chauffé lentement jusqu'à 50 °C est juste un peu turbide.

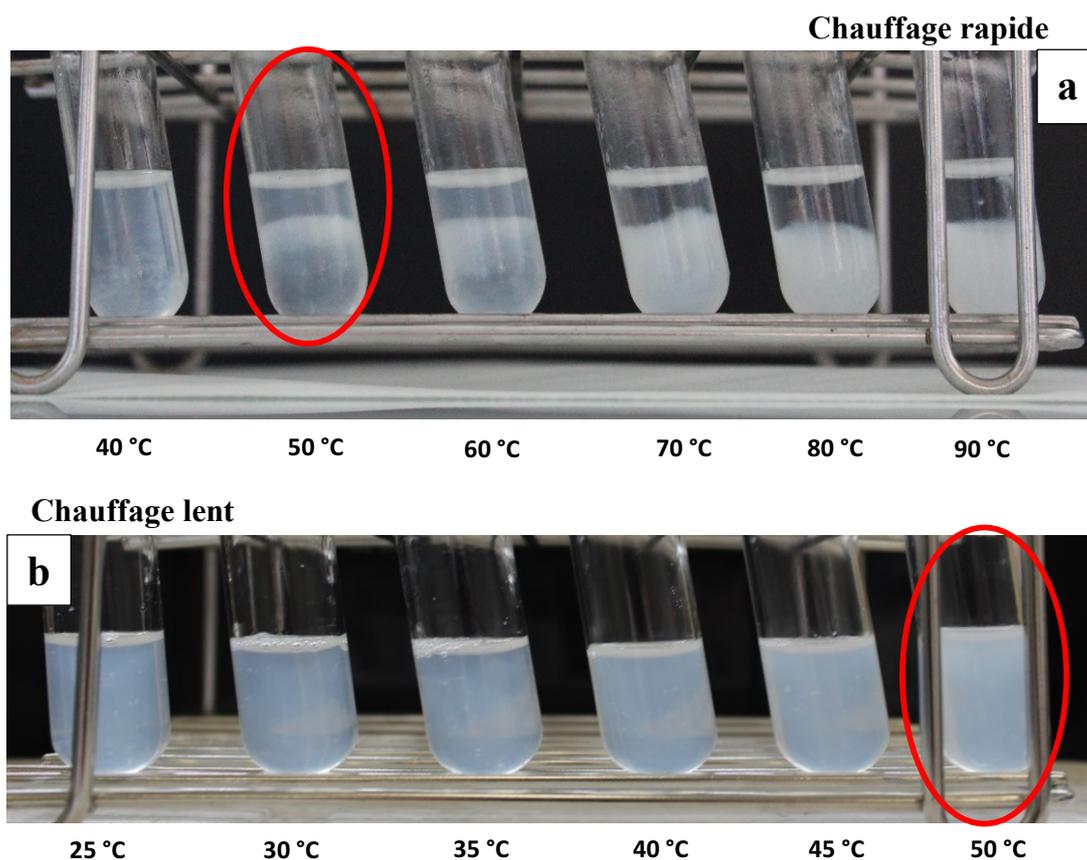


Figure 130 : Photographies de tubes contenant des suspensions de myosine ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en fonction de la température de chauffage (de 40 à 90 °C), pour les tubes chauffés dans un bain d'huile à 100 °C (a) ou de 25 à 50 °C, pour les tubes chauffés dans un bain d'huile à 65 °C (b). L'expérience a été répétée trois fois.

Nous avons émis l'hypothèse que, dans le cas du chauffage lent les molécules de myosine se dénaturent en ayant le temps de se réorganiser en formant des associations "ouvertes" et quasi linéaires (figure 130b). Dans le cas du chauffage rapide, les molécules de myosine peuvent s'associer sous forme de flocculats, donc des petits agrégats qui enfin se séparent de la phase aqueuse (figure 130a).

À partir des échantillons cuits selon ces protocoles de cuisson, nous avons réalisé des mesures spectroscopiques pour établir les signatures communes à trois matrices pour la thèse, mais à cinq viandes (rond parisien, blanc de poulet, cuisse de poulet, rôtis de porc et de veau) et trois poissons (cabillaud, saumon, truite) pour le projet Opticook. L'objectif est alors de faire une sélection de longueurs d'ondes universelles à toutes les matrices, discriminant au mieux (compte tenu de nos protocoles de cuisson) les degrés de cuisson et de définir les paramètres des capteurs à développer par les partenaires en charge de cette partie du projet.

Sur les spectres enregistrés dans le moyen infrarouge, des bandes caractéristiques de l'ensemble des constituants des échantillons (lipides, eau, sucres et protéines) ont été observées. À l'issue du traitement des données et des analyses statistiques, nous avons sélectionné quatorze longueurs d'ondes, les plus fréquentes parmi les degrés de cuisson des matrices considérées. La valeur de ces longueurs d'ondes nous a indiqué qu'elles sont majoritairement liées aux changements des structures secondaires des protéines, aux vibrations des groupements C=O, C-N et N-H, premier indice que les protéines peuvent être le bon marqueur spectroscopique de la cuisson. Nous avons réalisé une analyse en composantes principales sur les données obtenues

qui a mis en évidence que les échantillons Sous Cuit sont différents par rapport aux échantillons Bien Cuit et Trop Cuit pour le rond parisien et le blanc de poulet, mais pas pour le dos de cabillaud.

Le même type de démarche a été mené en enregistrant sur ces mêmes échantillons les spectres de fluorescence dans l'UV, en excitant les résidus de tryptophanes à 291 nm. L'analyse des données montre que ce second outil spectroscopique permet d'observer des différences entre deux degrés de cuisson pour le rond parisien et le dos de cabillaud, mais pas pour le blanc de poulet.

La spectroscopie dans le visible nous a permis de suivre les signatures des hémoprotéines dans cette région spectrale. La dénaturation de ces protéines et l'oxydation du fer de l'hème rend compte de l'évolution de la couleur des échantillons de viande et poisson lors de la cuisson (Wright et al., 1977; Rodger et Wilding, 1990). L'observation du rapport d'intensité entre la bande caractéristique de l'oxy- et de celle caractéristique de la met-hémoglobine (figure 72) montre bien qu'un changement se passe entre l'échantillon Bien Cuit et Trop Cuit du rond parisien (52 °C et 68 °C) et du blanc de poulet (66 et 76 °C). En conclusion, nous pouvons dire que les résultats que nous avons obtenus en utilisant ces trois spectroscopies soutiennent l'hypothèse que les protéines sont des marqueurs universels du suivi de cuisson de viande et de poisson. Par contre, nous ne pouvons pas discriminer les degrés de cuisson sur lesquels nous avons fait les analyses avec un seul outil. Cela peut être associé à nos protocoles de cuisson, et au fait que ces mesures ont été réalisées après cuisson (mesures offline).

Afin de vérifier que les changements spectroscopiques observés suite à la cuisson des matrices complexes (à certaines températures) étaient associés à des signatures de fractions protéiques particulières (myosine et hémoglobine), nous avons purifié la myosine en optimisant la protocole décrit dans la littérature (Margossian et Lowey, 1982) pour obtenir des échantillons concentrés (10 g·L⁻¹, environ). À la fin de cette étape de purification nous avons vérifié que la protéine gardait sa structure native. Nous avons réalisé des mesures de fluorescence sur la myosine seule ou en mélange avec l'hémoglobine. La position en longueur d'onde du maximum d'intensité de fluorescence était de l'ordre de 340 nm pour les matrices complexes ou la myosine purifiée. Ceci nous montre que les signaux que nous avons observés sur les matrices complexes étaient bien en grande partie relatifs à cette protéine. La longueur d'onde de ce pic ne change pas avec l'augmentation de température, par contre son intensité tend à diminuer progressivement. Elle diminue d'environ 50 % (par rapport à l'intensité à température ambiante de départ) dès 40 °C. Cette diminution peut être due à l'agrégation des protéines (observée aussi au niveau macroscopique). En présence d'hémoglobine le même phénomène est observé (diminution de l'intensité de fluorescence) mais à plus haute température, 50 °C, par rapport à l'échantillon de myosine isolée. Les changements de turbidité se produisent eux aussi à plus haute température et sans séparation de phase.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons voulu explorer les échantillons de bœuf à une échelle de structure intermédiaire entre le moléculaire et le macroscopique : le microscopique qui correspond à l'échelle des myofibrilles. Nous avons recherché l'impact des degrés de cuisson utilisés dans la première partie sur la contraction de ces fibres et la libération du jus concomitante. Nous avons mené des expériences de RMN-bas champ, en utilisant plusieurs séquences. Certaines séquences étaient plus adaptées pour observer la fraction la plus

mobile des protons donc le “jus” (séquence CPMG), ou au contraire plus adaptées pour observer les protons les moins mobiles donc plus spécifiques aux myofibrilles (échos de Hahn et du solide). La RMN à gradient de champ nous a permis de déterminer le coefficient de diffusion des protons mobiles (donc du jus) selon le degré de cuisson. Nous avons complété ces mesures de RMN par des expériences de tomographie de neutrons, qui nous ont permis de caractériser les évolutions de défauts et de morphologie des échantillons cuits à un certain degré de cuisson et de les corrélés avec les changements de coefficients de diffusion mesurés par RMN.

Avec la séquence CPMG, nous avons suivi l'évolution du nombre de populations de protons mobiles présentes dans l'échantillon et leurs temps de relaxation, en fonction du degré de cuisson. Les deux populations détectées tendent à relaxer plus rapidement, en augmentant le degré de cuisson : de 25 à 15 ms pour la première population, de 240 à 50 ms pour la deuxième. La réduction du temps de relaxation de la deuxième population de protons (figure 94, barres vertes) est liée à la perte en eau. Pendant la préparation de nos échantillons (cuisson aux différents degrés Sous Cuit, Trop Cuit et Trop Trop Cuit), nous avons observé la sortie du jus de l'échantillon. Nous n'avons étudié en RMN que la fraction la plus solide, le jus a été éliminé (figure 131). D'ailleurs, plus la perte en eau est importante après la cuisson, plus la diminution de ce temps de relaxation est notable. C'est à partir de l'échantillon Trop Cuit que ce changement de temps de relaxation est observé.

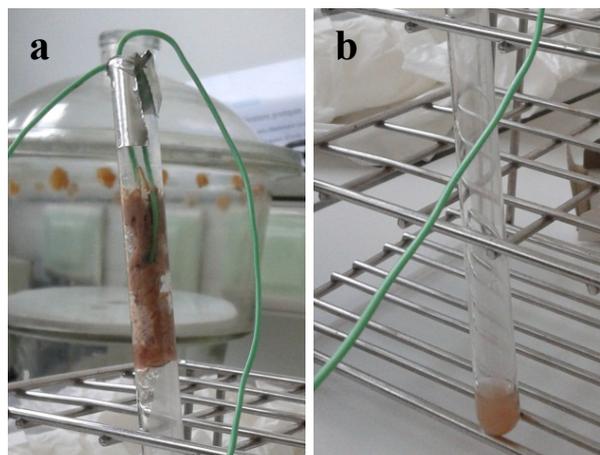


Figure 131 : Exemple d'échantillon cuit dans le tube RMN (a) et de l'eau expulsée de l'échantillon au fond du tube (b).

Nous avons utilisé deux autres séquences, la séquence de Hahn et la séquence de l'écho de solide, plus spécifiques pour détecter les populations de protons les plus rigides, associées plutôt aux protéines de structure du muscle (collagène, myofibrilles). L'analyse des spectres a mis en évidence plusieurs populations de protons, plus ou moins rigides. Ces populations peuvent être associées (figure 96) :

- aux protons de la fraction d'eau qui est en forte interaction avec la matrice et n'est pas expulsée après les traitements thermiques (barres rouges);
- à des protons de la matrice qui sont échangeables (environ 20 %), des groupes carboxyles, hydroxyles et amines (barres vertes) ;
- à des protons de la matrice qui ne sont pas échangeables et qui constituent le squelette des protéines (barres bleues cyan).

La tendance globale de ces populations est de présenter un comportement plus rigide en fonction de l'augmentation de la température de cuisson, surtout à partir du degré de cuisson Trop Cuit (68 °C). Ce comportement peut être associé à la dénaturation du collagène (entre 57 et 66 °C) d'un côté, ainsi qu'à la contraction longitudinale des myofibrilles ce qui tend à augmenter la rigidité des échantillons et à diminuer la teneur en eau de la viande. D'autre part, la diminution du coefficient de diffusion de l'eau s'accélère à 90 °C (Trop Trop Cuit) : autre indice que l'échantillon tend à devenir plus rigide.

Ces changements de mobilité observés par RMN selon le degré de cuisson sont associés à des changements de structure des échantillons que nous avons étudiés par tomographie de neutrons. Cette technique d'imagerie 3D nous a permis d'évaluer les changements de morphologie de ces mêmes échantillons de viande (figure 101) et d'évaluer la distribution spatiale et de taille des défauts. L'analyse indique que le volume occupé par les défauts (par rapport au volume total de l'échantillon) montre un changement net à partir de l'échantillon Trop Trop Cuit (90 °C) : environ 20 % du volume de l'échantillon est occupé par des défauts (figure 102). Ces données sont en accord avec nos mesures de coefficient de diffusion qui change de façon nette pour ce même échantillon.

L'objectif de la troisième partie de la thèse a été de faire des mesures nous permettant d'observer les deux échelles de structure (moléculaire et microscopique) en même temps, et de voir leurs évolutions pendant la cuisson (couplage). L'une des questions que nous avons essayé d'aborder au travers de ces expériences était : *comment relier les mesures de surface (spectroscopie) aux phénomènes qui se passent dans l'échantillon (imagerie) pendant la cuisson ?*

L'imagerie de neutrons permet de travailler sur des objets de grande taille (environ 8 x 6 cm²), mais pas très épais. Notre étude préliminaire nous a montré que des tranches de bœuf de deux millimètres d'épaisseur atténuent le signal d'environ 40-60 %. Le porte échantillon que nous avons utilisé a été construit avec deux plaques d'aluminium et un hublot pour permettre de faire des mesures par spectroscopie (avec une fibre optique) en même temps que celles d'imagerie. Le suivi de la température a été réalisé en introduisant un thermocouple à l'intérieur du porte échantillon et un autre dans la cavité du four. La puissance de l'imagerie de neutrons est de permettre d'utiliser des environnements échantillons réels : nous avons pu mettre dans le faisceau de neutrons le four Opticook (55 x 54,5 x 38 cm³) pour réaliser les cuissons. Grâce à cette configuration, nous avons pu réaliser nos expériences dans un environnement échantillon réel (four semi-professionnel).

L'analyse des images enregistrées en cours de cuisson nous a permis d'évaluer le changement de morphologie (taille de l'échantillon). Une petite variation de taille est mesurée autour de 50-60 °C et un changement beaucoup plus important se produit vers 75-80 °C. Ces changements sont associés à la dénaturation de la myosine et du collagène. Dans un premier temps, la structure commence se contracter et le jus à se déplacer dans l'échantillon. Puis à plus haute température, le jus sort en dehors de la tranche et la contraction du collagène réduit la taille de la tranche d'environ 10 à 15 %.

La cartographie des profils d'atténuation, sur une petite région, a aussi mis en évidence que, des phénomènes de contraction et de migration d'eau se passent dès 50 °C (Hamm, 1960; Bendall et Restall, 1983; Offer et Knight, 1988b). À température plus élevée, l'apparition de zones à atténuation plus faible est un indice que le jus est sorti vers la matrice externe de l'échantillon. Les zones à atténuation moyenne et moyenne-haute peuvent avoir subi un phénomène de compensation. D'un côté l'eau est partie ce qui signifie que l'atténuation a dû diminuer, mais d'un autre côté la contraction fibrillaire a pu augmenter localement l'épaisseur de la tranche et donc faire augmenter l'atténuation. Cette petite région a été aussi analysée par spectroscopie. Nous nous sommes focalisés sur la configuration visible pour suivre les hémoprotéines et leur passage de la forme oxy- à la forme met-. Un premier changement (assez faible) se déroule autour de 50 °C qui correspond à la contraction de l'échantillon observée par imagerie et à la dénaturation de la myosine. Un changement plus important des hémoprotéines est observé vers 75 °C.

Nous avons réalisé d'autres mesures de spectroscopie de fluorescence pendant la cuisson, en excitant à 405 nm et en suivant l'émission à 506 nm. Un changement d'intensité de fluorescence important est alors observé entre 60 et 70 °C, intervalle de température de dénaturation du collagène. Nous avons donc suivi l'évolution des différentes protéines, selon la configuration spectroscopique utilisée :

- par spectroscopie de fluorescence, dans l'UV (291 nm) nous avons suivi la myosine, et observé ses changements de structure autour de 40-50 °C ;
- par spectroscopie de fluorescence, dans le visible (405 nm), nous avons suivi le tissu conjonctif, et observé ses changements de structure entre 60 et 70 °C ;
- par spectroscopie dans le visible (intensité à 580 et 544 nm) nous avons suivi les hémoprotéines, qui montrent des changements légers du signal vers 50-60 °C et un changement important à 75 °C.

Au final, grâce à ces différentes spectroscopies et à leur possible mise en œuvre dans un four par l'utilisation de fibres optiques, nous pouvons penser que les protéines sont les bons marqueurs de suivi de la cuisson. D'autant plus que leurs évolutions de structures ne se déroulent pas dans la même plage de température. D'autre part, les expériences couplées de spectroscopie visible et d'imagerie, réalisées in situ (dans le four Opticook), nous ont permis d'observer sur un même échantillon les signatures moléculaires de surface (dénaturation des hémoprotéines) et les modifications se produisant dans la viande à l'échelle microscopique (contraction des fibres). Nous avons pu observer que les hémoprotéines commençaient à se dénaturer dès les faibles températures (bien avant leur température de dénaturation) suite aux changements de structure des myofibrilles. L'intérêt de ces mesures couplées est peut-être de montrer l'influence des fractions protéiques les unes par rapport aux autres, et de commencer à appréhender la complexité de la matrice viande.

Conclusions techniques et scientifiques

La thèse montre que le degré de cuisson perçu sensoriellement correspond à des modifications de conformation des protéines de viande (niveau moléculaire), à des changements de microstructure et de répartition d'eau dans la viande (niveau micro et macroscopique) et que les changements sont observables par un petit nombre d'outils spectroscopiques.

La thèse montre aussi que le degré de cuisson peut être piloté par la combinaison de deux à trois capteurs spectroscopiques (capteurs de fluorescence, visible et infrarouge) à des longueurs d'onde fixes :

- fluorescence dans l'UV – 291/330–340 nm, observant les résidus de tryptophanes, (faibles températures, 40-45 °C) ;
- fluorescence dans le visible – 405/506 nm, en observant le tissu conjonctif (températures moyennes, environ 60 °C) ;
- visible, ratio des intensités à 544 et 580 nm qui rendent compte de l'état des hémoprotéines (oxy- et met-) (températures élevées, environ 70 °C).

L'intérêt de développer un système modèle est d'être capable de mieux interpréter et assigner les phénomènes qui sont observés sur le système complexe (la viande) à une ou plusieurs protéines, à travers la maîtrise de sa composition chimique. En plus, le système modèle permettrait de comprendre les changements de structures (locales, secondaires ou agrégats) des protéines et quelles sont les interactions entre elles. Un exemple est la spectroscopie de fluorescence dans l'UV utilisée pour étudier la viande et des suspensions de myosine isolée en fonction de la température de chauffage. Nous avons observé que les changements provoqués à faible température sont liés à la dénaturation de la myosine et que la présence d'hémoglobine a un effet de protection sur l'environnement des résidus tryptophanyles de la myosine.

À côté de ces perspectives technologiques qui laissent entrevoir des innovations de rupture dans la cuisson de viande et de poisson, cette thèse a montré que l'utilisation de l'imagerie de neutrons offrait un nouveau moyen d'observation des évolutions de matrices alimentaires, une alternative à l'imagerie de RMN et de rayons-X. En effet, l'imagerie de neutrons permet de réaliser des expériences :

- *in situ*, donc à l'intérieur d'un vrai environnement échantillon (four semi-professionnel) et pendant le procédé de cuisson,
- en y couplant des mesures spectroscopiques, à travers des fibres optiques à l'intérieur de la cavité, pour observer au même temps d'autres phénomènes qui se passent (évolution du tissu conjonctif ou l'état des hémoprotéines, donc de la couleur).

La contrainte de la technique d'imagerie de neutrons reste, quand même, l'épaisseur de l'échantillon qui rend les conditions expérimentales moins réelles.

En plus, la tomographie de neutrons a permis de caractériser les défauts de structure qui se produisent suite à la cuisson et qui tendent à augmenter avec la température. L'évolution des défauts observés par tomographie suit l'évolution de la structure de l'échantillon, observée par RMN-bas champ, qui devient plus rigide. En effet, les séquences d'écho de Hahn et d'écho de Solide ont montré que la matrice tend à se rigidifier avec la température.

Ces mesures de tomographie et de RMN-bas champ ont été réalisées en deux temps : cuisson de l'échantillon puis analyse. Dans les deux cas, il serait intéressant de réussir à appliquer les

Conclusions

barèmes de cuisson Opticook, ou d'imposer une rampe de température pendant la mesure.

Perspectives

Ma thèse a été un voyage d'exploration à la surface et au cœur de la viande et du poisson. Celle-ci m'a permis de rencontrer plusieurs types de protéines ayant différentes structures, différentes formes et différentes tailles, pour aboutir à la destination finale : "le bon degré de cuisson". Les étapes clés ont été élaborées en fonction de la température à cœur des échantillons mais surtout validées selon des critères organoleptiques très classiques en sciences des aliments : la texture (tendreté, jutosité...) et la couleur. Pendant ce voyage, nous avons observé les évolutions de structure de ces protéines à plusieurs échelles, en fonction du degré de cuisson. Au niveau moléculaire, en construisant un échantillon modèle de protéines isolées, nous avons étudié l'impact de la température sur la myosine purifiée et sur un mélange de myosine et d'hémoglobine par fluorescence. Cette étude pourrait être approfondie en jouant sur plusieurs paramètres : gradient de température, force ionique et proportions entre les deux protéines. Pour à nouveau faire des observations à différentes échelles, nous pourrions ajouter dans notre valise :

- la spectroscopie dans le moyen infrarouge pour caractériser les structures secondaires de ces protéines ;
- la diffusion de neutrons aux petits angles (SANS), pour observer leur forme et leur taille mais aussi leurs interactions (répulsives ou attractives) ;
- la rhéologie grande déformation pour rendre compte des changements de viscosité ou la rhéologie dynamique pour l'étude en profondeur de l'évolution du "gel protéique" et la gélification en refroidissement.

Toutes ces expériences devraient pouvoir se faire en appliquant la température pendant la mesure.

Ce système modèle pourrait aussi être un peu complexifié, pour qu'il soit le plus proche possible de la viande. On pourrait ajouter :

- le collagène, une troisième protéine qui apporterait de la viscosité au système ; l'objectif serait d'étudier l'impact de la température et d'observer comment ces trois protéines interagissent et modifient leur structure, cette fois-ci, en milieu visqueux et très concentré (encombré) ;
- d'autres composants comme le ribose, les petites molécules azotées (carnosine, et créatine par exemple), la vitamine B1, les lipides insaturés (acide oléique) pour étudier les réactions chimiques comme la réaction de Maillard produisant des composés aromatiques ou comme des produits d'oxydation.

Pour compléter l'étude au niveau microscopique, nous pourrions compléter et confronter les données obtenues par nos expériences de RMN et de neutrons par des études de simulation numérique. Il serait en effet intéressant de réussir à améliorer les modèles mathématiques déjà existants et utilisés pour mieux rendre compte des phénomènes de contraction des fibres musculaires, et de libération du jus en fonction de la température. Au niveau du couplage entre l'imagerie de neutrons et d'autres spectroscopies et des mesures de neutrons dans un environnement complexe (comme un four), nous pourrions envisager d'utiliser d'autres outils comme la fluorescence dans l'UV, l'infrarouge (moyen et proche), ou même la RMN bas champ.

Bibliographie

Bibliographie

- Ahmad M.U., Tashiro Y., Matsukawa S., Ogawa H., (2005).** *Comparison of Horse Mackerel and Tilapia Surimi Gel Based on Rheological and ¹H NMR Relaxation Properties*, Fisheries Science, 71, (3), 655-661.
- Al-Jowder O., Kemsley E.K., Wilson R.H., (2002).** *Detection of Adulteration in Cooked Meat Products by Mid-Infrared Spectroscopy*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, (6), 1325-1329.
- Aliani M., Farmer L.J., (2005).** *Precursors of Chicken Flavor. I. Determination of Some Flavor Precursors in Chicken Muscle*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, (15), 6067-6072.
- Aliev M., Tikhonov A., (2004).** *Random Walk Analysis of Restricted Metabolite Diffusion in Skeletal Myofibril Systems*, Molecular and Cellular Biochemistry, 256, (1), 257-266.
- Antonini E., Brunori M., (1971).** Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands, in *Frontiers of Biology*, 21, North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 436.
- Antonini E., Chiancone E., (1977).** *Assembly of Multisubunit Respiratory Proteins*, Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 6, (1), 239-271.
- Aregawi W., Defraeye T., Saneinejad S., Vontobel P., Lehmann E., Carmeliet J., Derome D., Verboven P., Nicolai B., (2013).** *Dehydration of Apple Tissue: Intercomparison of Neutron Tomography with Numerical Modelling*, International Journal of Heat and Mass Transfer, 67, 173-182.
- Asghar A., Samejima K., Yasui T., (1985).** *Functionality of Muscle Proteins in Gelation Mechanisms of Structured Meat Products*, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 22, (1), 27-106.
- Aursand I.G., Erikson U., Veliyulin E., (2010).** *Water Properties and Salt Uptake in Atlantic Salmon Fillets as Affected by Ante-Mortem Stress, Rigor Mortis, and Brine Salting: A Low-Field ¹H NMR and ¹H / ²³Na MRI Study*, Food Chemistry, 120, (2), 482-489.
- Baldwin J., Chothia C., (1979).** *Haemoglobin: The Structural Changes Related to Ligand Binding and its Allosteric Mechanism*, Journal of Molecular Biology, 129, (2), 175-220.
- Bendall J.R., (1967).** *The Elastin Content of Various Muscles of Beef Animals*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 18, (12), 553-558.
- Bendall J.R., Restall D.J., (1983).** *The Cooking of Single Myofibres, Small Myofibre Bundles and Muscle Strips from Beef M. Psoas and M. Sternomandibularis Muscles at Varying Heating Rates and Temperatures*, Meat Science, 8, (2), 93-117.
- Berna F., Goldberg P., Horwitz L.K., Brink J., Holt S., Bamford M., Chazan M., (2012).** *Microstratigraphic Evidence of in Situ Fire in the Acheulean Strata of Wonderwerk Cave, Northern Cape province, South Africa*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, (20), E1215-E1220.
- Bertram H.C., Karlsson A.H., Rasmussen M., Pedersen O.D., Dønstrup S., Andersen H.J., (2001).** *Origin of Multiexponential T₂ Relaxation in Muscle Myowater*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, (6), 3092-3100.
- Bertram H.C., Purslow P.P., Andersen H.J., (2002).** *Relationship between Meat Structure, Water Mobility, and Distribution: a Low-Field Nuclear Magnetic Resonance Study*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, (4), 824-829.
- Bertram H.C., Engelsen S.B., Busk H., Karlsson A.H., Andersen H.J., (2004a).** *Water Properties during Cooking of Pork Studied by Low-Field NMR Relaxation: Effects of Curing and the RN-gene*, Meat Science, 66, (2), 437-446.
- Bertram H.C., Whittaker A.K., Andersen H.J., Karlsson A.H., (2004b).** *Visualization of Drip Channels in Meat using NMR Microimaging*, Meat Science, 68, (4), 667-670.

- Bertram H.C., Holdsworth S.J., Whittaker A.K., Andersen H.J., (2005).** *Salt Diffusion and Distribution in Meat Studied by ²³Na Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Relaxometry*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, (20), 7814-7818.
- Bertram H.C., Kohler A., Böcker U., Ofstad R., Andersen H.J., (2006a).** *Heat-Induced Changes in Myofibrillar Protein Structures and Myowater of Two Pork Qualities. A Combined FT-IR Spectroscopy and Low-Field NMR Relaxometry Study*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, (5), 1740-1746.
- Bertram H.C., Wu Z., Van den Berg F., Andersen H.J., (2006b).** *NMR Relaxometry and Differential Scanning Calorimetry during Meat Cooking*, Meat Science, 74, (4), 684-689.
- Bertram H.C., Aaslyng M.D., (2007).** *Pelvic Suspension and Fast Post-Mortem Chilling: Effects on Technological and Sensory Quality of Pork – A Combined NMR and Sensory Study*, Meat Science, 76, (3), 524-535.
- Bianconi A., Congiu-Castellano A., Dell'Ariccia M., Giovannelli A., Burattini E., Durham P.J., (1985).** *Increase of the Fe Effective Charge in Hemoproteins during Oxygenation Process*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 131, (1), 98-102.
- Boden N., Mortimer M., (1973).** *An NMR “Solid” Echo Experiment for the Direct Measurement of the Dipolar Interactions between Spin 1/2 Pairs in Solids*, Chemical Physics Letters, 21, (3), 538-540.
- Bogosavljevic-Boskovic S., Mitrovic S., Djokovic R., Doskovic V., Djermanovic V., (2010).** *Chemical Composition of Chicken Meat Produced in Extensive Indoor and Free Range Rearing Systems*, African Journal of Biotechnology, 9, (53), 9069-9075.
- Boleman S.J., Boleman S.L., Miller R.K., Taylor J.F., Cross H.R., Wheeler T.L., Koochmarai M., Shackelford S.D., Miller M.F., West R.L., Johnson D.D., Savell J.W., (1997).** *Consumer Evaluation of Beef of Known Categories of Tenderness*, Journal of Animal Science, 75, (6), 1521-1524.
- Bonny J.-M., Renou J.-P., (2002).** *Water Diffusion Features as Indicators of Muscle Structure ex Vivo*, Magnetic Resonance Imaging, 20, (5), 395-400.
- Bordas M., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., (2004).** *Formation and Stability of Heterocyclic Amines in a Meat flavour Model System: Effect of Temperature, Time and Precursors*, Journal of Chromatography B, 802, (1), 11-17.
- Bouhrara M., Clerjon S., Damez J.-L., Chevarin C., Portanguen S., Kondjoyan A., Bonny J.-M., (2011).** *Dynamic MRI and Thermal Simulation to Interpret Deformation and Water Transfer in Meat during Heating*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, (4), 1229-1235.
- Bouhrara M., Clerjon S., Damez J.-L., Kondjoyan A., Bonny J.-M., (2012).** *In Situ Imaging Highlights Local Structural Changes during Heating: the Case of Meat*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, (18), 4678-4687.
- Bourne M.C., (2002).** Practice of Objective Texture Measurement, in *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*, 2nd, Elsevier Science & Technology Books, London, UK, 189-234.
- Bouton P.E., Harris P.V., Shorthose W.R., (1976).** *Dimensional Changes in Meat during Cooking*, Journal of Texture Studies, 7, (2), 179-192.
- Bozec L., Odlyha M., (2011).** *Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy*, Biophysical Journal, 101, (1), 228-236.
- Bradley D.S., Von Meerwall E.D., Roberts G.D., Kamvouris J., (1995).** *NMR Relaxation Study of Thermal Degradation in Cured PMR Polyimides*, Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 33, (10), 1545-1557.

- Brewer M.S., (2004).** Chemical and Physical Characteristics of Meat, Water-Holding Capacity, in *Encyclopedia of Meat Sciences*, Elsevier, Oxford, 242-249.
- Brix O., Apablaza P., Baker A., Taxt T., Grüner R., (2009).** *Chemical Shift based MR Imaging and Gas Chromatography for Quantification and Localization of Fat in Atlantic Mackerel*, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 376, (2), 68-75.
- Bureš D., Bartoň L., Zahradková R., Teslík V., M. K., (2006).** *Chemical Composition, Sensory Characteristics, and Fatty Acid Profile of Muscle from Aberdeen Angus, Charolais, Simmental, and Hereford Bulls*, Czech Journal of Animal Science, 51, (7), 279–284.
- Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N., (1973).** *Fluorescence and the Location of Tryptophan Residues in Protein Molecules*, Photochemistry and Photobiology, 18, (4), 263-279.
- Byrne C.E., Downey G., Troy D.J., Buckley D.J., (1998).** *Non-Destructive Prediction of Selected Quality Attributes of Beef by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy between 750 and 1098 nm*, Meat Science, 49, (4), 399-409.
- Carr H.Y., Purcell E.M., (1954).** *Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments*, Physical Review, 94, (3), 630-638.
- Cerny C., Briffod M., (2007).** *Effect of pH on the Maillard Reaction of [¹³C₅] Xylose, Cysteine, and Thiamin*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, (4), 1552-1556.
- Chien K.R., Domian I.J., Parker K.K., (2008).** *Cardiogenesis and the Complex Biology of Regenerative Cardiovascular Medicine*, Science, 322, (5907), 1494-1497.
- Cho S.H., Park B.Y., Kim J.H., Hwang I.H., Kim J.H., Lee J.M., (2005).** *Fatty Acid Profiles and Sensory Properties of Longissimus dorsi, Triceps brachii, and Semimembranosus Muscles from Korean Hanwoo and Australian Angus Beef*, Asian-Australasian journal of animal sciences, 18, (12), 1786-1793.
- CIE (2004).** *Colorimetry (3rd edition)*, Technical Report, 1-72.
- Clerjon S., Luc C., Peyrin F., Lepetit J., Culioli J., (2008).** *Fluorescence Polarimetry for Quantification of Collagen Destructuration after Heating*, in ICoMST, International Congress of Meat Science and Technology, Cape Town, South Africa, 1-3.
- Collignon J., Sillescu H., Spiess H.W., (1981).** *Pseudo-Solid Echoes of Proton and Deuteron NMR in Polyethylene Melts*, Colloid and Polymer Science, 259, (2), 220-226.
- Cooke R., Wien R., (1971).** *The State of Water in Muscle Tissue as Determined by Proton Nuclear Magnetic Resonance*, Biophysical Journal, 11, (12), 1002-1017.
- Cope F.W., (1969).** *Nuclear Magnetic Resonance Evidence using D₂O for Structured Water in Muscle and Brain*, Biophysical Journal, 9, (3), 303-319.
- Craig R.W., Padrón R., (2004).** *Molecular Structure of the Sarcomere*, in *Myology, 3rd Edition*, The McGraw-Hill Companies, New York, 39.
- Damez J.-L., Clerjon S., (2008).** *Meat Quality Assessment using Biophysical Methods Related to Meat Structure*, Meat Science, 80, (1), 132-149.
- Davis J.S., Buck J., Greene E.P., (1982).** *The Myosin Dimer: an Intermediate in the Self-Assembly of the Thick Filament of Vertebrate Skeletal Muscle*, FEBS Letters, 140, (2), 293-297.
- De Huidobro F.R., Miguel E., Blázquez B., Onega E., (2005).** *A Comparison between Two Methods (Warner–Bratzler and Texture Profile Analysis) for Testing either Raw Meat or Cooked Meat*, Meat Science, 69, (3), 527-536.

- De Marchi M., Penasa M., Cecchinato A., Bittante G., (2013).** *The Relevance of Different Near Infrared Technologies and Sample Treatments for Predicting Meat Quality Traits in Commercial Beef Cuts*, Meat Science, 93, (2), 329-335.
- Destefanis G., Brugiapaglia A., Barge M.T., Dal Molin E., (2008).** *Relationship between Beef Consumer Tenderness Perception and Warner–Bratzler Shear Force*, Meat Science, 78, (3), 153-156.
- Diesbourg L., Swatland H.J., Millman B.M., (1988).** *X-Ray Diffraction Measurements of Postmortem Changes in the Myofibrillar Lattice of Pork*, Journal Articles, USDA Authors, Peer-Reviewed, 66, (4), 1048-1054.
- Dikeman M.E., Tuma H.J., Glimp H.A., Gregory K.E., Allen D.M., (1972).** *Evaluation of the Tenderometer for Predicting Bovine Muscle Tenderness*, Journal of Animal Science, 34, (6), 960-962.
- Dill K.A., (1990).** *Dominant Forces in Protein Folding*, Biochemistry, 29, (31), 7133-7155.
- Dion B., Ruzbie M., van de Voort F.R., Ismail A.A., Blais J.S., (1994).** *Determination of Protein and Fat in Meat by Transmission Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Analyst, 119, (8), 1765-1771.
- Dominguez R., Freyzon Y., Trybus K.M., Cohen C., (1998).** *Crystal Structure of a Vertebrate Smooth Muscle Myosin Motor Domain and Its Complex with the Essential Light Chain: Visualization of the Pre-Power Stroke State*, Cell, 94, (5), 559-571.
- Dong A., Caughey W.S., (1994).** [9] *Infrared Methods for Study of Hemoglobin Reactions and Structures*, in *Methods in Enzymology*, Volume 232, Academic Press, 139-175.
- Dreizen P., Gershman L.C., Trotta P.P., Stracher A., (1967).** *Myosin: Subunits and their Interactions*, The Journal of General Physiology, 50, (6), 85-118.
- Driedzic W., Stewart J., (1982).** *Myoglobin Content and the Activities of Enzymes of Energy Metabolism in Red and White Fish Hearts*, Journal of comparative physiology, 149, (1), 67-73.
- Dubé G., Bramblett V.D., Judge M.D., Harrington R.B., (1972).** *Physical Properties and Sulfhydryl Content of Bovine Muscles*, Journal of Food Science, 37, (1), 23-26.
- Duchène C., Pascal G., Prigent S., (2010).** *Les Viandes Aujourd'hui : Principales Caractéristiques Nutritionnelles*, Cahiers de Nutrition et de Diététique, 45, (1), 44-54.
- Dufour E., (2009).** *Principles of Infrared Spectroscopy*, in *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Academic Press, London, London, UK, 3-27.
- Emel'yanenko V.I., Burshtein É.A., (1998).** *Analytical Description of the Fluorescence Spectra of Aromatic Amino Acids and Proteins*, Journal of Applied Spectroscopy, 65, (3), 372-378.
- Emel'yanenko V.I., Reshetniak Ia K., Andreev O.A., Burshtein E.A., (2000).** *Analysis of the Log-Normal Components of the Fluorescence Spectra of Protein-bound Prodan and Acrylodan*, Biofizika, 45, (2), 207-219.
- Estévez M., Kylli P., Puolanne E., Kivikari R., Heinonen M., (2008).** *Fluorescence Spectroscopy as a Novel Approach for the Assessment of Myofibrillar Protein Oxidation in Oil-in-Water Emulsions*, Meat Science, 80, (4), 1290-1296.
- Estévez M., (2011).** *Protein Carbonyls in Meat Systems: a Review*, Meat Science, 89, (3), 259-279.
- Fechete R., Demco D.E., Blümich B., (2003).** *Chain Orientation and Slow Dynamics in Elastomers by Mixed Magic-Hahn Echo Decays*, The Journal of Chemical Physics, 118, (5), 2411-2421.
- Ferguson B., Wang S., Gray D.A., Abbott D., Zhang X.-C., (2001).** *Terahertz Imaging of Biological Tissue using a Chirped Probe Pulse*, in *Electronic and Structure for MEMS II*, 172-184.
- Fermi G., (1975).** *Three-Dimensional Fourier Synthesis of Human Deoxyhaemoglobin at 2.5 Å Resolution: Refinement of the Atomic Model*, Journal of Molecular Biology, 97, (2), 237-256.

- Findlay C.J., Stanley D.W., (1984).** *Differential Scanning Calorimetry of Beef Muscle: Influence of Sarcomere Length*, Journal of Food Science, 49, (6), 1529-1531.
- Findlay C.J., Stanley D.W., Gullett E.A., (1986).** *Thermomechanical Properties of Beef Muscle*, Meat Science, 16, (1), 57-70.
- Findlay C.J., Barbut S., (1990).** Thermal Analysis of Meat, in *Thermal Analysis of Foods*, Elsevier Applied Science, London (UK), 92-125.
- Fleming H.P., Blumer T.N., Craig H.B., (1960).** *Quantitative Estimations of Myoglobin and Hemoglobin in Beef Muscle Extracts*, Journal of Animal Science, 19, (4), 1164-1171.
- Folland R., Charlesby A., (1978).** *Entanglement Effects on the NMR Spin-Spin Relaxation in Polyethylene Melts*, Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 16, (7), 339-344.
- Fox J.B., (1966).** *The Chemistry of Meat Pigments*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 14, (3), 207-210.
- Frankel E.N., (1980).** *Lipid Oxidation*, Progress in Lipid Research, 19, (1-2), 1-22.
- Fuchs G.D., Dobrovitski V.V., Toyli D.M., Heremans F.J., Weis C.D., Schenkel T., Awschalom D.D., (2010).** *Excited-State Spin Coherence of a Single Nitrogen-Vacancy Centre in Diamond*, Nature Physics, 6, (9), 668-672.
- Fujimoto D., Akiba K.-y., Nakamura N., (1977).** *Isolation and Characterization of a Fluorescent Material in Bovine Achilles Tendon Collagen*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 76, (4), 1124-1129.
- Fujimoto D., Moriguchi T., Ishida T., Hayashi H., (1978).** *The Structure of Pyridinoline, a Collagen Crosslink*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 84, (1), 52-57.
- Fujimoto K., Nishi T., Kado R., (1972).** *Multiple-Pulse Nuclear Magnetic Resonance Experiments on some Crystalline Polymers*, Polym J, 3, (4), 448-462.
- Gallop P.M., Blumenfeld O.O., Seifter S., (1972).** *Structure and Metabolism of Connective Tissue Proteins*, Annual Review of Biochemistry, 41, (1), 617-672.
- 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, 85, (3), 402-409.
- García-Rey R.M., García-Olmo J., De Pedro E., Quiles-Zafra R., Luque de Castro M.D., (2005).** *Prediction of Texture and Colour of Dry-Cured Ham by Visible and Near Infrared Spectroscopy using a Fiber Optic Probe*, Meat Science, 70, (2), 357-363.
- Gatellier P., Gomez S., Gigaud V., Berri C., Bihan-Duval E.L., Santé-Lhoutellier V., (2007).** *Use of a Fluorescence Front Face Technique for Measurement of Lipid Oxidation during Refrigerated Storage of Chicken Meat*, Meat Science, 76, (3), 543-547.
- Gatellier P., Santé-Lhoutellier V., Portanguen S., Kondjoyan A., (2009).** *Use of Meat Fluorescence Emission as a Marker of Oxidation Promoted by Cooking*, Meat Science, 83, (4), 651-656.
- Gelse K., Pöschl E., Aigner T., (2003).** *Collagens - Structure, Function, and Biosynthesis*, Advanced Drug Delivery Reviews, 55, (12), 1531-1546.
- Ginger I.D., Wilson G.D., Schweigert B.S., (1954).** *Quantitative Determination in Beef and Pork Muscle*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2, (20), 1037-1037.
- Guiheneuf T.M., Gibbs S.J., Hall L.D., (1997).** *Measurement of the Inter-Diffusion of Sodium Ions during Pork Brining by One-Dimensional ²³Na Magnetic Resonance Imaging (MRI)*, Journal of Food Engineering, 31, (4), 457-471.

- Hahn E.L., (1950).** *Spin Echoes*, Physical Review, 80, (4), 580-594.
- Hamm R., (1960).** Biochemistry of Meat Hydration, in *Advances in Food Research*, Volume 10, Academic Press, 355-463.
- Hamm R., Deatherage F.E., (1960).** *Changes in Hydration, Solubility and Charges of Muscle Proteins during Heating of Meat*, Journal of Food Science, 25, (5), 587-610.
- Hamm R., Hofmann K., (1965).** *Changes in the Sulphydryl and Disulphide Groups in Beef Muscle Proteins during Heating*, Nature, 207, (5003), 1269-1271.
- Hanson J., Huxley H.E., (1957).** *Quantitative Studies on the Structure of Cross-Striated Myofibrils: II. Investigations by Biochemical Techniques*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 23, (0), 250-260.
- Hayashida M., Maita T., Matsuda G., (1991).** *The Primary Structure of Skeletal Muscle Myosin Heavy Chain: I. Sequence of the Amino-Terminal 23 kDa Fragment*, Journal of Biochemistry, 110, (1), 54-59.
- Hazlewood C.F., Nichols B.L., Chamberlain N.F., (1969).** *Evidence for the Existence of a Minimum of Two Phases of Ordered Water in Skeletal Muscle*, Nature, 222, (5195), 747-750.
- Hegarty P.V.J., Allen C.E., (1975).** *Thermal Effects on the Length of Sarcomeres in Muscles Held at Different Tensions*, Journal of Food Science, 40, (1), 24-27.
- Hirsch R.E., Zukin R.S., Nagel R.L., (1980).** *Intrinsic Fluorescence Emission of Intact oxy-Hemoglobins*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 93, (2), 432-439.
- Hirsch R.E., Nagel R.L., (1981).** *Conformational Studies of Hemoglobins using Intrinsic Fluorescence Measurements*, Journal of Biological Chemistry, 256, (3), 1080-1083.
- Hirsch R.E., (1994).** [12] Front-Face Fluorescence Spectroscopy of Hemoglobins, in *Methods in Enzymology*, Volume 232, Academic Press, 231-246.
- Hoshina H., Hayashi A., Miyoshi N., Miyamaru F., Otani C., (2009).** *Terahertz Pulsed Imaging of Frozen Biological Tissues*, Applied Physics Letters, 94, (12), 123901.
- Hostetler R.L., Landmann W.A., (1968).** *Photomicrographic Studies of Dynamic Changes in Muscle Fiber Fragments. I. Effect of Various Heat Treatments on Length, Width and Birefringence*, Journal of Food Science, 33, (5), 468-470.
- Hoy G.R., Cook D.C., Berger R.L., Friedman F.K., (1986).** *Mössbauer Spectroscopic Studies of Hemoglobin and its Isolated Subunits*, Biophysical Journal, 49, (5), 1009-1015.
- Hu X., Spiro T.G., (1997).** *Tyrosine and Tryptophan Structure Markers in Hemoglobin Ultraviolet Resonance Raman Spectra: Mode Assignments via Subunit-Specific Isotope Labeling of Recombinant Protein*, Biochemistry, 36, (50), 15701-15712.
- Huff E.J., Parrish F.C., (1993).** *Bovine Longissimus Muscle Tenderness as Affected by Postmortem Aging Time, Animal Age and Sex*, Journal of Food Science, 58, (4), 713-716.
- Hunt M.C., Sørheim O., Slinde E., (1999).** *Color and Heat Denaturation of Myoglobin Forms in Ground Beef*, Journal of Food Science, 64, (5), 847-851.
- Huxley H.E., (1953).** *Electron Microscope Studies of the Organisation of the Filaments in Striated Muscle*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 12, (1-2), 387-394.
- Huxley H.E., (1957).** *The Double Array of Filaments in Cross-Striated Muscle*, The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 3, (5), 631-648.

- Huxley H.E., Hanson J., (1957).** *Quantitative Studies on the Structure of Cross-Striated Myofibrils: I. Investigations by Interference Microscopy*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 23, (0), 229-249.
- Huxley H.E., (1963).** *Electron Microscope Studies on the Structure of Natural and Synthetic Protein Filaments from Striated Muscle*, Journal of Molecular Biology, 7, (3), 281-308.
- Ironside J.I.M., Love R.M., (1958).** *Studies on Protein Denaturation in Frozen Fish. I. - Biological Factors Influencing the Amounts of Soluble and Insoluble Protein Present in the Muscle of the North Sea Cod*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 9, (9), 597-604.
- ISO (2008).** ISO 5492:2008, *Sensory Analysis - Vocabulary*, Technical Rule, 1-123.
- ISO (2010a).** ISO 8292-2:2010, *Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Solid Fat Content by Pulsed NMR - Part 2: Indirect Method* Technical Rule, 1-24.
- ISO (2010b).** ISO 8292-1:2010, *Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Solid Fat Content by Pulsed NMR - Part 1: Direct Method* Technical Rule, 1-35.
- Itoh M., Mizukoshi H., Fuke K., Matsukawa S., Mawatari K., Yoneyama Y., Sumitani M., Yoshihara K., (1981).** *Tryptophan Fluorescence of Human Hemoglobin. I. Significant Change of Fluorescence Intensity and Lifetimes in the T – R Transition*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 100, (3), 1259-1265.
- Jackson D.S., Ayad S., Mechanic G., (1974).** *Effect of Heat on some Collagen Cross-Links*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 336, (1), 100-107.
- Jaturasitha S., Srikanchai T., Kreuzer M., Wicke M., (2008).** *Differences in Carcass and Meat Characteristics Between Chicken Indigenous to Northern Thailand (Black-Boned and Thai Native) and Imported Extensive Breeds (Bresse and Rhode Island Red)*, Poultry Science, 87, (1), 160-169.
- Jelkmann W., Bauer C., (1976).** *What is the Best Method to Remove 2,3-Diphosphoglycerate from Hemoglobin?*, Analytical Biochemistry, 75, (2), 382-388.
- Jeremiah L.E., Dugan M.E.R., Aalhus J.L., Gibson L.L., (2003).** *Assessment of the Chemical and Cooking Properties of the Major Beef Muscles and Muscle Groups*, Meat Science, 65, (3), 985-992.
- Kaminer B., Bell A.L., (1966).** *Myosin Filamentogenesis: Effects of pH and Ionic Concentration*, Journal of Molecular Biology, 20, (2), 391-401.
- Katsura I., Noda H., (1973).** *Further Studies on the Formation of Reconstituted Myosin Filaments*, Journal of Biochemistry, 73, (2), 245-256.
- Kenyon B., Kleinberg R., Straley C., Gubelin G., Morriss C., (1995).** *Nuclear Magnetic Resonance Imaging: Technology for the 21st Century* Oilfield Review, 7, (3), 19-33.
- Khan A.W., Van Den Berg L., (1965).** *Changes in Chicken Muscle Proteins During Cooking and Subsequent Frozen Storage, and Their Significance in Quality*, Journal of Food Science, 30, (1), 151-153.
- Kitamura K., Hozumi K., (1987).** *Effect of Savitzky-Golay Smoothing on Second-Derivative Spectra*, Analytica Chimica Acta, 201, 301-304.
- Komine Y., Maita T., Matsuda G., (1991).** *The Primary Structure of Skeletal Muscle Myosin Heavy Chain: II. Sequence of the 50 kDa Fragment of Subfragment-1*, Journal of Biochemistry, 110, (1), 60-67.
- Kopp J., Bonnet M., Renou J.P., (1990).** *Effect of Collagen Crosslinking on Collagen-Water Interactions (A DSC Investigation)*, Matrix, 9, (6), 443-450.
- Koretz J.F., (1982).** [6] Hybridization and Reconstitution of Thick-Filament Structure, in *Methods in Enzymology*, Volume 85, Academic Press, 20-55.

- Koretz J.F., Coluccio L.M., Bertasso A.M., (1982).** *The Aggregation Characteristics of Column-Purified Rabbit Skeletal Myosin in the Presence and Absence of C-Protein at pH 7.0*, Biophysical Journal, 37, (2), 433-440.
- Kranen R., van Kuppevelt T., Goedhart H., Veerkamp C., Lambooy E., Veerkamp J., (1999).** *Hemoglobin and Myoglobin Content in Muscles of Broiler Chickens*, Poultry Science, 78, (3), 467-476.
- Kryvi H., Totland G.K., Ulriksen D., Slinde E., (1985).** *The Distribution of Connective Tissue Content in Swimming Muscle of Cod (Gadus morhua)*, Journal of Applied Ichthyology, 1, (2), 71-76.
- Ladikos D., Wedzicha B.L., (1988).** *The Chemistry and Stability of the Haem-Protein Complex in Relation to Meat*, Food Chemistry, 29, (2), 143-155.
- Ladikos D., Lougovois V., (1990).** *Lipid Oxidation in Muscle Foods: a Review*, Food Chemistry, 35, (4), 295-314.
- Lagorce-Tachon A., Karbowski T., Loupiac C., Gaudry A., Ott F., Alba-Simionesco C., Gougeon R.D., Alcantara V., Mannes D., Kaestner A., Lehmann E., Bellat J.-P., (2015).** *The Cork Viewed from the Inside*, Journal of Food Engineering, 149, 214-221.
- Lakowicz J.R., (2006).** Introduction to Fluorescence, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, 1-26.
- Lane P., Lam S., Follen M., MacAulay C., (2012).** *Oral Fluorescence Imaging using 405-nm Excitation, Aiding the Discrimination of Cancers and Precancers by Identifying Changes in Collagen and Elastic Breakdown and Neovascularization in the Underlying Stroma*, Gender Medicine, 9, (1, Supplement), S78-S82.e78.
- Lawrie R.A., Ledward D.A., (2006).** Chemical and Biochemical Constitution of Muscle, in *Lawrie's Meat Science*, 7th Edition, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH, England, 75-127.
- Lee W.-H., Lee W., (2014).** *Food Inspection System using Terahertz Imaging*, Microwave and Optical Technology Letters, 56, (5), 1211-1214.
- Lehmann E.H., Kaestner A., Josic L., Hartmann S., Mannes D., (2011a).** *Imaging with Cold Neutrons*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 651, (1), 161-165.
- Lehmann E.H., Vontobel P., Frei G., Kuehne G., Kaestner A., (2011b).** *How to Organize a Neutron Imaging User Lab? 13 Years of Experience at PSI, CH*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 651, (1), 1-5.
- Levitt M., Greer J., (1977).** *Automatic Identification of Secondary Structure in Globular Proteins*, Journal of Molecular Biology, 114, (2), 181-239.
- Light N., Champion A.E., (1984).** *Characterization of Muscle Epimysium, Perimysium and Endomysium Collagens*, The Biochemical Journal, 219, (3), 1017-1026.
- Lim J.S., (1990).** Image Enhancement, in *Two-Dimensional Signal and Image Processing*, Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, 451-523.
- Lin S.J., Lo W., Tan H.Y., Chan J.Y., Chen W.L., Wang S.H., Sun Y., Lin W.C., Chen J.S., Hsu C.J., Tjiu J.W., Yu H.S., Jee S.H., Dong C.Y., (2006).** *Prediction of Heat-Induced Collagen Shrinkage by use of Second Harmonic Generation Microscopy*, Journal of Biomedical Optics, 11, (3), 34020.
- Liu C., Bo A., Cheng G., Lin X., Dong S., (1998).** *Characterization of the Structural and Functional Changes of Hemoglobin in Dimethyl Sulfoxide by Spectroscopic Techniques*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1385, (1), 53-60.
- Liu Y., Chen Y.-R., Ozaki Y., (2000).** *Two-Dimensional Visible/Near-Infrared Correlation Spectroscopy Study of Thermal Treatment of Chicken Meats*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, (3), 901-908.

- Locker R.H., (1956).** *The Dissociation of Myosin by Heat Coagulation*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 20, (0), 514-521.
- Löffler T., Bauer T., Siebert K., Roskos H., Fitzgerald A., Czasch S., (2001).** *Terahertz Dark-Field Imaging of Biomedical Tissue*, *Optics Express*, 9, (12), 616-621.
- Lombardi-Boccia G., Lanzi S., Aguzzi A., (2005).** *Aspects of Meat Quality: Trace Elements and B Vitamins in Raw and Cooked Meats*, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, (1), 39-46.
- Love R.M., (1960).** *Water Content of Cod (Gadus callarias L.) Muscle*, *Nature*, 185, (4714), 692-692.
- Lowey S., Slayter H.S., Weeds A.G., Baker H., (1969).** *Substructure of the Myosin Molecule: I. Subfragments of Myosin by Enzymic Degradation*, *Journal of Molecular Biology*, 42, (1), 1-29.
- Mahmoud-Ghoneim D., Bonny J.-M., Renou J.-P., de Certaines J.D., (2005).** *Ex-Vivo Magnetic Resonance Image Texture Analysis Can Discriminate Genotypic Origin in Bovine Meat*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, (4), 629-632.
- Maillard L.C., (1912).** *Action des Acides Aminés sur les Sucres; Formation des Mélanoidines par Voie Méthodique*, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 152, 66-68.
- Maita T., Hayashida M., Tanioka Y., Komine Y., Matsuda G., (1987).** *The Primary Structure of the Myosin Head*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, (2), 416-420.
- Maita T., Miyanishi T., Matsuzono K., Tanioka Y., Matsuda G., (1991a).** *The Primary Structure of Skeletal Muscle Myosin Heavy Chain: III. Sequence of the 22 kDa Fragment and the Alignment of the 23 kDa, 50 kDa, and 22 kDa Fragments*, *Journal of Biochemistry*, 110, (1), 68-74.
- Maita T., Yajima E., Nagata S., Miyanishi T., Nakayama S., Matsuda G., (1991b).** *The Primary Structure of Skeletal Muscle Myosin Heavy Chain: IV. Sequence of the Rod, and the Complete 1,938-Residue Sequence of the Heavy Chain*, *Journal of Biochemistry*, 110, (1), 75-87.
- Margossian S.S., Lowey S., (1973).** *Substructure of the Myosin Molecule: IV. Interactions of Myosin and its Subfragments with Adenosine Triphosphate and F-Actin*, *Journal of Molecular Biology*, 74, (3), 313-330.
- Margossian S.S., Lowey S., (1982).** [7] Preparation of Myosin and its Subfragments from Rabbit Skeletal Muscle, in *Methods in Enzymology*, Volume 85, Academic Press, 55-71.
- Mariette F., (2009).** *Investigations of Food Colloids by NMR and MRI*, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14, (3), 203-211.
- Mariette F., Collewet G., Davenel A., Lucas T., Musse M., (2012).** Quantitative MRI in Food Science & Food Engineering, in *eMagRes*, 1, John Wiley & Sons, Ltd, 1-8.
- McLachlan A.D., Karn J., (1982).** *Periodic Charge Distributions in the Myosin Rod Amino Acid Sequence Match Cross-Bridge Spacings in Muscle*, *Nature*, 299, (5880), 226-231.
- Meiboom S., Gill D., (1958).** *Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times*, *Review of Scientific Instruments*, 29, (8), 688-691.
- Micklander E., Peshlov B., Purslow P.P., Engelsen S.B., (2002).** *NMR-Cooking: Monitoring the Changes in Meat during Cooking by Low-Field ¹H-NMR*, *Trends in Food Science & Technology*, 13, (9-10), 341-346.
- Miller E.J., Gay S., (1982).** [1] Collagen: An overview, in *Methods in Enzymology*, Volume 82, Academic Press, 3-32.
- Miller E.J., Rhodes R.K., (1982).** [2] Preparation and Characterization of the Different Types of Collagen, in *Methods in Enzymology*, Volume 82, Academic Press, 33-64.

- Mohr V., Bendall J.R., (1969).** *Constitution and Physical Chemical Properties of Intramuscular Connective Tissue*, Nature, 223, (5204), 404-405.
- Morvan D., Leroy-Willig A., (1995).** *Simultaneous Measurements of Diffusion and Transverse Relaxation in Exercising Skeletal Muscle*, Magnetic Resonance Imaging, 13, (7), 943-948.
- Mottram D.S., (1985).** *The Effect of Cooking Conditions on the Formation of Volatile Heterocyclic Compounds in Pork*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 36, (5), 377-382.
- Muirhead H., Greer J., (1970).** *Three-Dimensional Fourier Synthesis of Human Deoxyhaemoglobin at 3.5 Å Resolution*, Nature, 228, (5271), 516-519.
- Niederman R., Pollard T.D., (1975).** *Human Platelet Myosin. II. In Vitro Assembly and Structure of Myosin Filaments*, The Journal of Cell Biology, 67, (1), 72-92.
- Niederman R., Peters L.K., (1982).** *Native Bare Zone Assemblage Nucleates Myosin Filament Assembly*, Journal of Molecular Biology, 161, (4), 505-517.
- Obuz E., Dikeman M.E., Loughin T.M., (2003).** *Effects of Cooking Method, Reheating, Holding Time, and Holding Temperature on Beef Longissimus Lumborum and Biceps Femoris Tenderness*, Meat Science, 65, (2), 841-851.
- Offer G., Trinick J., (1983).** *On the Mechanism of Water Holding in Meat: The Swelling and Shrinking of Myofibrils*, Meat Science, 8, (4), 245-281.
- Offer G., Knight P., (1988a).** *The Structural Basis of Meat Water-Holding in Meat, Part 2: Drip Losses*, in *Developments in Meat Science - 4*, 4, Elsevier Science Publishers LTD, London (UK), 173-243.
- Offer G., Knight P., (1988b).** *The Structural Basis of Meat Water-Holding in Meat, Part 1: General Principles and Water Uptake in Meat Processing*, in *Developments in Meat Science - 4*, 4, Elsevier Science Publishers LTD, London (UK), 63-171.
- Offer G., Knight P., (1996).** *The Structure of the Head-Tail Junction of the Myosin Molecule*, Journal of Molecular Biology, 256, (3), 407-416.
- Ogawa M., Miyagi R., Tamiya T., Tsuchiya T., (1999).** *Comparison of the Stability of Fish Light Meromyosins by Guanidine Hydrochloride Denaturation*, Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 122, (4), 439-446.
- Ok G., Kim H.J., Chun H.S., Choi S.-W., (2014).** *Foreign-Body Detection in Dry Food using Continuous Sub-Terahertz Wave Imaging*, Food Control, 42, (0), 284-289.
- Otremba M.M., Dikeman M.E., Milliken G.A., Stroda S.L., Chambers Iv E., Chambers D., (2000).** *Interrelationships between Descriptive Texture Profile Sensory Panel and Descriptive Attribute Sensory Panel Evaluations of Beef Longissimus and Semitendinosus Muscles*, Meat Science, 54, (4), 325-332.
- Palka K., Daun H., (1999).** *Changes in Texture, Cooking Losses, and Myofibrillar Structure of Bovine M. Semitendinosus during Heating*, Meat Science, 51, (3), 237-243.
- Park B., Chen Y.R., Hruschka W.R., Shackelford S.D., Koohmaraie M., (1998).** *Near-Infrared Reflectance Analysis for Predicting Beef Longissimus Tenderness*, Journal of Animal Science, 76, (8), 2115-2120.
- Patra D., Barakat C., (2012).** *Time-Resolved Fluorescence Study during Denaturation and Renaturation of Curcumin-Myoglobin Complex*, International Journal of Biological Macromolecules, 50, (4), 885-890.
- Perutz M.F., (1968).** *Preparation of Haemoglobin crystals*, Journal of Crystal Growth, 2, (1), 54-56.
- Pin S., Alpert B., Michalowicz A., (1982).** *An Investigation by Iron K-Edge Spectroscopy of the Oxidation State of Iron in Hemoglobin and its Subunits*, FEBS Letters, 147, (1), 106-110.

- Powles J.G., Mansfield P., (1962).** *Double-Pulse Nuclear-Resonance Transients in Solids*, Physics Letters, 2, (2), 58-59.
- Powles J.G., Strange J.H., (1963).** *Zero Time Resolution Nuclear Magnetic Resonance Transient in Solids*, Proceedings of the Physical Society, 82, (1), 6.
- Prabhu V., Rao S.B.S., Fernandes E.M., Rao A.C.K., Prasad K., Mahato K.K., (2014).** *Objective Assessment of Endogenous Collagen In Vivo during Tissue Repair by Laser Induced Fluorescence*, PLoS ONE, 9, (5), e98609.
- Prieto N., Roche R., Lavín P., Batten G., Andrés S., (2009).** *Application of Near Infrared Reflectance Spectroscopy to Predict Meat and Meat Products Quality: A Review*, Meat Science, 83, (2), 175-186.
- Prieto N., Ross D.W., Navajas E.A., Richardson R.I., Hyslop J.J., Simm G., Roche R., (2011).** *Online Prediction of Fatty Acid Profiles in Crossbred Limousin and Aberdeen Angus Beef Cattle using Near Infrared Reflectance Spectroscopy*, Animal, 5, (01), 155-165.
- Rashed R.M., El-Alfy S.H., (2012).** *Ultrastructural Organization of Muscle Fiber Types and Their Distribution in the Rat Superior Rectus Extraocular Muscle*, Acta Histochemica, 114, (3), 217-225.
- Rayment I., Holden H.M., (1993).** *Myosin Subfragment-1: Structure and Function of a Molecular Motor*, Current Opinion in Structural Biology, 3, (6), 944-952.
- Rayment I., Rypniewski W., Schmidt-Base K., Smith R., Tomchick D., Benning M., Winkelmann D., Wesenberg G., Holden H., (1993).** *Three-Dimensional Structure of Myosin Subfragment-1: a Molecular Motor*, Science, 261, (5117), 50-58.
- Rayment I., Holden H.M., (1994).** *The Three-Dimensional Structure of a Molecular Motor*, Trends in Biochemical Sciences, 19, (3), 129-134.
- Reisler E., Smith C., Seegan G., (1980).** *Myosin Minifilaments*, Journal of Molecular Biology, 143, (1), 129-145.
- Resurreccion A.V.A., (2003).** *Sensory Aspects of Consumer Choices for Meat and Meat Products*, Meat Science, 66, (1), 11-20.
- Riovanto R., De Marchi M., Cassandro M., Penasa M., (2012).** *Use of Near Infrared Transmittance Spectroscopy to Predict Fatty Acid Composition of Chicken Meat*, Food Chemistry, 134, (4), 2459-2464.
- Robins S.P., (1983).** *Cross-Linking of Collagen. Isolation, Structural Characterization and Glycosylation of Pyridinoline*, Biochemical Journal, 215, (1), 167-173.
- Robins S.P., Duncan A., Wilson N., Evans B.J., (1996).** *Standardization of Pyridinium Crosslinks, Pyridinoline and Deoxyypyridinoline, for use as Biochemical Markers of Collagen Degradation*, Clinical Chemistry, 42, (10), 1621-1626.
- Robinson D.S., (1952).** *Changes in the Protein Composition of Chick Muscle during Development*, Biochemical Journal, 52, (4), 621-628.
- Rochdi A., Foucat L.c., Renou J.-P., (2000).** *NMR and DSC Studies during Thermal Denaturation of Collagen*, Food Chemistry, 69, (3), 295-299.
- Rodger G.W., Wilding P., (1990).** *Muscle Proteins*, in *Food Gels*, Elsevier Science Publishing CO., INC., New Your, NY (USA), 361-400.
- Rudolph N., Esser H., Carminati A., Moradi A., Hilger A., Kardjilov N., Nagl S., Oswald S., (2012).** *Dynamic Oxygen Mapping in the Root Zone by Fluorescence Dye Imaging combined with Neutron Radiography*, Journal of Soils and Sediments, 12, (1), 63-74.
- Samma S., Kagebayashi Y., Yasukawa M., Fukui Y., Ozono S., Hirao Y., Sato H., Okajima E., (1997).** *Sequential Changes of Urinary Pyridinoline and Deoxyypyridinoline as Markers of Metastatic Bone Tumor in Patients With Prostate Cancer: a Preliminary Study*, Japanese Journal of Clinical Oncology, 27, (1), 26-30.

- San Biagio P.L., Vitrano E., Cupane A., Madonia F., alma M.U., (1977).** *Temperature Induced Difference Spectra of Oxy and Deoxy Hemoglobin in the Near IR, Visible and Soret Regions*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 77, (4), 1158-1165.
- Savitzky A., Golay M.J.E., (1964).** *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*, Analytical Chemistry, 36, (8), 1627-1639.
- Sen A.R., Naveena B.M., Muthukumar M., Vaithiyanathan S., (2011).** *Colour, Myoglobin Denaturation and Storage Stability of Raw and Cooked Mutton Chops at Different end Point Cooking Temperature*, Journal of Food Science and Technology, 51, (5), 970-975.
- Sfareni R., Boffi A., Quaresima V., Ferrari M., (1997).** *Near Infrared Absorption Spectra of Human Deoxy- and Oxy- Haemoglobin in the Temperature Range 20–40°C*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1340, (2), 165-169.
- Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M., (1997).** *Tenderness Classification of Beef: I. Evaluation of Beef Longissimus Shear Force at 1 or 2 Days Postmortem as a Predictor of Aged Beef Tenderness*, Journal of Animal Science, 75, (9), 2417-2422.
- Shiga T., Fukumori K., Hirose Y., Okada A., Kurauchi T., (1994).** *Pulsed NMR study of the structure of poly(vinyl alcohol)-poly(sodium acrylate) composite hydrogel*, Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 32, (1), 85-90.
- Shoulders M.D., Raines R.T., (2009).** *Collagen Structure and Stability*, Annual Review of Biochemistry, 78, (1), 929-958.
- Siesler H.W., (2007).** Introduction, in *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 1-10.
- Stefansson G., Hultin H.O., (1994).** *On the Solubility of Cod Muscle Proteins in Water*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, (12), 2656-2664.
- Stejskal E.O., Tanner J.E., (1965).** *Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient*, The Journal of Chemical Physics, 42, (1), 288-292.
- Su L., Fonseca M.B., Arya S., Kudo H., Goldin R., Hanna G.B., Elson D.S., (2014).** *Laser-Induced Tissue Fluorescence in Radiofrequency Tissue-Fusion Characterization*, Journal of Biomedical Optics, 19, (1), 015007-015007.
- Suchy P., Jelinek P., Strakova E., Hucl J., (2002).** *Chemical Composition of Muscles of Hybrid Broiler Chickens during Prolonged Feeding*, Czech Journal of Animal Science, 47, (12), 511-518.
- Swatland H.J., (1991).** *Evaluation of Probe Designs to Measure Connective Tissue Fluorescence in Carcasses*, Journal of Animal Science, 69, (5), 1983-1988.
- Swatland H.J., Warkup C., Cuthbertson A., (1993).** *Testing a UV Fluorescence Probe for Beef Carcass Connective Tissues*, Computers and Electronics in Agriculture, 9, (3), 255-267.
- Swatland H.J., Gullett E., Hore T., Bottenham S., (1995a).** *UV Fiber-Optic Probe Measurements of Connective Tissue in Beef Correlated with Taste Panel Scores for Chewiness*, Food Research International, 28, (1), 23-30.
- Swatland H.J., Nielsen T., Andersen J.R., (1995b).** *Correlations of Mature Beef Palatability with Optical Probing of Raw Meat*, Food Research International, 28, (4), 403-416.
- Swatland H.J., (2000).** *Connective and Adipose Tissue Detection by Simultaneous Fluorescence and Reflectance Measurements with an On-Line Meat Probe*, Food Research International, 33, (9), 749-757.
- Szczesniak A.S., (2002).** *Texture is a Sensory Property*, Food Quality and Preference, 13, (4), 215-225.

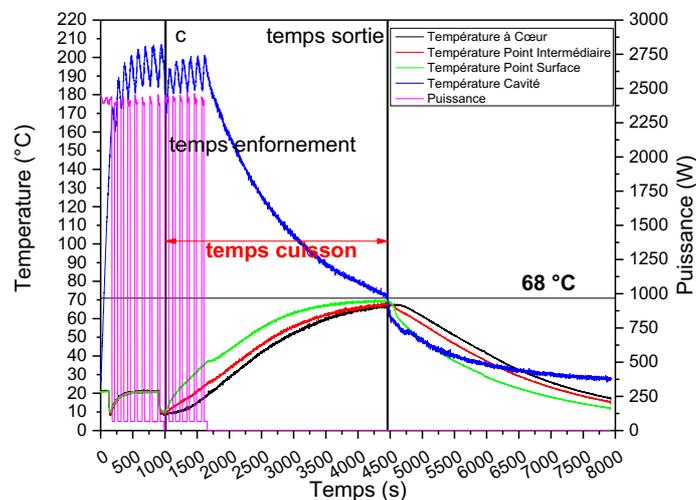
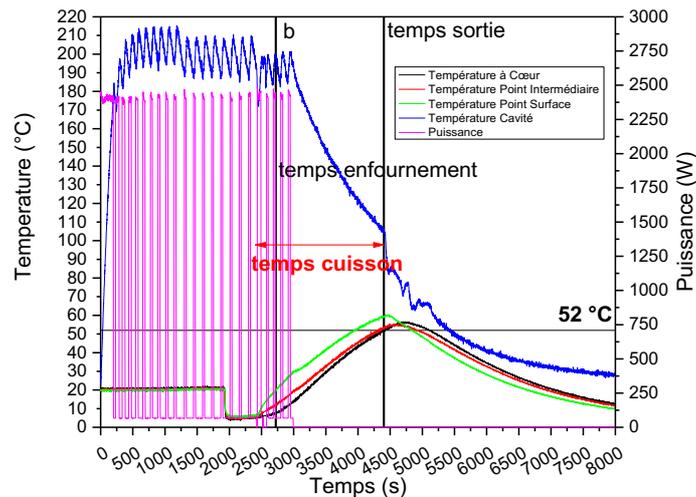
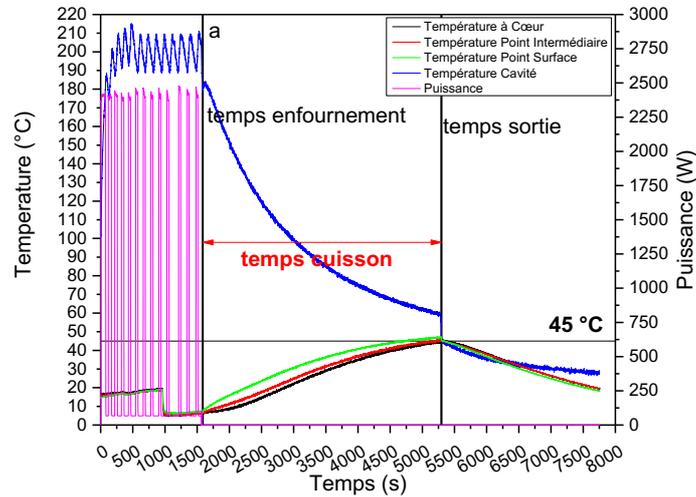
- Tanford C., (1968).** Protein Denaturation: Part A. Characterisation of Denatured State, in *Advances in Protein Chemistry*, Volume 23, Academic Press, 121-217.
- Tanoi K., Hamada Y., Seyama S., Saito T., Iikura H., Nakanishi T.M., (2009).** *Dehydration Process of Fish Analyzed by Neutron Beam Imaging*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 605, (1–2), 179-184.
- Taylor Z.D., Singh R.S., Bennett D.B., Tewari P., Kealey C.P., Bajwa N., Culjat M.O., Stojadinovic A., Lee H., Hubschman J., Brown E.R., Grundfest W.S., (2011).** *THz Medical Imaging: in Vivo Hydration Sensing*, Terahertz Science and Technology, IEEE Transactions on, 1, (1), 201-219.
- Teale F.W.J., Weber G., (1957).** *Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids*, Biochemical Journal, 65, (3), 476-482.
- Teale F.W.J., (1960).** *The Ultraviolet Fluorescence of Proteins in Neutral Solution*, Biochemical Journal, 76, (2), 381-388.
- TenEyck L.F., Arnone A., (1976).** *Three-Dimensional Fourier Synthesis of Human Deoxyhemoglobin at 2.5 Å Resolution*, Journal of Molecular Biology, 100, (1), 3-11.
- Thorarinsdottir K.A., Arason S., Geirsdottir M., Bogason S.G., Kristbergsson K., (2002).** *Changes in Myofibrillar Proteins during Processing of Salted Cod (Gadus morhua) as Determined by Electrophoresis and Differential Scanning Calorimetry*, Food Chemistry, 77, (3), 377-385.
- Tornberg E., (1996).** *Biophysical Aspects of Meat Tenderness*, Meat Science, 43, Supplement 1, (0), 175-191.
- Tougan P.U., Dahouda M., Salifou C.F.A., Ahounou Ahounou S.G., Kpodekon M.T., Mensah G.A., Thewis A., Abdou Karim I.Y., (2013).** *Conversion of Chicken Muscle to Meat and Factors Affecting Chicken Meat Quality: a Review*, International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 3, (8), 1-20.
- Toussaint C., Fauconneau B., Médale F., Collewet G., Akoka S., Haffray P., Davenel A., (2005).** *Description of the Heterogeneity of Lipid Distribution in the Flesh of Brown Trout (Salmo trutta) by MR Imaging*, Aquaculture, 243, (1–4), 255-267.
- Varley P.G., (1994).** Fluorescence Spectroscopy, in *Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques*, 22, Humana Press, 203-218.
- Vega-Warner V., Merkel R.A., Smith D.M., (1999).** *Composition, Solubility and Gel Properties of Salt Soluble Proteins from Two Bovine Muscle Types*, Meat Science, 51, (3), 197-203.
- Veland J.O., Torrissen O.J., (1999).** *The Texture of Atlantic Salmon (Salmo salar) Muscle as Measured Instrumentally using TPA and Warner–Brazler Shear Test*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, (12), 1737-1746.
- Veliyulin E., Egelanddal B., Marica F., Balcom B.J., (2009).** *Quantitative ²³Na Magnetic Resonance Imaging of Model Foods*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, (10), 4091-4095.
- Venkatesh Rao S., Manoharan P.T., (2004).** *Conformational Changes Monitored by Fluorescence Study on Reconstituted Hemoglobins*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 60, (11), 2523-2526.
- Vestergaard C., Risum J., Adler-Nissen J., (2005).** *²³Na-MRI Quantification of Sodium and Water Mobility in Pork during Brine Curing*, Meat Science, 69, (4), 663-672.
- Walker M., Trinick J., (1986).** *Electron Microscope Study of the Effect of Temperature on the Length of the Tail of the Myosin Molecule*, Journal of Molecular Biology, 192, (3), 661-667.
- Walzthöny D., Eppenberger H.M., Ueno H., Harrington W.F., Wallimann T., (1986).** *Melting of Myosin Rod as Revealed by Electron Microscopy. II. Effects of Temperature and pH on Length and Stability of Myosin Rod and its Fragments*, European Journal of Cell Biology, 41, (1), 38-43.

- Wang S.F., Smith D.M., (1994).** *Dynamic Rheological Properties and Secondary Structure of Chicken Breast Myosin As Influenced by Isothermal Heating*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, (7), 1434-1439.
- Ward K.B., Wishner B.C., Lattman E.E., Love W.E., (1975).** *Structure of Deoxyhemoglobin a Crystals Grown from Polyethylene Glycol Solutions*, Journal of Molecular Biology, 98, (1), 161-177.
- Warner K.F., (1929).** *Progress Report of the Mechanical Test for Tenderness of Meat*, Journal of Animal Science, 1929, (1), 114-116.
- Wattanachant S., Benjakul S., Ledward D.A., (2004).** *Composition, Color, and Texture of Thai Indigenous and Broiler Chicken Muscles*, Poultry Science, 83, (1), 123-128.
- Weeds A.G., Lowey S., (1971).** *Substructure of the Myosin Molecule: II. The Light Chains of Myosin*, Journal of Molecular Biology, 61, (3), 701-725.
- Werber M.M., Szent-Gyorgyi A.G., Fasman G.D., (1972).** *Fluorescence Studies on Heavy Meromyosin-Substrate Interaction*, Biochemistry, 11, (15), 2872-2883.
- Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., (1999).** *Tenderness Classification of Beef: III. Effect of the Interaction between End Point Temperature and Tenderness on Warner-Bratzler Shear Force of Beef Longissimus*, Journal of Animal Science, 77, (2), 400-407.
- Winkelmann D.A., Baker T.S., Rayment I., (1991).** *Three-Dimensional Structure of Myosin Subfragment-1 from Electron Microscopy of Sectioned Crystals*, The Journal of Cell Biology, 114, (4), 701-713.
- Wright D.J., Leach I.B., Wilding P., (1977).** *Differential Scanning Calorimetric Studies of Muscle and its Constituent Proteins*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 28, (6), 557-564.
- Wright D.J., Wilding P., (1984).** *Differential Scanning Calorimetric Study of Muscle and its Proteins: Myosin and its Subfragments*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 35, (3), 357-372.
- Wu Z., Bertram H.C., Kohler A., Böcker U., Ofstad R., Andersen H.J., (2006).** *Influence of Aging and Salting on Protein Secondary Structures and Water Distribution in Uncooked and Cooked Pork. A Combined FT-IR Microspectroscopy and ¹H NMR Relaxometry Study*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, (22), 8589-8597.
- Wu Z., Bertram H.C., Böcker U., Ofstad R., Kohler A., (2007).** *Myowater Dynamics and Protein Secondary Structural Changes as Affected by Heating Rate in Three Pork Qualities: a Combined FT-IR Microspectroscopic and ¹H NMR Relaxometry Study*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, (10), 3990-3997.
- Yan Y.-B., Wang Q., He H.-W., Zhou H.-M., (2004).** *Protein Thermal Aggregation Involves Distinct Regions: Sequential Events in the Heat-Induced Unfolding and Aggregation of Hemoglobin*, Biophysical Journal, 86, (3), 1682-1690.
- Yancey J.W.S., Wharton M.D., Apple J.K., (2011).** *Cookery Method and End-Point Temperature can Affect the Warner-Bratzler Shear Force, Cooking Loss, and Internal Cooked Color of Beef Longissimus Steaks*, Meat Science, 88, (1), 1-7.
- Yengo C.M., Fagnant P.M., Chrin L., Rovner A.S., Berger C.L., (1998).** *Smooth Muscle Myosin Mutants Containing a Single Tryptophan Reveal Molecular Interactions at the Actin-Binding Interface*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 95, (22), 12944-12949.
- Zijlstra W.G., Buursma A., (1997).** *Spectrophotometry of Hemoglobin: Absorption Spectra of Bovine Oxyhemoglobin, Deoxyhemoglobin, Carboxyhemoglobin, and Methemoglobin*, Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 118, (4), 743-749.

Annexes

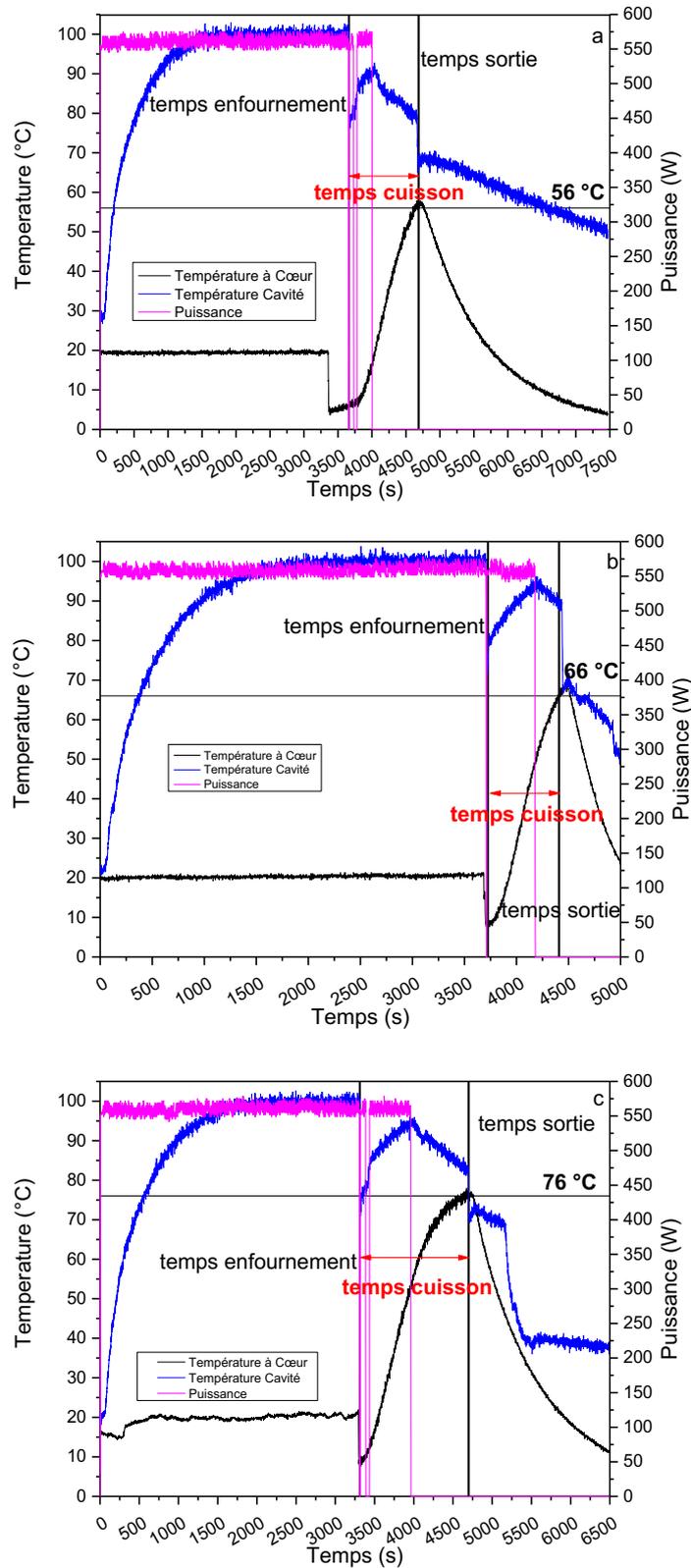
Annexe 1

Profils de température de la cavité (bleu) et de l'échantillon rond parisien mesurés avec la sonde trois points à cœur et deux points intermédiaires (noir, rouge et vert) et profil de puissance (magenta) enregistrés pour les barèmes de cuisson : a) sous cuit, b) bien cuit, c) trop cuit.



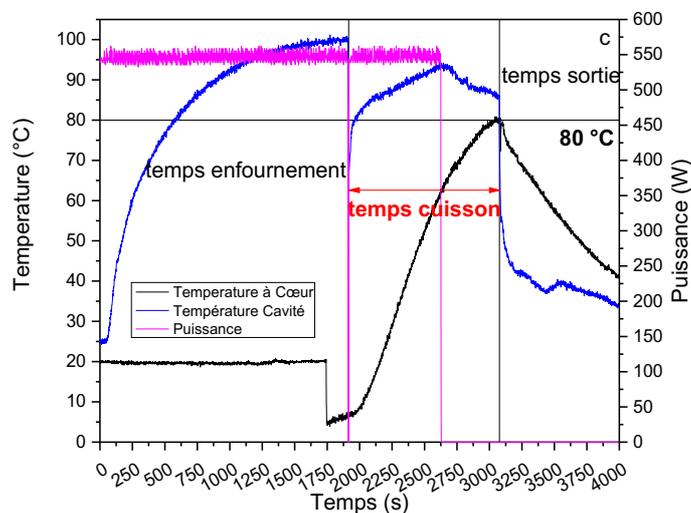
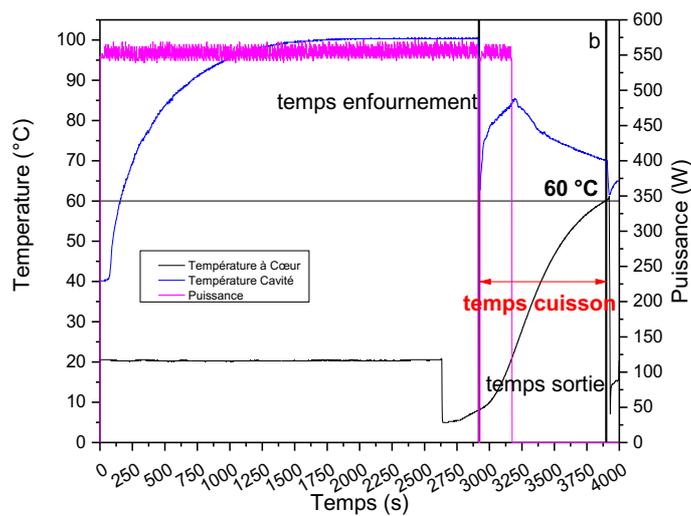
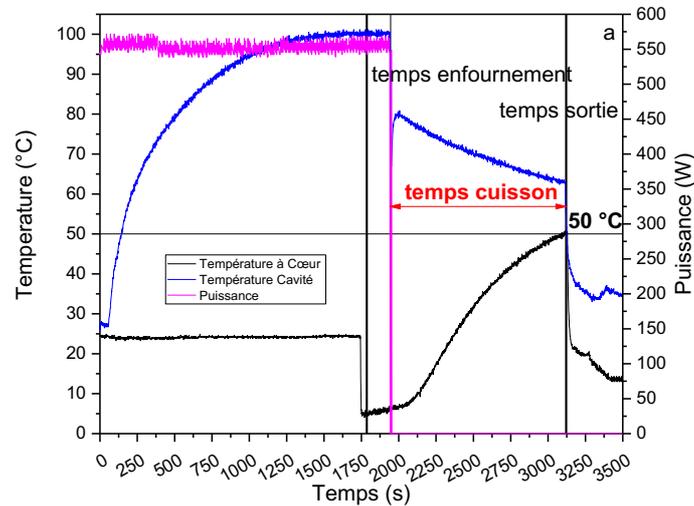
Annexe 2

Profils de températures de la cavité (bleu) et de l'échantillon blanc de poulet mesurés avec la sonde un point à cœur (noir) et profil de la puissance enregistré pour les trois barèmes de cuisson : a) sous cuit, b) bien cuit et c) trop cuit.



Annexe 3

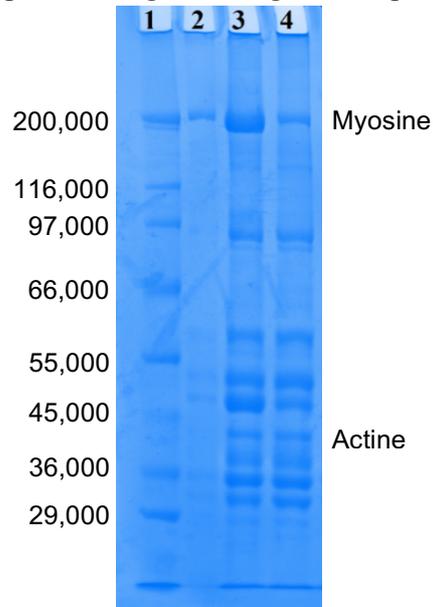
Profils de températures de la cavité (bleu) et de l'échantillon dos de cabillaud mesurés avec la sonde un point à cœur (noir) et profil de la puissance enregistré pour les trois barèmes de cuisson : a) sous cuit, b) bien cuit et c) trop cuit.



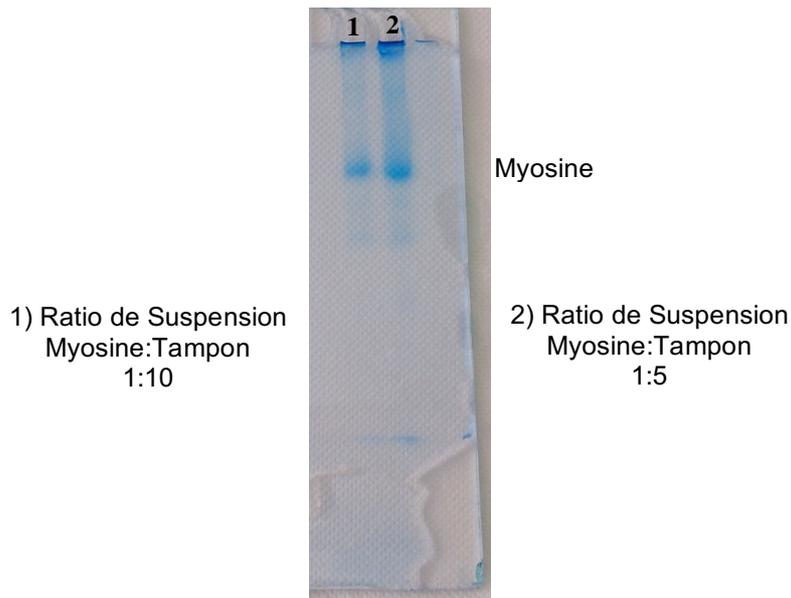
Annexe 4

Gels d'électrophorèse obtenus pendant les différentes phases de purification de la myosine

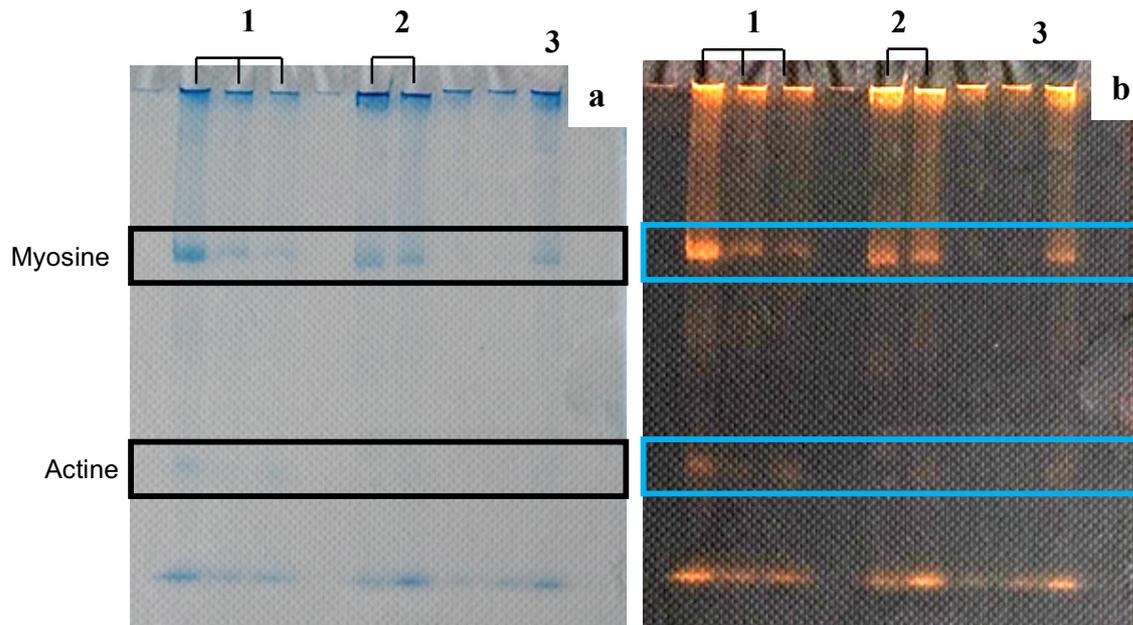
Image d'un gel d'électrophorèse de suspensions de muscle de poulet, dans le tampon d'extraction (phase 1 du protocole) en fonction du temps de suspension : 2) pendant 1h ; 3) pendant 3h ; 4) pendant 5 h. La première ligne de migration représente le marqueur moléculaire.



Gel d'électrophorèse d'échantillons de myosine resuspendus dans le tampon de suspension en rapport 1) 1:10 et 2) 1:5 (phase 2 du protocole, avant la dialyse).

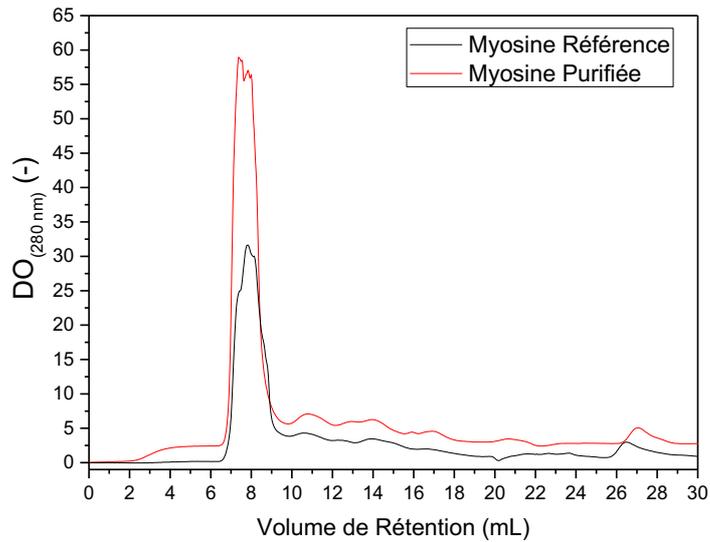


Gel d'électrophorèse d'échantillons de myosine obtenus de façon différente (phase 2 du protocole, après la dialyse) : le groupe 1 de lignes, échantillon de myosine obtenu en utilisant un vieux tampon d'extraction, dans lequel l'ATP s'est désactivée ; le groupe 2 de lignes, échantillon de myosine obtenu par extraction en utilisant un tampon frais, où l'ATP est active et agit en détachant la myosine de l'actine ; donc, la bande de l'actine est moins intense ; la ligne 3, échantillon de myosine après la dialyse où la bande de l'actine n'est plus présente. L'image (a) est l'image originale du gel d'électrophorèse ; l'image (b) est l'image retravaillée où les couleurs ont été renversées et le contraste et la luminosité ont été ajustés, pour mettre mieux en évidence la bande de l'actine.



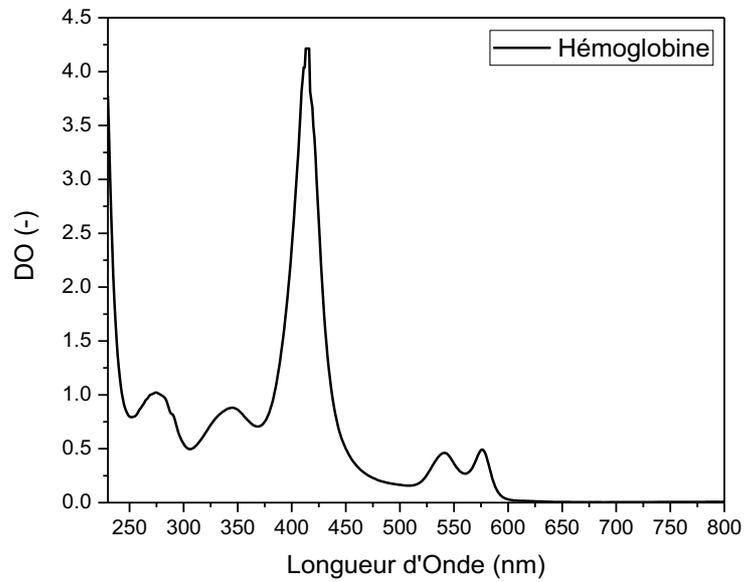
Annexe 5

Chromatogrammes obtenus par chromatographie liquide à exclusion de taille des échantillons de myosine de référence (acheté chez Sigma-Aldrich, courbe noire) et d'échantillons de myosine purifiée (courbe rouge) et utilisés pour vérifier la concentration et la pureté de la myosine purifiée.



Annexe 6

Spectre UV-VIS de l'hémoglobine de porc utilisé pour évaluer la concentration d'hémoglobine ($\epsilon_{576\text{nm}} = 15150 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et son état d'oxydation en faisant le rapport d'intensité entre le pic à 576 nm et le pic à 541 nm.



Annexe 7

Dans l'annexe suivante, les tableaux des ajustements des expériences de RMN-bas champ sont présentés.

Tableaux des ajustements exponentiels des expériences de CPMG montrant le nom de la fonction utilisée, l'équation ainsi que les paramètres de l'ajustement χ^2 et R^2 .

Modélisation avec une exponentielle décroissante (figure 45)

Paramètre	Valeur
Modèle	ExpDec1
Équation	$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}}$
χ^2 réduit	$3,202889 \times 10^{-4}$
R^2 ajusté	0,97706

Modélisation avec deux exponentielles décroissantes (figure 46)

Paramètre	Valeur
Modèle	ExpDec2
Équation	$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{x}{t_2}}$
χ^2 réduit	$4,49456 \times 10^{-6}$
R^2 ajusté	0,99968

Modélisation avec trois exponentielles décroissantes (figure 47)

Paramètre	Valeur
Modèle	ExpDec3
Équation	$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{x}{t_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{x}{t_2}} + A_3 \cdot e^{-\frac{x}{t_3}}$
χ^2 réduit	$6,74671 \times 10^{-7}$
R^2 ajusté	0,99995

Tableaux des ajustements exponentiels des expériences de l'écho de Hahn et de l'écho de Solide montrant le nom de la fonction utilisée, l'équation, les paramètres de l'ajustement χ^2 et R^2 , ainsi que les paramètres de la courbe estimés

Modélisation avec l'équation de Weibull (figure 50 et figure 51).

Paramètre		Valeur	
Modèle		Weibull_1 (User)	
Équation		$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\left(\frac{x}{t_1}\right)^{b_1}}$	
χ^2 réduit		0,7886	
R^2 ajusté		0,99979	
		Valeur	Erreur Standard
Magnitude	y_0	-2,88262	0,18655
	A_1	78,03167	0,20115
	t_1	0,723	0,0015
	b	1,98709	0,00382

Modélisation avec l'équation de Gaussienne (figure 51).

Paramètre		Valeur	
Modèle		GaussAmp2_1 (User)	
Équation		$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\left(\frac{(x-xc_1)^2}{2 \cdot w_1^2}\right)}$	
χ^2 réduit		0,07926	
R^2 ajusté		0,99979	
		Valeur	Erreur Standard
Magnitude	y_0	-2,32758	0,07588
	A_1	77,41356	0,06967
	xc_1	0	0
	w_1	0,50813	4,57236 x 10 ⁻⁴

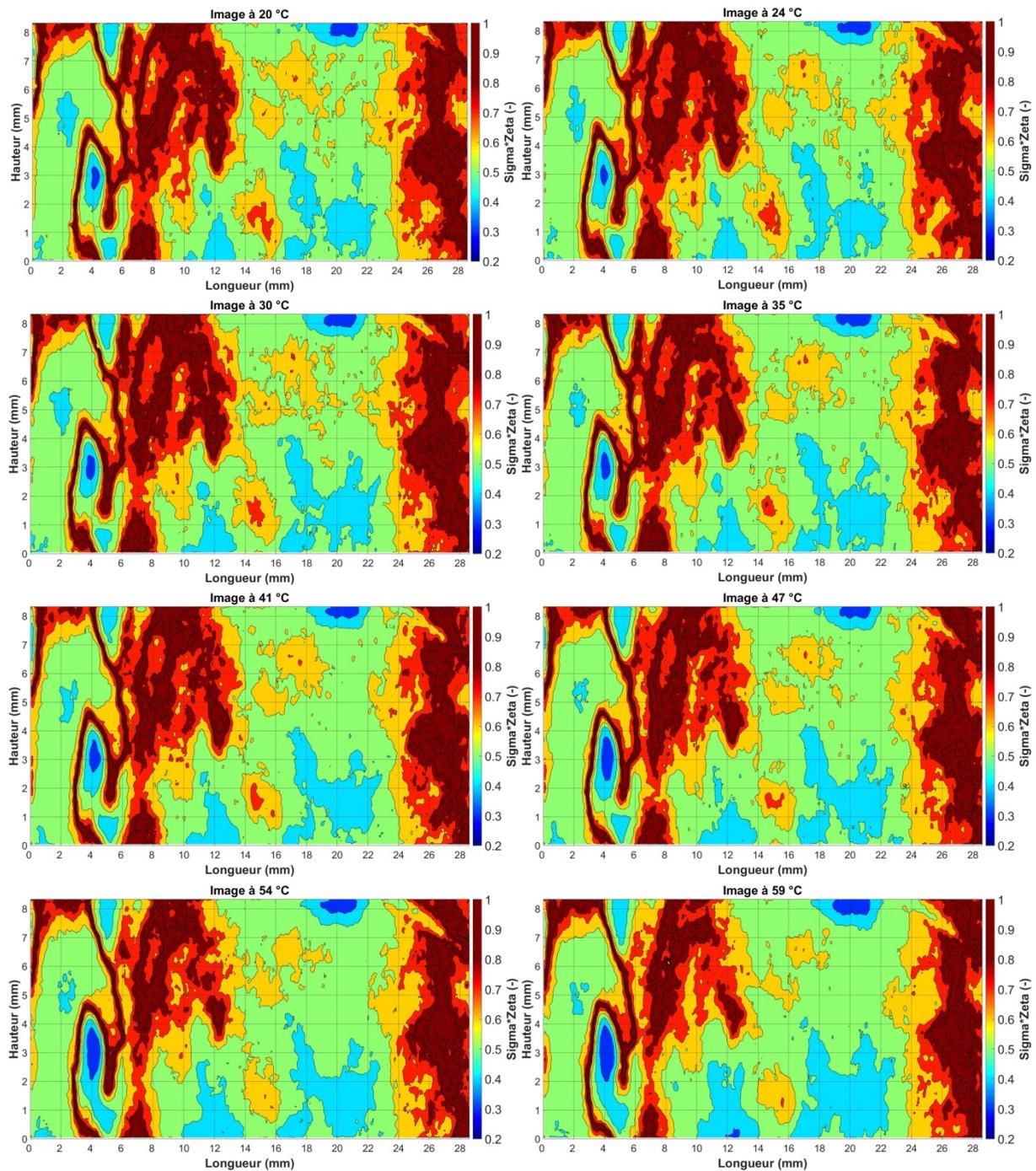
Modélisation avec l'équation de Gaussienne (figure 53).

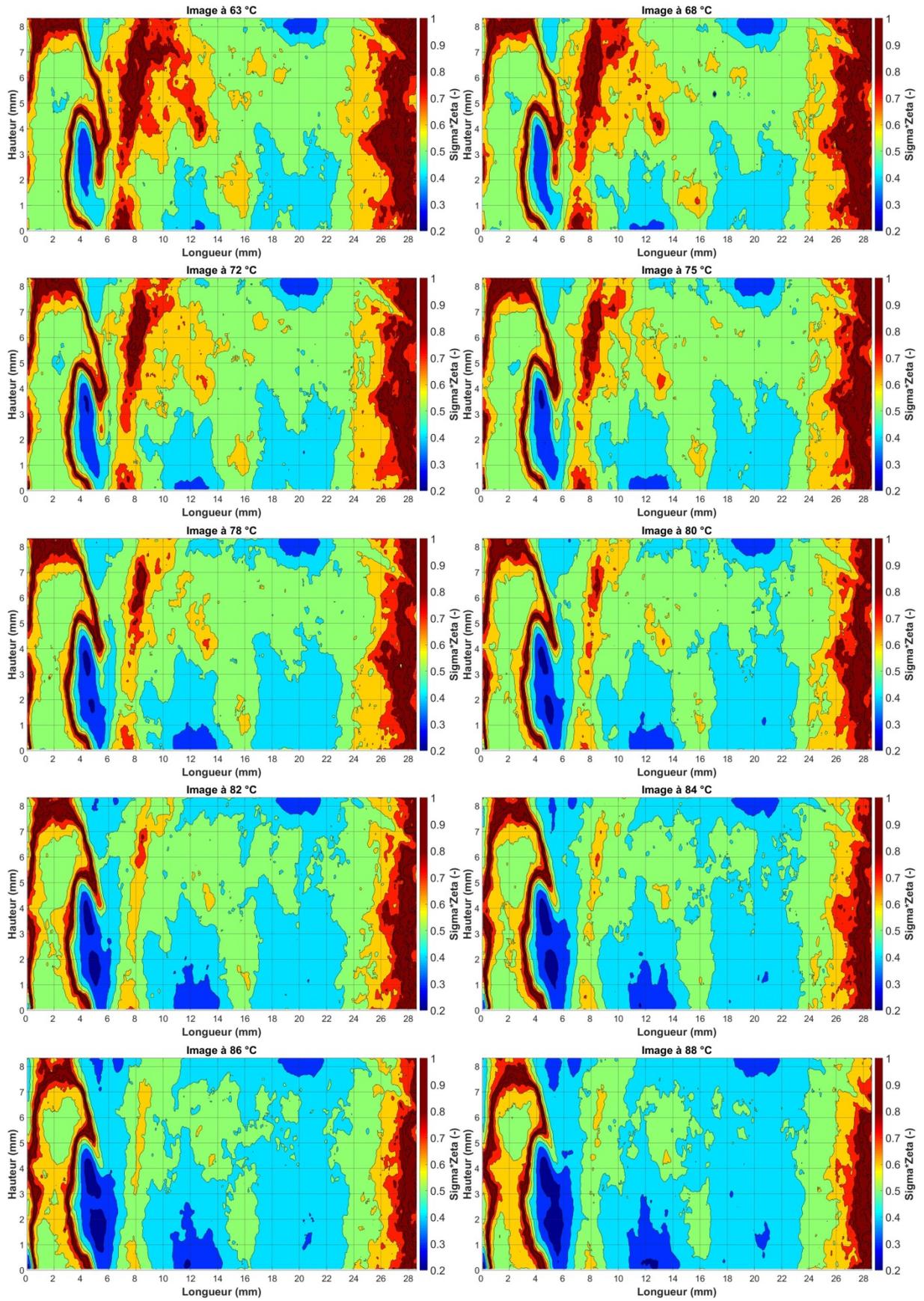
Paramètre		Valeur	
Modèle		GaussAmp2_1 (User)	
Équation		$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\left(\frac{(x-xc_1)^2}{2 \cdot w_1^2}\right)}$	
χ^2 réduit		0,06937	
R^2 (COD)		0,96	
R^2 ajusté		0,9597	
		Valeur	Erreur Standard
Magnitude	y_0	0,10249	0,01671
	A_1	4,13198	0,07171
	xc_1	0,01117	0,00112
	w_1	0,02109	7,46099E-4

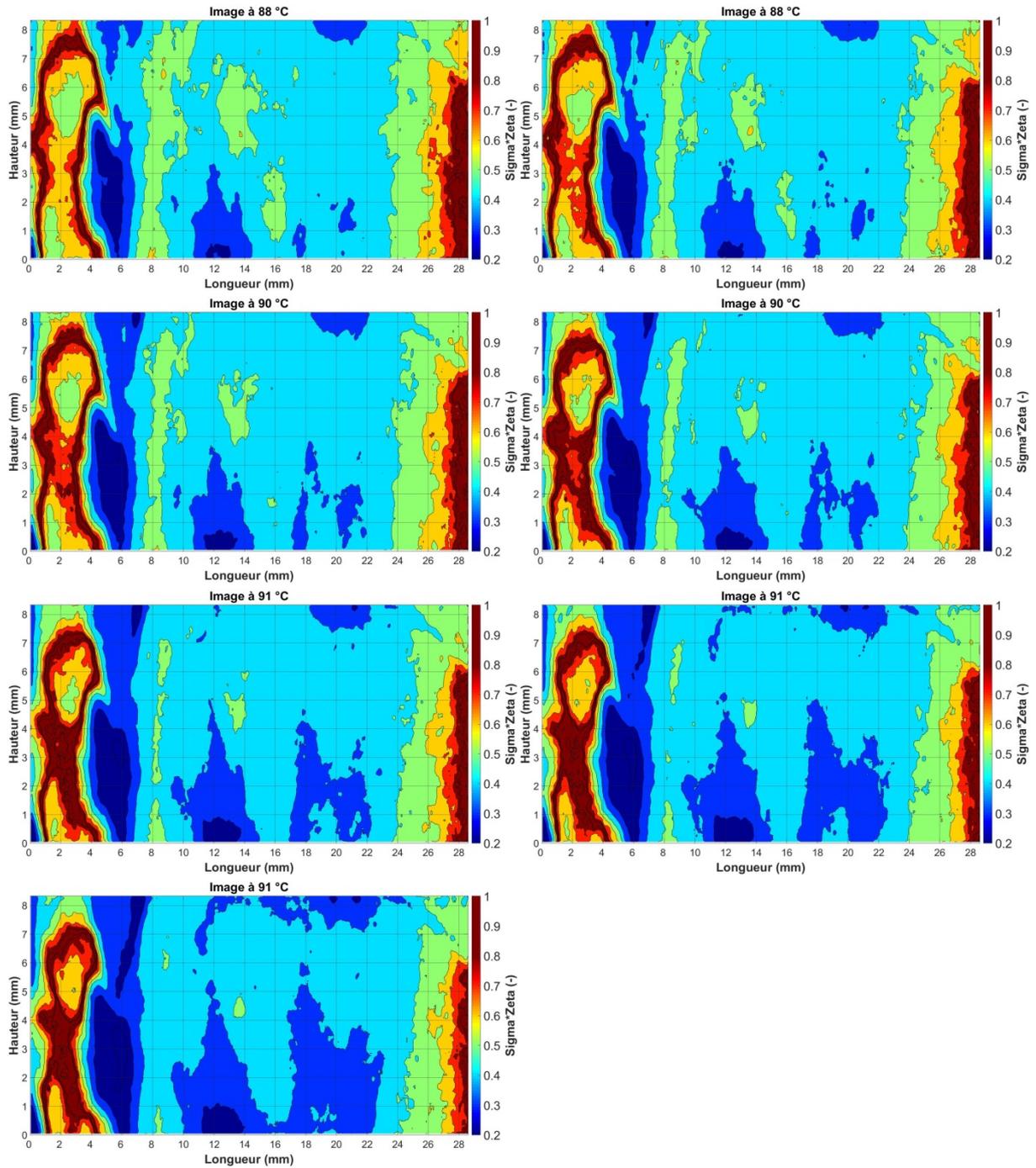
Annexe 8

Série de cartographies de 2D de la petite région de l'échantillon sélectionnée dans la zone ouverte du porte échantillon, la même explorée par spectroscopie. Les cartographies présentent l'évolution de l'atténuation de neutrons en fonction de la température pour l'échantillon : Bœuf

1

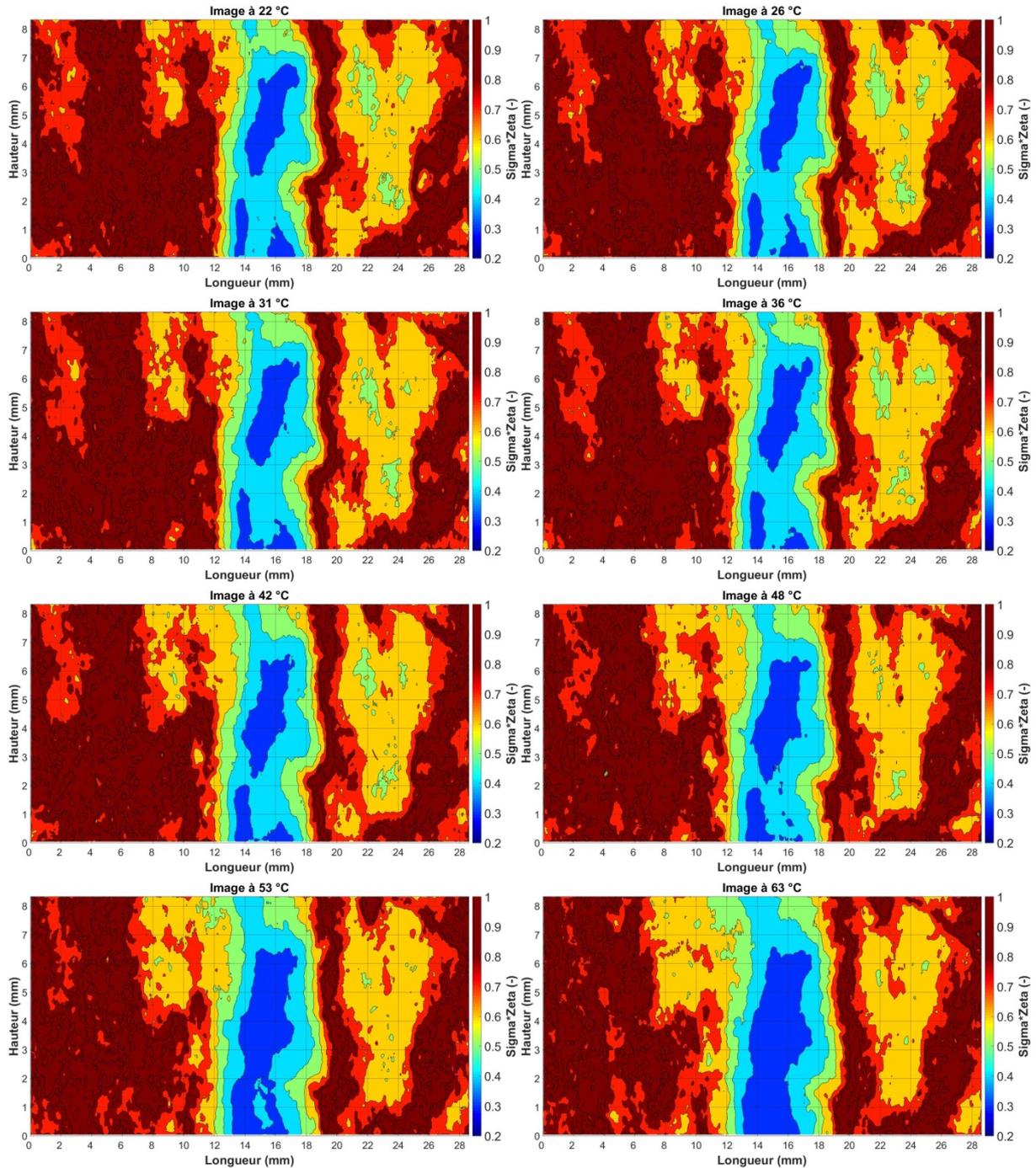


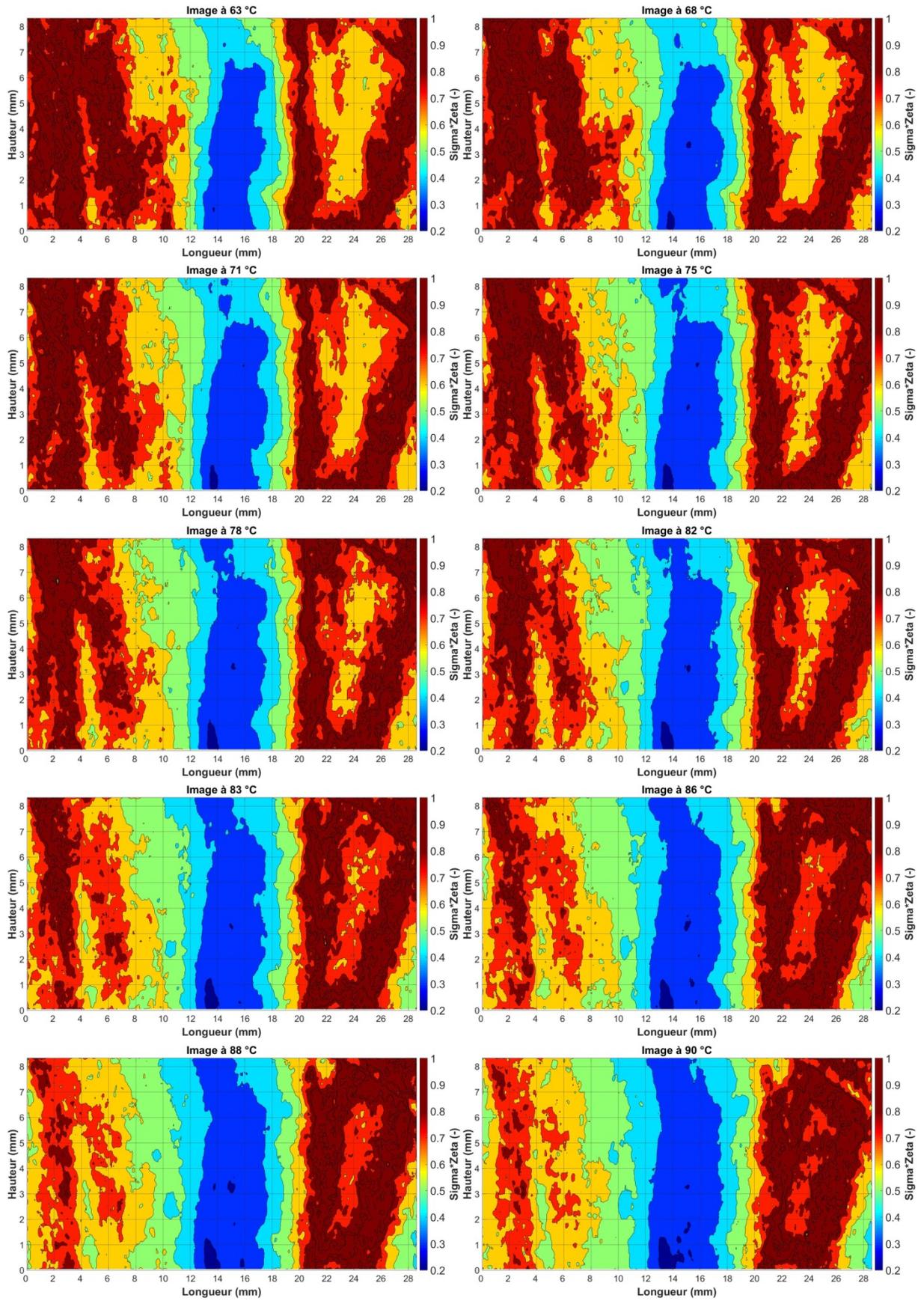


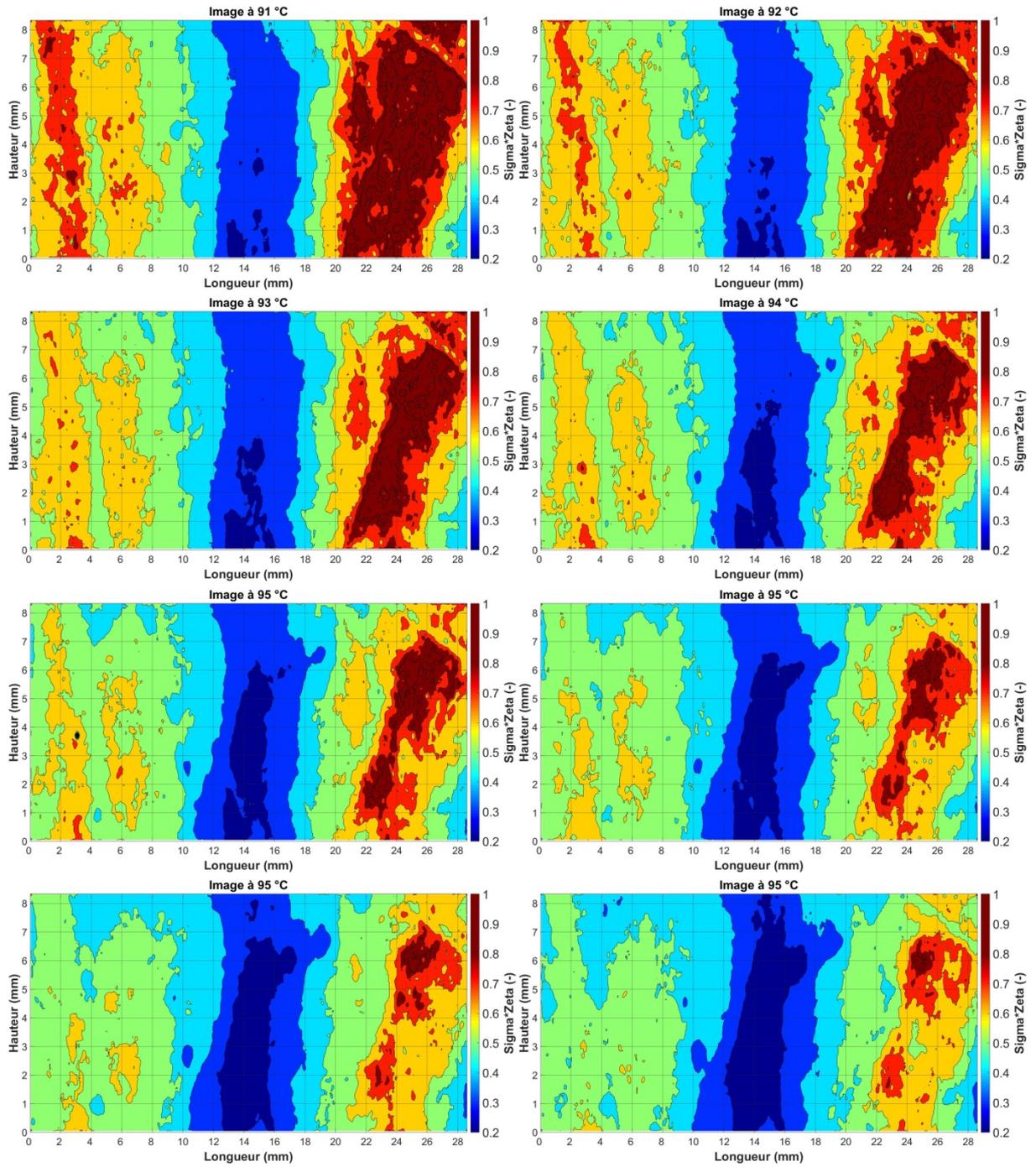


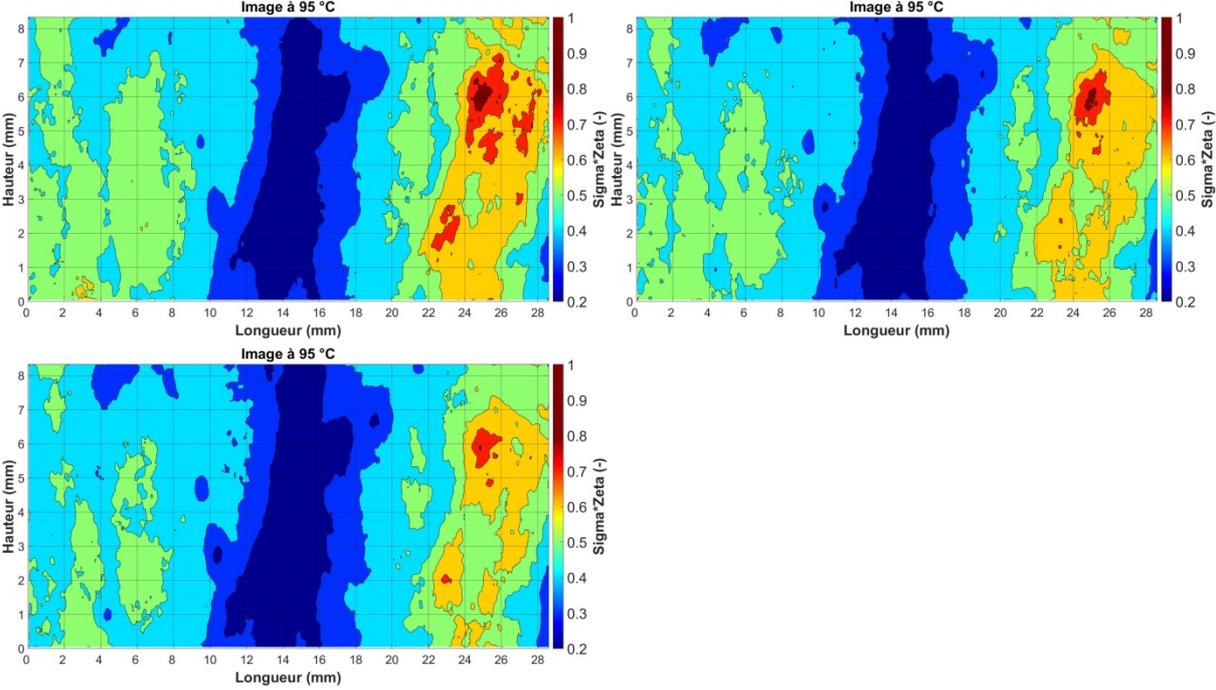
Annexe 9

Série de cartographies de 2D de la petite région de l'échantillon sélectionnée dans la zone ouverte du porte échantillon, la même explorée par spectroscopie. Les cartographies présentent l'évolution de l'atténuation de neutrons en fonction de la température pour l'échantillon : Bœuf 2



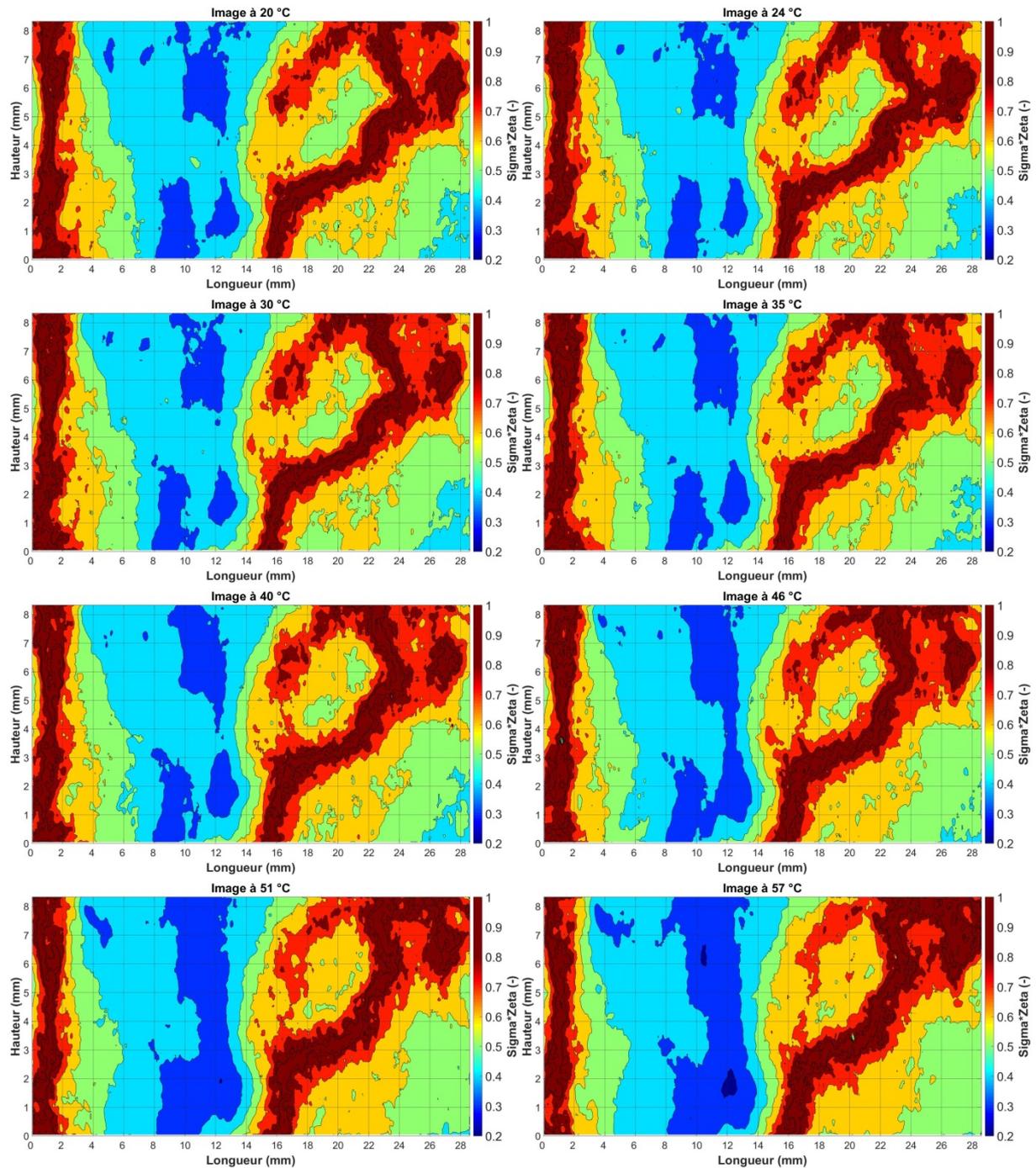


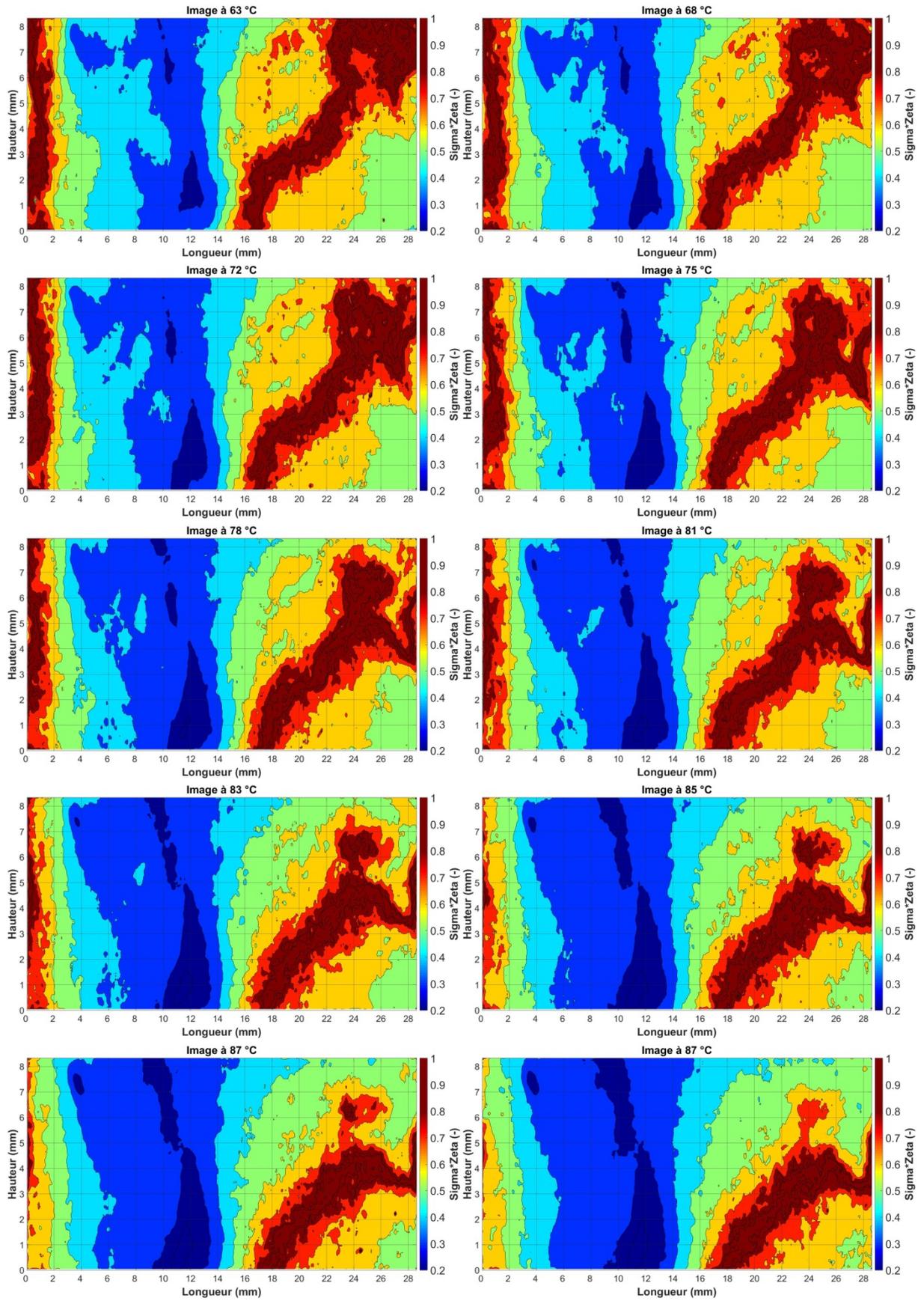


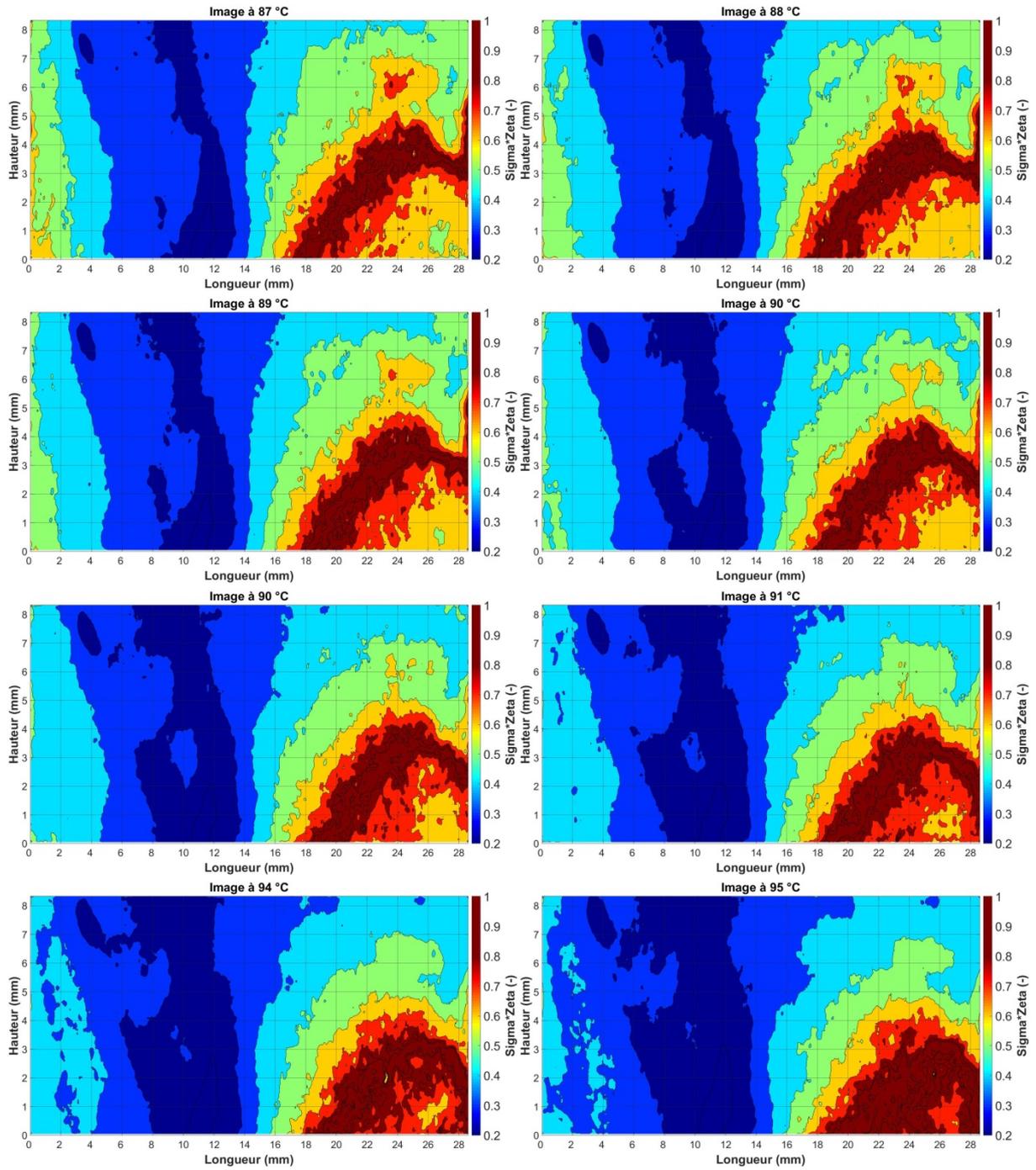


Annexe 10

Série de cartographies de 2D de la petite région de l'échantillon sélectionnée dans la zone ouverte du porte échantillon, la même explorée par spectroscopie. Les cartographies présentent l'évolution de l'atténuation de neutrons en fonction de la température pour l'échantillon : Bœuf 3







Résumé

L'un des objectifs du programme de recherche Opticook est d'équiper les fours avec des capteurs spectroscopiques qui permettront de piloter de façon non intrusive la cuisson de viande et de poisson. Le développement de ces capteurs est basé sur l'hypothèse que les protéines de ces aliments sont de bons marqueurs du degré de cuisson. Dans ce contexte, dans un premier temps, plusieurs outils ont été mis en œuvre pour caractériser l'effet de différents barèmes de cuisson sur les propriétés macroscopiques (texture, couleur) d'échantillons de bœuf, de poulet et de dos de cabillaud. Puis, pour étudier les transformations que subissent ces échantillons à l'échelle moléculaire, nous avons utilisé la calorimétrie et différentes spectroscopies. La spectroscopie dans le domaine du visible nous a permis d'observer la dénaturation des hémoprotéines grâce à l'évolution de l'état (oxy- à met-). Ces protéines sont responsables du changement de couleur observé entre 50 et 75 °C. Les spectroscopies dans le moyen infrarouge et de fluorescence ont été utilisées pour suivre les changements de structures associées à la dénaturation des protéines fibrillaires. La myosine, purifiée à partir du blanc de poulet, a été étudiée en fonction de la température par fluorescence. Les résultats nous ont montré que des évolutions de la structure protéique se produisent dès 50 °C. À l'échelle microscopique, nous avons réalisé des expériences sur des échantillons de bœuf par RMN bas champ (séquences d'impulsion et gradient de champ), et par tomographie de neutrons pour rendre compte de la contraction des fibres et de la libération du jus selon le degré de cuisson. L'analyse des images 3D enregistrées par tomographie de neutrons et le traitement des données de RMN montrent des changements importants de la morphologie et de la densité de fibres des échantillons après la cuisson à haute température. Pour associer les deux approches (moléculaire et microscopique) des mesures couplées de spectroscopie et d'imagerie de neutrons ont été menées dans le four Opticook pendant la cuisson de tranches de bœuf. Ce couplage nous a permis de suivre l'évolution de la morphologie due à la contraction des fibres, la migration du jus, ainsi que le changement de couleur associé à la dénaturation des hémoprotéines. Nous en concluons qu'il est en effet possible de suivre le degré de cuisson de viande et de poisson à l'aide de différentes spectroscopies (la fluorescence et le visible) grâce aux signatures spectroscopiques de plusieurs marqueurs internes à ces matrices : la myosine, le collagène et les hémoprotéines.

Abstract

One of the purposes of the Opticook project is to install spectroscopic sensors in ovens, so equipping them with non-intrusive tools allowing following cooking process of meat and fish. The hypothesis on which sensors were developed was: are muscular proteins proper probes to discriminate among several cooking degrees?

Thus, at the beginning of the project several tools were used to characterise effect of several cooking degrees on macroscopic properties (texture and colour) of beef, chicken and cod fillet samples. Following, calorimetry and spectroscopic techniques were used to study transformations at molecular scale. In particular, visible spectroscopy followed denaturation of haemproteins observing their evolution from oxy- to met- state. Colour change was observed between 50 and 75 °C. Middle infrared and fluorescence spectroscopies were used to observe evolution of fibrillar proteins which are associated with meat texture changes. One of myofibrils, myosin, was purified from chicken breast and was studied depending on temperature by fluorescence spectroscopy. Observations showed evolution of protein structure occurred around 50 °C. At microscopic scale, low field NMR (spin echo and gradient field configurations) and neutron tomography were used to observe morphology changes and juice release on beef samples according to cooking degree. 3D image analysis and NMR data showed morphology and fibre density changes at high temperature.

We associated the two approaches (molecular and microscopic) in the last part of the research. So coupled measures were realised by combining neutron imaging and spectroscopy techniques during cooking process on beef slices by Opticook oven. Coupled measures allowed following morphology evolution because of fibre contractions, juice migration and colour modification as well associated to haemprotein denaturation. In conclusion, it is possible to follow cooking process of meat and fish by following several spectroscopic signatures (fluorescence and visible ones) of matrix own probes: myosin, collage and haemproteins.