



**HAL**  
open science

## Localisation et effets de la pepsine dans la viande digérée in vitro

Joanne Holtzer

► **To cite this version:**

Joanne Holtzer. Localisation et effets de la pepsine dans la viande digérée in vitro. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03701691

**HAL Id: hal-03701691**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03701691>**

Submitted on 22 Jun 2022

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

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

## Mémoire de Master 2 Nutrition et Sciences des Aliments

Année universitaire : 2021-2022

Parcours : SA (Sciences des Aliments)

**Localisation et effets de la pepsine dans la viande digérée *in vitro***

Par : **Joanne HOLTZER**

# INRAE

Institut National de Recherche pour l'Agriculture,  
L'Alimentation et l'Environnement  
UR 370 *Qualité des Produits Animaux (QuaPA)*  
63122 ST GENES CHAMPANELLE

***Stage du 10/01/2022 au 08/07/2022***

Soutenu à Nantes le : 24 juin 2022

*Document confidentiel : ~~oui~~ - non*

# Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier **Thierry ASTRUC**, chef d'équipe imagerie et transfert (IT), et encadrant de stage, pour m'avoir donné ma chance dans la réalisation de ce stage. Merci pour sa patience, ses encouragements, son écoute et ses conseils sur le chemin à suivre pour mener à bien ce projet ainsi que ses conseils pour la rédaction de ce rapport. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée me permettant de travailler en quasi totale autonomie. Enfin, je souhaiterais le remercier pour le temps qu'il a su m'accorder, bien que son emploi du temps soit très chargé, il a toujours pu répondre favorablement à mes demandes.

Je tenais également à remercier **Christine RAVEL** et **Annie VENIEN**, respectivement technicienne de laboratoire et ingénieure de recherche, pour m'avoir aidé dans la réalisation des manipulations au laboratoire. Je n'aurais pu avancer sur mon projet sans leur savoir-faire.

De plus, je souhaiterais remercier **Jacques ROUEL**, statisticien de l'équipe, pour le temps qu'il m'a accordé afin que je prenne la main sur les logiciels de traitement de données. J'aimerais remercier **Arno GERMOND** qui m'a aidé dans l'interprétation de certains résultats statistiques et la rédaction de mes résultats.

Je remercie également **Brayan CASTULOVICH** et **Noémie PETIT**, respectivement stagiaire Master 2 et post-doctorante, pour le soutien moral tout au long de ce stage.

Finalement, je voudrais remercier tous membres de IT et de l'unité QuaPA pour leur accueil chaleureux, pour m'avoir rapidement intégrée dans leur équipe et m'avoir montré les aspects (bons et mauvais) au sein de l'institut. Je les remercie également pour leur gentillesse, leur sympathie et l'entraide dont ils ont fait preuve à mon égard. Enfin, je remercie toutes les personnes que j'ai pu croiser tout au long de ce stage et qui, à leur façon, m'ont apporté quelque chose, et plus particulièrement ces collègues et maintenant amis avec qui j'ai partagé du temps pendant et en dehors du travail.

# Abréviations

AAnN : acide aminé non naturel

ACP : analyse en composantes principales

BSA : Albumine de sérum bovin

PC : principal component

CY3 : Sulfo-Cyanine3

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

HES : hématoxyline, éosine, safran

HPP : hautes pressions

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

IR : infra rouge

IRSTEA : Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture

PBS : phosphate-buffered saline

QuaPA : Qualité des Produits Animaux

SSF : simulated salivary fluid

SGF : simulated gastric fluid

TMB : 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Organisation générale du muscle des mammifères.....	5
<b>Figure 2</b> : Courbe représentant les 3 zones de transition (dénaturation protéique) lors de la cuisson d'un morceau de bœuf.....	6
<b>Figure 3</b> : Structure tertiaire du pepsinogène de porc.....	9
<b>Figure 4</b> : Mécanisme de catalyse par les peptidases aspartiques, dont la pepsine.....	10
<b>Figure 5</b> : Protocole de cuisson de blocs de viande dans un bain-marie à 70 °C.....	16
<b>Figure 6</b> : Schéma détaillant les étapes d'un test ELISA indirect.....	20
<b>Figure 7</b> : Zone d'acquisition des spectres sur les coupes.....	23
<b>Figure 8</b> : Graphique des moyennes des absorbances en fonction de la concentration en pepsine et en anticorps primaire.....	24
<b>Figure 9</b> : Immunomarquage de coupes digérées 2h à 37 °C par la pepsine (3 mg/mL).....	25
<b>Figure 10</b> : Digestion enzymatique d'un bloc de viande ( <i>Masseter</i> ) dans une boîte de pétri, 2h à 37 °C.....	26
<b>Figure 11</b> : Coupes transversales crues après digestion (enzymatique ou non) (2h, 37 °C)....	27
<b>Figure 12</b> : Coupes longitudinales crues après digestion enzymatique (2h, 37 °C) et coloration HES.....	28
<b>Figure 13</b> : Coupes transversales crues incubées 2h à 37 °C et colorées au rouge sirius.....	29
<b>Figure 14</b> : Immunomarquage de laminine sur des coupes transversales de viande crue.....	30
<b>Figure 15</b> : Résultats statistiques des acquisitions dans le halo d'une coupe crue longitudinale incubée à 37 °C (2h) digérée par la pepsine (10 mg/mL) ou par le SGF.....	32
<b>Figure 16</b> : coupes de viande cuite à 70 °C et incubée 2h à 37 °C.....	35
<b>Figure 17</b> : immunomarquage de laminine sur des coupes de viande cuite.....	36
<b>Figure 18</b> : Résultats statistiques des acquisitions dans le halo d'une coupe cuite transversale incubée à 37 °C (2h) digérée par la pepsine (10 mg/mL) ou par le SGF.....	38
<b>Figure 19</b> : Spectres obtenus par IR pour la phénylalanine, la soude et l'AAnN.....	40

# Liste des tableaux

<b><u>Tableau I</u></b> : Exemple de digestion <i>in vitro</i> de 5 g de viande.....	17
<b><u>Tableau II</u></b> : Schéma de l'organisation de la plaque microtitre ELISA.....	21
<b><u>Tableau III</u></b> : Nombres d'ondes et changements moléculaires associés en spectroscopie IR .....	33

# Table des matières

I.	Introduction	1
II.	Informations sur le laboratoire	2
A.	L'institut	2
B.	L'Unité QuaPA	3
III.	Etude Bibliographique	4
A.	Composition et structure des muscles	4
B.	Impact des processus technologiques sur la structure de la viande	5
C.	Rappel des mécanismes de digestion et d'absorption	6
D.	La pepsine, une protéase clef dans la digestion des protéines	8
E.	Mode d'action de la pepsine et sa bioaccessibilité dans la viande	10
F.	Techniques d'évaluation de l'activité de la pepsine	12
G.	Objectif du projet de recherche	14
III.	Matériels et méthodes	15
A.	Prélèvement et préparation des échantillons	15
a.	Expérimentation 1 : blocs de viande	15
b.	Expérimentation 2 : coupes de viande	15
B.	Digestion des échantillons	16
a.	Expérimentation 1 : application du protocole INFOGEST	16
b.	Expérimentation 2 : digestion sur coupe	18
C.	Histologie	18
a.	Histochimie (colorations)	18
b.	Immunohistofluorescence : Test ELISA	19
c.	Immunohistofluorescence : Immunomarquage	21
d.	Observation au microscope et acquisitions d'images	22
D.	Microspectroscopie IR	22
E.	Prétraitements des spectres et Analyse statistiques	23
IV.	Résultats et discussion	24
A.	Caractérisation de la diffusion de la pepsine par immunomarquage	24
a.	Test Elisa	24
b.	Immunomarquage de la pepsine	25
B.	Caractérisation de la diffusion de la pepsine dans un bloc de viande	26
C.	Caractérisation de la diffusion de la pepsine sur coupes de viande crue	27
a.	Digestion des fibres musculaires crues	27
b.	Digestion du tissu conjonctif cru	29

c.	Structure moléculaire de la viande crue digérée	31
D.	Caractérisation de la diffusion de la pepsine sur coupe de viande cuite	34
a.	Digestion des fibres musculaires	34
b.	Digestion du tissu conjonctif cuit	35
c.	Structure moléculaire de la viande cuite digérée	36
V.	Conclusion	39
VI.	Perspectives	40
	Bibliographie	41
	Annexe	48



## I. Introduction

La viande est une source de protéines très importante pour l'Homme. Malgré les tendances actuelles visant à diminuer fortement la consommation de protéines animales, les populations ne cesseront jamais de manger de la viande. Il est donc important de comprendre comment la viande est digérée par notre organisme pour optimiser la bioaccessibilité des nutriments qu'elle contient.

Pour cela, nous allons nous intéresser à la pepsine, une enzyme digestive gastrique dont le rôle est de digérer les protéines alimentaires en coupant certaines liaisons peptidiques. L'enzyme, en dégradant la composante protéique de la matrice alimentaire dans l'estomac, libère des peptides et acides aminés qui seront absorbés ultérieurement.

Cependant, les mécanismes d'action de la pepsine et l'impact de la structure de la viande sur la bioaccessibilité de l'enzyme restent mal connus. En effet, les aliments sont de plus en plus transformés, technologiquement (congélation, cuisson...) et ces transformations impactent leur structure ce qui affecte l'accès des enzymes digestives à la matrice alimentaire et par conséquent, leur digestibilité (Astruc, 2014b). Comprendre le mécanisme d'action et la diffusion de la pepsine est un préalable à la conception de nouveaux aliments de qualité nutritionnelle optimale, en particulier pour répondre aux besoins de populations cibles (personnes âgées, personnes convalescentes, personnes souffrant de maladies chroniques). Pour cela, la détection et le suivi de la pepsine dans des aliments modèles ayant préalablement subi une digestion gastrique est indispensable. Des études sur la localisation de l'enzyme (origine porc), dans une matrice alimentaire complexe comme la viande, par immunohistofluorescence n'a pas donné entière satisfaction dans la mesure où le marquage était peu intense (Astruc, 2014b). Des recherches de biomarqueurs témoins de la digestion en spectroscopie infrarouge (IR) ont été menées sur des composés protéiques seuls mais pas encore sur des matrices complexes (Güler et al., 2011; 2016). Ces biomarqueurs permettent de retracer le chemin de la pepsine et d'en déduire sa diffusion.

L'objectif de notre étude est d'établir un protocole permettant de localiser directement l'enzyme par immunomarquage et indirectement en identifiant ses effets sur la matrice alimentaire pour déduire des informations sur sa diffusion. Des méthodes histologiques et spectroscopiques sont mises en œuvre pour avancer sur cet axe de recherche.

## II. Informations sur le laboratoire

### A. L'institut

L'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) résulte de la fusion de l'Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA) et de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) au 1er janvier 2020. Il s'agit du premier organisme de recherche au monde à être spécialisé dans 3 domaines différents, à savoir, l'agriculture, l'alimentation et l'environnement. Cet institut public, dirigé par Philippe Mauguin, est sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ainsi que du ministère de l'Agriculture.

L'INRAE œuvre aujourd'hui à répondre aux nouveaux enjeux sociétaux engendrés notamment par le changement climatique et par l'augmentation et le vieillissement de la population. Les compétences scientifiques et technologiques permettent à l'institut de s'intéresser à des thématiques telles que la sécurité alimentaire et nutritionnelle, la transition des agricultures, la préservation des ressources naturelles, la restauration de la biodiversité, l'anticipation et la gestion des risques, le renforcement de la territorialisation de l'alimentation... Autant de missions et d'orientations à mettre en œuvre pour transformer durablement l'agriculture, l'alimentation et l'environnement tout en continuant à subvenir aux besoins de toute la population. Ces missions sont assurées grâce à l'implication de plus de 450 partenaires sociaux économiques, un budget de plus d'un milliard d'euros par an et la collaboration avec de nombreux partenaires académiques (universités, écoles, organismes de recherches). En effet, une des missions de l'INRAE est aussi la formation à la recherche et par la recherche.

L'INRAE compte à ce jour plus de 12000 employés, dont 2000 doctorants, répartis sur 18 centres de recherches dans toute la France. Il existe 14 départements de recherche qui regroupent les 231 unités de recherches expérimentales et de service pour lesquelles ils allouent les ressources préalablement définies par la direction générale. Parmi ces départements, certains sont centrés sur la génomique animale et végétale. Le département TRANSFORM, auquel est rattachée l'unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA) où j'ai réalisé mon stage, œuvre sur la transformation de matières organiques en aliments et produits biosourcés avec une valorisation des résidus de l'activité humaine.

## B. L'Unité QuaPA

L'unité QuaPA est localisée sur le site de Theix du centre Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes et comprend trente-six permanents et une vingtaine de personnels temporaires incluant du personnel en CDD, des étudiants, doctorants et post-doctorants. L'unité est composée de 3 équipes, BPM (Biochimie et Protéines du Muscle), MASS (Microcontaminants, Arômes et Sciences Séparatives), IT (Imagerie et Transferts) et deux plateformes : AgroRésonance et Protéomique qui agissent en interaction forte pour répondre aux questions scientifiques de l'unité. La problématique de QuaPA porte sur la construction de l'aliment, essentiellement d'origine carnée, et sa déconstruction dans le tube digestif. Un objectif essentiel est de valoriser la qualité exceptionnelle des protéines de viande qui sont riches en acides aminés indispensables.

Les missions scientifiques de QuaPA répondent donc à des enjeux sociétaux dont le but est d'anticiper la transition alimentaire mondiale et réfléchir à un meilleur équilibre entre les différentes sources de protéines qui sont à ce jour en majeure partie d'origine animale et qui sont parfois mal adaptées selon le type de population (séniors, sportifs...). Deux axes de recherche se distinguent pour répondre à ces objectifs : la conception raisonnée d'aliments carnés spécifiques ainsi que l'amélioration de la durabilité des systèmes alimentaires dans un contexte de transition alimentaire mondiale. La conception d'aliments raisonnés demande de tenir compte de leur acceptabilité et de leur devenir après digestion en s'appuyant notamment sur des modèles *in vitro*. Cet axe repose également sur la modélisation *in silico* de ces aliments en utilisant diverses matrices protéiques et donc différents assemblages et structurations. L'amélioration de la durabilité des systèmes alimentaires, quant à elle, est permise grâce aux recherches sur la sécurité chimique des produits, la limitation des pertes au cours des procédés et la valorisation de la biomasse issue des coproduits animaux.

Les objectifs de l'équipe Imagerie et Transferts (IT) s'inscrivent dans ceux de l'unité et visent à maîtriser la qualité des produits à travers les transformations technologiques et à concevoir les aliments du futur. L'équipe dispose de prototypes permettant d'étudier des procédés de transformation innovants (barattage, impression additive d'aliments etc ...) et d'équipements permettant d'analyser la structure de tels produits à différentes échelles et au cours du temps.

### III. Etude Bibliographique

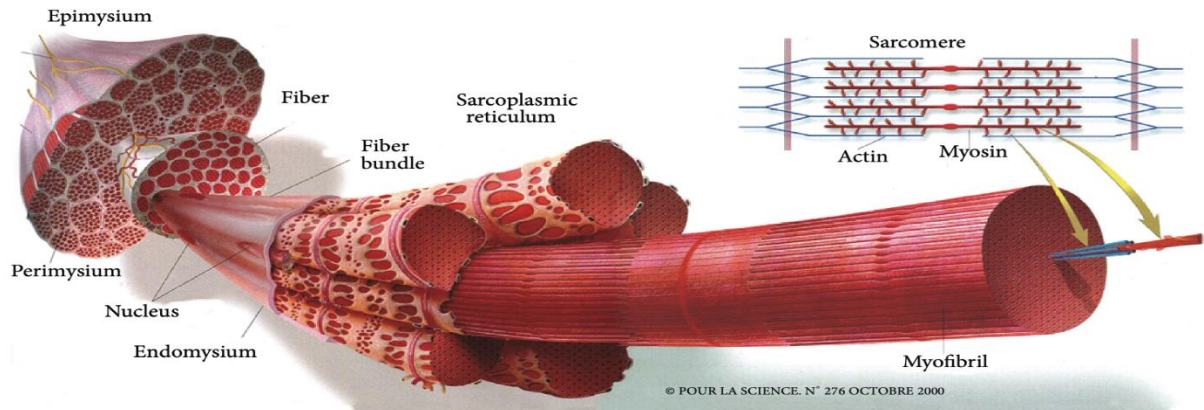
#### A. Composition et structure des muscles

Suivre précisément la pepsine le long du processus de digestion n'est pas une tâche facile. Certaines méthodes ont été mises au point mais, il est d'abord nécessaire de s'intéresser à la structure des aliments que l'enzyme dégrade pour comprendre comment elle diffuse à travers une matrice alimentaire protéique telle que la viande.

La viande est issue du **muscle** squelettique qui est composé d'environ 75% d'eau, 20% de protéines, 1-10% de lipides et 1% de glycogène (Tornberg, 2005; Listrat et al., 2016). Elle constitue donc une grande source de protéines. Le muscle est composé de fibres musculaires de forme allongée, de 30 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre, regroupées en faisceaux et pouvant atteindre plusieurs centimètres de longueur. Les fibres musculaires, les faisceaux de fibres et le muscle sont enveloppés de gaines de tissu conjonctif appelées respectivement l'endomysium, le périmysium et l'épimysium (Figure 1). Ce tissu conjonctif est composé à 90 % par du collagène, les 10 % restants étant composés d'autres protéines fibreuses, glycoprotéines et protéoglycanes. Les fibres musculaires sont délimitées par le sarcolemme (membrane plasmique de la fibre musculaire) et contiennent les myofibrilles (1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètres) qui baignent dans le sarcoplasme qui héberge également les noyaux, le réticulum sarcoplasmique et les organites cellulaires. Les myofibrilles sont formées d'un assemblage parallèle de myofilaments fins composés d'actine, de troponine et tropomyosine, et de myofilaments épais essentiellement composés de myosine. Ces protéines myofibrillaires possèdent une structure secondaire principalement formée de feuillet  $\beta$  et d'hélice  $\alpha$ . Des filaments intermédiaires stabilisent la structure myofibrillaire (Gautel et al., 2016). Les myofibrilles résultent d'une succession de sarcomères (2.2  $\mu\text{m}$  quand ils sont relaxés) délimités par les disques Z (Tornberg, 2005; Astruc, 2014b). Lors de la contraction, les myofilaments épais de myosine coulissent sur les myofilaments fins grâce à l'énergie tirée de la catalyse d'ATP en ADP (Listrat et al., 2016).

Le **tissu conjonctif** est également composé de protéines, dont 90% de collagène, le reste étant composé d'autres protéines fibreuses (laminine, élastine), et d'une matrice formée majoritairement de protéoglycanes (Astruc, 2014). Contrairement aux protéines musculaires, les protéines du tissu conjonctif ont une faible valeur nutritionnelle (Bailey and Light, 1989). Le collagène est composé de trois chaînes  $\alpha$  polypeptidiques avec répétitions de la structure primaire Gly-X-X, Gly étant la glycine et X souvent de la proline ou de l'hydroxyproline (Tornberg, 2005). Trois chaînes assemblées forment une triple hélice de tropocollagène. Une fois les molécules de tropocollagène regroupées, elles forment une fibre de collagène. Des

liaisons appelées cross-links permettent de stabiliser les trois chaînes polypeptidiques ainsi que les tropocollagènes entre eux pour stabiliser la fibre de collagène. Plus il y a de cross-links, plus la viande est dure (Astruc, 2014a). Le collagène présent dans muscle est majoritairement du collagène fibrillaire de type I (entre 60-80 %)(Purslow, 2018; Zhang et al., 2020).



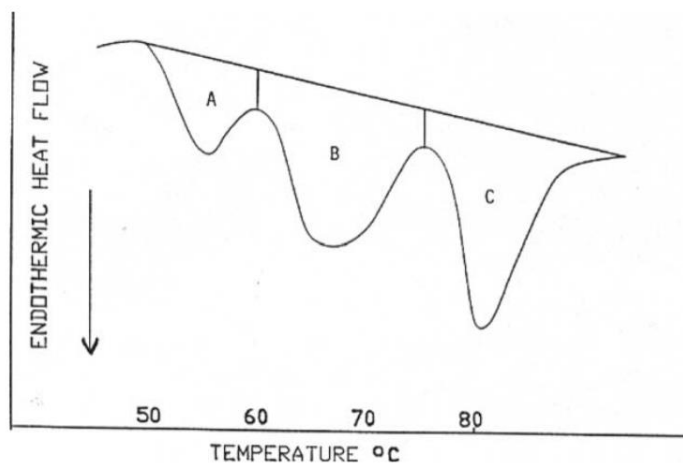
**Figure 1** : Organisation générale du muscles des mammifères.

### B. Impact des processus technologiques sur la structure de la viande

Après l'abattage, le muscle utilise ses réserves énergétiques en glycogène pour maintenir son homéostasie via un processus de glycolyse anaérobie et de fermentation lactique, entraînant une baisse de pH du muscle. Quand les réserves sont épuisées, le pH se stabilise et le processus de protéolyse post mortem, opéré par des protéases endogènes, démarre (Lana et Zolla, 2016). Après quelques jours de stockage à 4 °C, on observe une rétraction des cellules musculaires, une augmentation du volume extracellulaire et à des ruptures myofibrillaires, avec pour conséquence, un attendrissement de la viande (Astruc, 2014b; Ertbjerg et Puolanne, 2017). La viande subit généralement une transformation technologique avant d'être consommée. Parmi les transformations conventionnelles figurent les marinades, le salage, le séchage ou encore la cuisson qui toutes entraînent une modification des structures tissulaires, ultrastructurale et macromoléculaire de la viande.

Le procédé le plus employé est la **cuisson** qui engendre entre autres, des changements au niveau de la texture de la viande. Ces derniers sont principalement dus aux changements structuraux des protéines ainsi qu'à la perte en eau. Dès 60 °C, la contraction des cellules et donc la diminution du diamètre des fibres musculaires est notable (Supaphon et al. 2021). Des modifications protéiques dues à la coagulation (et formation d'agrégats), la dénaturation (modification de la structure secondaire) ou encore l'oxydation des protéines ont notamment été observées après cuisson (Santé-Lhoutellier et al., 2008; Astruc et al., 2010; Kajak-Siemaszko et al., 2011). Les protéines chauffées ont tendance à perdre leur structure en hélice

$\alpha$  et s'orienter davantage en feuillet  $\beta$  (Astruc et al., 2012; Motoyama et al., 2018). Par exemple, une fois les protéines dénaturées, elles se déplient et rendent apparents leurs sites hydrophobes. Ceci favorise leur agrégation pouvant même conduire d'un gel (Davey and Gilbert, 1974; Hamm, 1977). Le collagène est également dénaturé par la chaleur aux alentours de 60-70 °C, ce qui entraîne une contraction de la molécule. Au-delà de 75 °C, il se solubilise pour former de la gélatine lors du refroidissement (Yu et al., 2017). Finalement, 3 zones de transition des changements conformationnels des protéines peuvent être décrites (Figure 2). Ainsi, lors de la cuisson, la viande durcit suite à la dénaturation de la myosine et de l'actine (Bejerholm et al., 2014), et si la cuisson se prolonge, alors elle s'attendrit suite à la solubilisation du collagène (Davey and Gilbert, 1974; Yu et al., 2017). La température joue donc un rôle clef dans la texture de la viande.



**Figure 2** : Courbe représentant les 3 zones de transition (dénaturation protéique) lors de la cuisson d'un morceau de bœuf : A, myosines; B, protéines sarcoplasmiques et collagène; C, actine (Findlay et al., 1989).

### C. Rappel des mécanismes de digestion et d'absorption

La digestion est le phénomène de fragmentation par actions mécaniques et chimiques des aliments, de taille macroscopique, en nutriments disponibles et absorbables pour l'organisme. Elle suit quatre étapes, durant 3 à 4 heures, commençant dès l'entrée en bouche des aliments et s'étendant jusqu'au côlon.

La première étape de la digestion est la **phase orale**. Les aliments ingérés subissent un pré-découpage mécanique opéré par la mastication. Les aliments sont en effet coupés et broyés par les dents et subissent la pression exercée par la langue et les joues. Simultanément à l'action mécanique, les aliments subissent l'action de différentes enzymes, sécrétées pas les glandes salivaires situées dans la bouche, telles que des  $\alpha$ -amylases, des lipases

ou encore des protéases. Ces dernières ont chacune à une cible spécifique (Goode et al., 2014). Les  $\alpha$ -amylases catabolisent les oses de grande taille par la dégradation de l'amidon en glucose. De même, les lipases dégradent les triglycérides principalement en diglycérides et acides gras, et les protéases hydrolysent les protéines. Les enzymes contenues dans la salive à pH 7 se trouvent en condition optimales de fonctionnement pour amorcer la dégradation des aliments. La salive contient également la mucine, une glycoprotéine, qui amène de la cohésion au bol alimentaire et lubrifie le tractus digestif dans le but de faciliter le transit des aliments (Boland, 2016). Le bol alimentaire formé dans la bouche transite par l'œsophage, avec une progression par péristaltisme, avant de rejoindre l'estomac (Pedersen et al., 2002).

La **digestion gastrique** commence avec l'arrivée des aliments dans l'estomac. Le pH de l'estomac augmente avec l'apport alimentaire passant de 2 à 5-7 selon l'effet tampon des aliments. Cependant, une fois dans l'estomac, le bol alimentaire provoque une hausse de la production de suc gastrique, et plus exactement d'acide chlorhydrique par les cellules pariétales, entraînant un abaissement du pH de l'estomac (Sams et al., 2016). Le fractionnement des grosses molécules dans l'estomac est principalement permis par la composition du suc gastrique, riche en mucus, en pepsine, en lipase gastrique et en facteurs intrinsèques (Sams et al., 2016; Nutrixeal 2021). Il est supposé que l' $\alpha$ -amylase active à pH 7, sécrétée précédemment dans la salive, agit encore quelque temps dans l'estomac avant que le pH ne s'abaisse trop et bloque son activité (Boland, 2016). L'acidité du liquide dénature les protéines (Motoyama et al., 2018) et dégrade l'essentiel des micro-organismes pathogènes. Cette dénaturation des protéines de la matrice alimentaire favorise l'exposition des sites de coupures de la pepsine qui hydrolyse partiellement les protéines. Les contractions musculaires de la partie basse de l'estomac viennent fragmenter davantage les aliments et vider l'estomac. A l'issue de la digestion gastrique, la taille des particules alimentaires est d'environ 1 à 2 mm (Boland, 2016). La mixture, appelée le chyme, est envoyée vers l'intestin afin de continuer sa digestion essentiellement enzymatique.

La digestion du chyme alimentaire se poursuit ensuite dans le duodénum, c'est la **digestion intestinale**. Les sucs pancréatique, intestinal, ainsi que la bile et du bicarbonate se déversent dans l'intestin pour remonter le pH afin de fournir un environnement propice à l'activité des enzymes (protéases, lipases et amylases) (CEVA 2004). Les protéases comme la trypsine et la chymotrypsine fragmentent au maximum les constituants protéiques du chyme. La lipase pancréatique hydrolyse les triglycérides ingérés en agissant sur des substrats émulsionnés, comme des micelles, précédemment formés et stabilisés par les constituants de la bile. Le chyme alimentaire avance le long de l'intestin par des mouvements péristaltiques où

les acides aminés, oses de petites tailles et glycérides sont absorbés principalement dans le jéjunum via les entérocytes (Boland, 2014). Les peptides sont notamment absorbés différemment selon leurs tailles. Les acides aminés sont directement absorbés par des voies mettant en jeu une diversité d'ions. Les dipeptides et tripeptides sont internalisés grâce à des transporteurs sur la membrane de l'entérocyte où ils seront clivés en acides aminés. Les peptides ont donc besoin d'être largement digérés pour être utilisables par l'organisme. L'intervention de la pepsine est donc vitale au bon fonctionnement du métabolisme (Lecleire, 2008; Kiela et al., 2016).

#### D. La pepsine, une protéase clef dans la digestion des protéines

La **pepsine A** (EC 3.4.23.1) est **une enzyme digestive** présente dans le suc gastrique et responsable de la **dégradation des protéines** du bol alimentaire. Cette protéine aspartique de 326 acides aminés est sécrétée indirectement puisqu'elle est issue d'un précurseur : le pepsinogène (Dunn, 2003). Ce dernier est produit et stocké dans les cellules principales situées dans les couches profondes des glandes gastriques. Ces cellules principales libèrent le pepsinogène dans la lumière gastrique en réponse à divers stimuli tels que l'arrivée des aliments dans l'estomac. Les protéases gastriques sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs afin de protéger le tissu hôte des dommages et d'empêcher l'autolyse (Rajiv Heda et al., 2021). Le pepsinogène est inactif grâce à la présence d'un prosegment situé en N-terminal, lié principalement par des interactions électrostatiques avec les autres acides aminés de la molécule, qui bloque l'accès au site actif (*Figure 3*). Le prosegment est constitué d'une quarantaine d'acides aminés, entre 35 et 49 selon l'espèce, organisés en un feuillet  $\beta$  et 3 hélices  $\alpha$  (Dunn, 2003). La conformation et la position du prosegment permettent de bloquer l'activité des 2 résidus aspartiques qui sont nécessaires à la catalyse de la réaction enzymatique. En effet, une fois le prosegment clivé et le repliement enzymatique conforme, les acides aspartique 32 et 215 (*Figure 3*) permettent la digestion des peptides alimentaires par la pepsine (Richter et al., 1998).





**Figure 3** : Structure tertiaire du pepsinogène de porc. Le prosegment est représenté en jaune, le site actif en rouge et l'enzyme active (pepsine) en bleu. Le pepsinogène de porc est sensiblement identique à celui de l'Homme. (Richter et al., 1998)

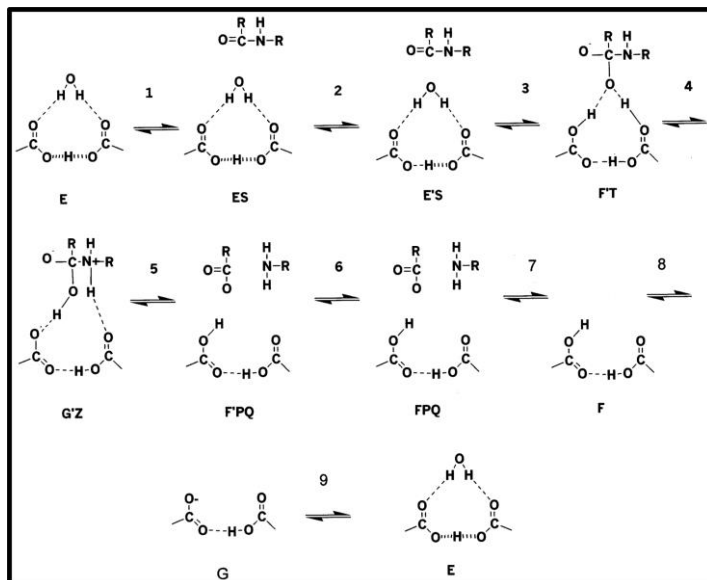
Simultanément à la libération du pepsinogène dans l'estomac, l'arrivée des aliments provoque également une sécrétion d'HCl par les cellules pariétales, acidifiant alors le milieu (Rajiv Heda et al., 2021). La baisse de pH permet de cliver le prosegment et donc d'activer l'enzyme. La conversion de la proenzyme se réalise à  $\text{pH} < 5$  mais les études de Sinkovits et al. (2007) ont permis de montrer que la pepsine avait une faible activité dès  $\text{pH} 6$ . A cette valeur de pH, les interactions électrostatiques entre les acides aminés du prosegment et les acides aminés du site actif sont déstabilisées. En effet, les acides aminés sont protonés et sont chargés majoritairement positivement favorisant une répulsion électrostatique entre le prosegment, lui aussi protoné, et le site actif. La conformation de la pepsine est stabilisée par la présence d'un nombre important de liaisons hydrogènes, d'interactions électrostatiques entre les résidus de l'enzyme (Cooper et al., 1990) ainsi que la présence de ponts disulfure (Herriott, 1962). Plus précisément, les liaisons hydrogène entre les acides aspartiques du site actif et la chaîne principale de l'enzyme permettent la conformation la plus efficace pour se fixer à une molécule d'eau et catalyser par la suite le clivage des peptides alimentaires (Cascella et al., 2005).

La pepsine agit durant plusieurs heures dans l'estomac et devient inactive par la suite. En effet, l'enzyme possède 4 configurations plus ou moins proches selon le pH. Une forme totalement active à  $\text{pH} < 3,4$ , une forme intermédiaire ( $\text{pH} < 6,8$ ) dont la conformation est proche de l'enzyme native mais qui demeure inactive. L'activité de la pepsine est donc essentiellement due à la protonation des acides aminés du site catalytique. À pH supérieur à 6,8, la pepsine possède toujours une structure secondaire mais inactive et dont la réversibilité à un l'état intermédiaire est limitée. Enfin, à  $\text{pH} > 11,5$ , la pepsine apparaît complètement dénaturée et la transition est irréversible (Piper et Fenton, 1965; Campos et Sancho, 2003).

L'activité de la pepsine diminue et s'arrête à l'entrée du duodénum où le pH remonte au-dessus de 6. Néanmoins, la dégradation des protéines alimentaires continue par l'action de la trypsine et chymotrypsine efficaces à un pH légèrement basique (Nutrixéal, 2021).

### E. Mode d'action de la pepsine et sa bioaccessibilité dans la viande

La pepsine est donc déjà présente à pH 6-5 mais son pH optimum de fonctionnement se situe entre 1,5 et 2 (Rajiv Heda et al., 2021). Le **mode d'action** de la pepsine est encore assez mal connu mais il existe plusieurs théories qui se rejoignent et qui peuvent être synthétisées par la figure 4 proposée par Northrop (2001). Néanmoins, la pepsine est une enzyme non spécifique avec une large diversité de substrats mais qui est plus efficace pour cliver les liaisons peptidiques entre les acides aminés hydrophobes et de préférence les acides aminés aromatiques, tels que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine (Mohseni-Shahri et al., 2018) et ne clive pas les liaisons contenant de la valine, de l'alanine ou de la glycine (Monogioudi et al., 2011). L'activité de la pepsine est cependant modulée selon les caractéristiques des protéines à digérer. En effet, l'accessibilité de l'enzyme au site de coupure peut dépendre de la densité de la molécule cible, plus elle est élevée, plus l'enzyme a des difficultés à cliver les liaisons. De même, les protéines peuvent avoir des conformations tertiaires rigides, stabilisées par des ponts disulfures ou glycosylations difficiles à pénétrer pour la pepsine (Suwareh et al., 2021).



**Figure 4** : Mécanisme de catalyse par les peptidases aspartiques, dont la pepsine. Dans ce mécanisme, E est l'enzyme libre, prête à catalyser. L'étape 1 est la liaison du substrat, ici un peptide, pour former le complexe (ES). L'étape 2 est un réarrangement conformationnel pour comprimer tous les composants dans la bonne géométrie afin de débiter le processus

*catalytique (E'S). L'étape 3 comprend l'élimination d'un proton de la molécule d'eau liée pour stimuler l'attaque du carbone carbonyle (F'T). L'étape 4 implique un transfert de proton vers l'azote de la liaison peptidique (G'Z). L'étape 5 est l'événement de clivage de la liaison (F'PQ). L'étape 6 est l'ouverture du clapet pour libérer les produits (FPQ) et l'étape 7 est la libération des produits (F). L'étape 8 comprend la perte d'un proton (G) et l'étape 9 implique la liaison d'une nouvelle molécule d'eau ainsi que la reformation de la liaison hydrogène (E).*

Plusieurs études ont porté sur **l'effet de la pepsine** sur la structure des fibres musculaires et leur digestibilité. Kaur et al. (2014) ont notamment pointé un mode d'action de la pepsine, plutôt aléatoire sur la viande crue et, partant de l'extérieur vers le centre pour la viande cuite. Astruc et al. (2014b) ont également mis en évidence, sur des fibres musculaires issues de viande crue, la présence de fractures ou coupures dues à la pepsine. Une perte de la structure des sarcomères est visible, probablement due à la coagulation et dénaturation des protéines engendrée par le faible pH. L'acidité entraîne un gonflement des cellules musculaires. Sayd et al. (2016) ont par ailleurs montré que le collagène n'est pas digéré dans la viande crue et cuite dans des conditions douces. Ce phénomène est expliqué par la composition du collagène riche en proline ou de l'hydroxyproline, des acides aminés résistants à la digestion (Kaur et al., 2010). En effet, ces acides aminés procurent une forte stabilité de la structure tertiaire du collagène limitant la digestion par la pepsine (Ravikumar & Hwang, 2008). Néanmoins, Zhang et al. (2020) ont prouvé que le collagène de type I était bien digéré par la pepsine.

Les modifications structurales du muscle engendrées par les processus technologiques affectent notamment la digestibilité de la viande. Par exemple, la dénaturation engendrée par la **cuisson**, entraîne un déploiement de la structure secondaire (hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ ) et tertiaire pour rendre davantage apparents les sites de clivage pour la pepsine (Lee et al., 2021). Au-delà de 70 °C, les protéines coagulent pour former des agrégats protéiques qui ralentissent l'action de la pepsine (Santé-Lhoutellier et al., 2008). De plus, Bax et al. (2012) ont montré que le taux de digestion de la viande était maximal après une cuisson de 30 min à 70 °C. Zhang et al. (2020) ont également montré que la digestibilité du collagène était maximale après une cuisson aux alentours de 60 à 70°C.

Dans le cas du **champ électrique pulsé**, il a été prouvé que l'application de courtes pulsations sur la viande améliore la digestibilité en perturbant la structure des muscles qui se reflète par un allongement des sarcomères. La pepsine accède plus facilement aux protéines de la matrice et dégrade plus rapidement les bandes I et des disques Z (Chian et al., 2019).

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence les bienfaits des **hautes pressions** (HPP) sur la digestibilité des protéines. De Lamballerie-Anton, Delépine et Chapleau (2002)

sont les premiers à avoir révélé la présence d'un effet des HPP sur la digestibilité de la viande. Kaur et al. (2016) ont ensuite montré que les protéines étaient plus rapidement hydrolysées lors de traitements à fortes pressions (600 MPa). En effet, les HPP modifient la structure musculaire notamment par la dégradation du tissu conjonctif et par la formation d'agrégats de protéines induit par la dénaturation de certaines protéines sarcoplasmiques. L'intensité du traitement est positivement corrélée à la digestibilité des protéines.

#### F. Techniques d'évaluation de l'activité de la pepsine

Maintenant que la pepsine et son mode d'action sont connus, nous pouvons nous intéresser à sa localisation et son effet sur la matrice alimentaire. Plusieurs méthodes ont été mises en place ces dernières années mais elles ont des limites.

- **Spectroscopie infrarouge (IR)**

Motoyama et al. (2018) avaient pour but d'étudier l'impact de la pepsine sur la structure musculaire de la viande de bœuf mais seules les études par microspectroscopie IR des effets du chauffage (cuisson 85°C durant 10 h) et du pH (3 gammes testées) ont été réalisées. La microspectroscopie mélange la microscopie et la spectroscopie IR. La spectroscopie IR est une technique d'étude de la vibration des molécules par rayonnement électromagnétique. Trois plages d'études existent : le proche IR (0,8-2,5  $\mu\text{m}$  ou 12500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), le lointain IR (25-1000  $\mu\text{m}$  ou 400-10 $\text{cm}^{-1}$ ), et le moyen IR (2.5-2500  $\mu\text{m}$  ou 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ), région principale de la spectroscopie vibrationnelle pour identifier des composés organiques et étudier la conformation des molécules. Un échantillon irradié par un rayonnement IR absorbe partiellement la lumière et la spectroscopie permet de rendre compte de cette absorbance à chaque longueur d'onde (spectre d'absorbance). L'absorbance est caractéristique des liaisons chimiques (C=C, C=O, O-H...) du produit et renseigne sur la composition (protéines, glucides, lipides) et la structure moléculaire de ce dernier. Ici, nous allons principalement nous intéresser aux protéines dont les spectres d'absorption sont dus à la liaison peptidique. Les bandes d'absorption sont nommées amide I, II, III et sont visibles dans le moyen IR (Dufour et Bertrand, 2006). La différence entre ces bandes réside dans le type de vibration des liaisons de la liaison peptidique : élongation, balancement, torsion ou déformation (Dufour et al., 2006). Grâce à cette technique, Motoyama et al. (2018) ont pu mettre en évidence un effet du pH sur la structure moléculaire de viande soumise à une simulation de digestion gastrique. Zhang et al. (2020) ont également utilisé la microspectroscopie IR pour mettre en évidence les effets du chauffage sur les fibres de collagène.

- **Microscopie (optique et fluorescente)**

Astruc et al. (2014b) ont caractérisé la diffusion de la pepsine en histologie. La zone de muscle pénétrée par la pepsine présentait des différences structurales sensibles comparativement aux zones témoin non digérées. Cependant, cette méthode ne permet qu'une localisation indirecte de la pepsine, à travers ses effets sur l'aliment, et de plus la variation de structure était la conséquence de l'interaction pepsine/pH acide.

Néanmoins, Astruc et al (2014b) ont aussi travaillé sur une autre technique plus précise permettant de suivre directement l'activité de la pepsine grâce à l'immunohistofluorescence. Pour cela, 2 anticorps sont nécessaires : un premier qui se fixe à la pepsine et un second, couplé à un marqueur fluorescent, qui se fixe sur le premier anticorps qui est visible en microscopie à fluorescence. Néanmoins, cette technique possède également des limites puisque le collagène est légèrement autofluorescent et peut être confondu avec la fluorescence du marqueur fluorescent de la pepsine. De plus, de nombreuses étapes de lavage entre les 2 ajouts d'anticorps sont nécessaires, ce qui pourrait extraire une partie des enzymes et par conséquent limiter son identification sur coupe. De plus, le faible pH permettant l'activité optimale de la pepsine ne serait pas très compatible avec l'activité des anticorps qui pourraient être dénaturés et diminuer la fixation anticorps pepsine.

Ainsi, ces différentes techniques ont permis d'acquérir des connaissances sur le mode d'action et de diffusion de la pepsine dans la viande préalablement soumise à une digestion gastrique in vitro. La simulation de la digestion gastrique a mis en évidence les impacts histologiques engendrés par l'enzyme :

- une augmentation de la taille des cellules, principalement liée au pH acide
- la dégradation des lignes Z et des myosines
- l'altération des fibres musculaires

Il est à noter que la digestion gastrique de la viande résulte d'une dénaturation protéique consécutive à l'acidité du contenu de l'estomac associée à la protéolyse par la pepsine. Il semblerait à la lecture des résultats d'immunohistofluorescence que la pepsine transiterait préférentiellement par la matrice extracellulaire avant d'entrer dans les cellules musculaires (Astruc, 2014b).

### G. Objectif du projet de recherche

Certains mécanismes d'action de la pepsine sont encore méconnus de nos jours alors qu'ils jouent un rôle majeur dans la compréhension de la digestion des protéines. L'objectif de mon stage a été de s'intéresser à la diffusion de la pepsine au sein d'une matrice alimentaire protéique telle que la viande de bœuf (crue et cuite) afin d'établir son mode d'action et de comprendre l'effet de la microstructure de l'aliment sur sa diffusion. Pour étudier la diffusion de la pepsine de manière précise, l'enzyme a été localisée par immunomarquage pour suivre son trajet dans la viande. Cette technique, associée à la microscopie à fluorescence, nous permet de localiser précisément l'enzyme et de déterminer si la pepsine diffuse dans la matrice aléatoirement ou si elle suit un chemin spécifique (diffusion par le tissu conjonctif). Nous avons ensuite étudié les effets de la pepsine de porc sur une coupe histologique de viande. Grâce à la microscopie optique et la coloration de coupes, nous avons été en mesure de mettre en évidence la digestion par la pepsine et son impact sur les fibres musculaires et le collagène. De plus, la microspectroscopie IR nous a permis de rendre compte de l'existence de changements structuraux liés à la digestion afin de suivre la diffusion de la pepsine et de mieux comprendre l'amplitude de ses effets sur les différents compartiments tissulaires du muscle (fibres musculaires et tissu conjonctif intramusculaire respectivement).

### III. Matériels et méthodes

#### A. Prélèvement et préparation des échantillons

Les morceaux de viande utilisés dans les expériences suivantes ont été prélevés à l'abattoir expérimental INRAE du site de Theix. Il s'agit de 2 muscles différents (selon les disponibilités) de bovins : *Masseter* et *Obliquus abdominis*. Les morceaux de muscles ont été récupérés 1 jour après l'abattage et stockés 1 jour à 4°C avant d'être préparés pour les différentes expérimentations. Les expérimentations ont été résumées dans l'Annexe 1 et 2.

##### a. Expérimentation 1 : blocs de viande

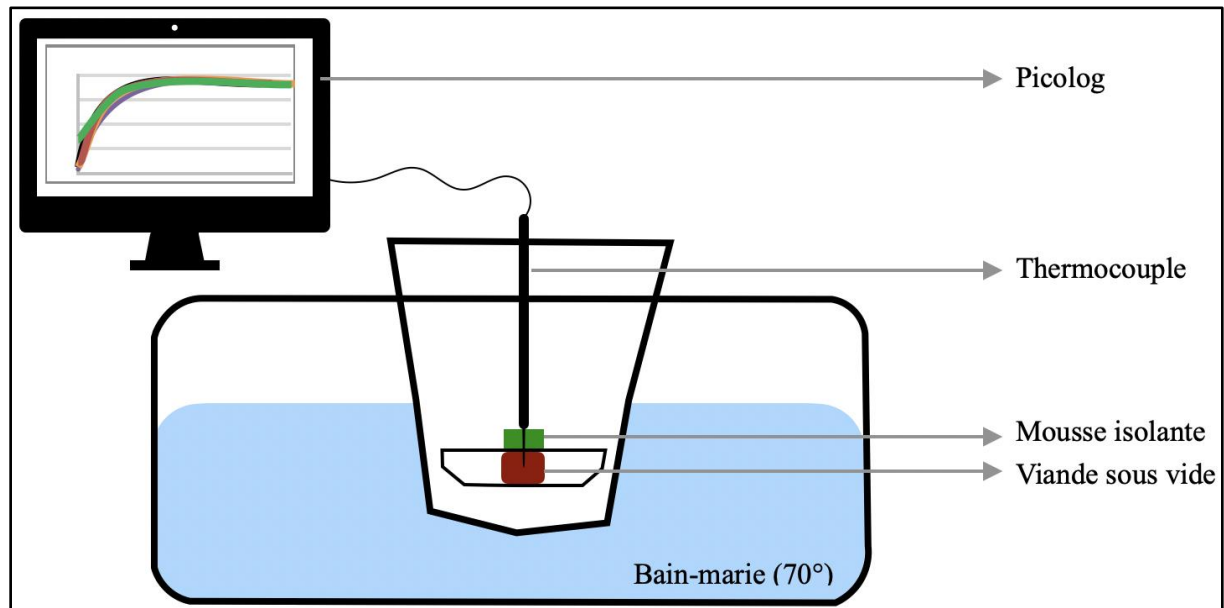
Deux cubes d'environ 1 cm<sup>3</sup>, préalablement pesés pour déterminer les quantités de fluides et de pepsine à utiliser, ont été préparés.

##### b. Expérimentation 2 : coupes de viande

3 blocs d'1 cm<sup>3</sup> avec les fibres musculaires orientés de façon longitudinale et 3 autres de façon transversale ont été cryofixés. Les échantillons ont été collés sur une plaque de liège et congelés dans le méthylbutane précédemment refroidi à l'azote liquide, puis stockés à -80°C. Un bloc de chaque type d'échantillon a été choisi pour obtenir, grâce au Cryo microtome (Leica Biosystems CM 1950), des coupes sériées de 20 µm. Quatre séries de 6 coupes chacune pour les 2 blocs ont été préparées sur des lames (SuperFrost Plus, Thermo Scientific). 1 autre série de 6 coupes sériées de 6 µm pour chaque bloc a été déposée sur des lames BaF<sub>2</sub> (20 mm x 1 mm, Crystran) pour la microspectroscopie FTIR. Au total, 30 coupes longitudinales et 30 coupes transversales ont été confectionnées pour digestion ultérieure. 2 séries supplémentaires de 4 coupes sériées (20 µm) chacune ont été préparées sur lames SuperFrost Plus pour localiser la pepsine par immunomarquage.

3 blocs transversaux et 3 blocs longitudinaux ont été cuits avant d'être cryofixés. Pour cela, ils ont d'abord été mis sous vide (11 mbar, Multivac C300) et cuits sous vide dans un bain marie (Grant VF Y14) chauffé à 70°C (Figure 5). Cette température est optimale pour la digestion de la viande (Bax et al., 2012). La température a été suivie au cœur du bloc de viande à l'aide d'un thermocouple relié au logiciel Picolog. Une fois la température atteinte à cœur, la cuisson a été prolongée de 10 min. Le temps moyen pour atteindre 70°C à cœur est de 517 ± 99 secondes. Le temps total moyen de cuisson est de 1123 ± 99 secondes. Les différences peuvent être expliquées par la taille des échantillons qui peut varier de quelques millimètres de l'un à l'autre et de la position du thermocouple qui pouvait ne pas être tout à fait à cœur du bloc. Les blocs ont ensuite été cryofixés et conservés à -80°C. Quatre séries de 6 coupes de 20 µm, issues du bloc transversal, déposées sur lames SuperFrost Plus et 1 série de 6 coupes de 6 µm

déposées sur lames BaF<sub>2</sub> ont été préparées.



**Figure 5** : Protocole de cuisson de blocs de viande dans un bain-marie à 70°C

## B. Digestion des échantillons

### a. Expérimentation 1 : application du protocole INFOGEST

Afin de conduire les expériences dans les conditions les plus proches de la réalité physiologique, une simulation de la digestion a été mise en œuvre. Dans nos expériences, la mastication n'a pas été prise en compte car nous souhaitons conserver la structure des aliments dans le but d'étudier plus facilement l'activité protéasique de la pepsine. La simulation de digestion gastrique a été conduite dans les conditions décrites par le consensus INFOGEST 2.0 (Brodkorb, et al., 2019) de digestion gastro-intestinale statique *in vitro* en apportant quelques légères modifications. Les solutions nécessaires pour réaliser une digestion *in vitro* sont des solutions simulées du fluide salivaire (SSF) et du fluide gastrique (SGF). Les minéraux KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCl, CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) sont dilués à l'avance dans l'eau déminéralisée selon les concentrations indiquées dans l'Annexe 3 pour former les solutions mères qui se conservent plus longtemps que les solutions expérimentales. Les fluides simulés sont réalisés juste avant leur utilisation et leurs pH sont ajustés à l'aide de NaOH 1M et HCl 1M (SSF pH 7, SGF pH 2). Le pH du SGF est ajusté à 1,8/2 et non à 3 (Minekus et al., 2014) pour optimiser au maximum l'activité de la pepsine.

La pepsine de porc (7012 Sigma-Aldrich, activité spécifique de 2500 U/mg) est diluée dans l'eau de manière à obtenir une concentration de 2000 U/mL dans la mixture finale. Pour trouver la quantité de pepsine à utiliser, il faut préparer une solution mère de pepsine et pour cela, le volume de solution de pepsine ( $V_{\text{pepsine}}$ ) à ajouter lors de la phase gastrique de la



digestion doit d'abord être déterminé. Nous souhaitons une solution concentrée à 20 mg/mL en partant d'une pepsine d'une activité spécifique de 2500 U/mg. Ainsi, dans 20 mg de pepsine, il y a 50000 unités et donc 50000 unités par mL de solution. Dans notre solution finale, nous cherchons une activité enzymatique de 2000 unités par mL de digesta. Nous avons 5 g de viande à digérer, donc un volume final après digestion gastrique de 20 mL comme l'indique le protocole INFOGEST (Tableau I). Nous souhaitons obtenir 40000 unités dans 20 ml de digestat. Il faut donc 0.8 mL de solution de pepsine à ajouter au bol alimentaire lors de la phase gastrique pour retrouver une activité enzymatique de 2000 U/mL de digestat.

$$V_{pepsine} = \frac{\text{Activité enzymatique} \times \text{Volume final de digestat}}{\text{Activité spécifique} \times \text{Concentration solution mère}} = \frac{2000(u/mL) * 20(mL)}{2500(u/mg) * 20(mg/mL)} = 0.8mL$$

**Tableau I** : Exemple de digestion *in vitro* de 5 g de viande (Brodkorb et al., 2014)

Quantité de nourriture à digérer	5 g	
Phases de digestion	Oral	Gastrique
Nourriture ou digestat	5g	10 mL de bol alimentaire oral
1.25x de Fluides Simulés (mL)	4	8
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (0.3) (mL)	0.025	0.005
Enzyme	-	Pepsine
Activité enzymatique dans le digestat final (U/mL)	-	2000
Activité spécifique de l'enzyme dans la solution mère (U/mg)	-	3000
Concentration enzymatique dans la solution mère (mg/mL)	-	20
Volume de solution mère à ajouter (mL)	-	0.667 (1.33 mg/mL quand dilué dans 10 mL)
H <sub>2</sub> O (mL)	0.975	0.928
HCl (mL)	-	0.4
NaOH (mL)	-	-
Volume final (mL)	10	20

Ainsi, les deux blocs ont chacun été introduits dans un tube à essai dans lequel du SSF, 1:1 (wt:wt), préchauffé à 37°C a été ajouté. L'incubation a duré 2 min à 37°C dans une étuve (Jouan EB 28). Le bol alimentaire résultant a ensuite été transféré dans une boîte de pétri où du SGF, 1:1 (wt:wt), a également été ajouté. La solution de pepsine a finalement été introduite dans la boîte de pétri pour un échantillon afin de démarrer la digestion gastrique. Pour le témoin, un volume d'eau équivalent à celui de pepsine a été ajouté. Le pH de la mixture finale a été ajusté par de l'HCl (1M) afin d'atteindre pH 1,8-2. Des tests préalables ont été réalisés en utilisant uniquement le mélange des fluides simulés afin de déterminer le volume exact d'acide chlorhydrique à ajouter pour obtenir le pH souhaité. On néglige donc l'effet tampon du morceau de viande qui est trop faible pour engendrer une augmentation significative de pH. Une fois le pH ajusté, le bol alimentaire a été incubé dans l'étuve à 37°C durant 2h. Après 1h d'incubation, les blocs de viande ont été retournés dans la boîte de pétri. A la fin de l'expérience, les échantillons ont été cryofixés puis stockés à -80°C. Huit coupes de 20 µm ont été récupérées environ tous les 100 µm d'épaisseur le long du bloc sur lame de verre SuperFrost Plus.

#### b. Expérimentation 2 : digestion sur coupe

Toutes les séries préparées dans l'étape III.A.b sont composées de 3 tests et 3 témoins. Les 3 coupes témoins sont utilisées comme ceci : 1 coupe est laissée à température ambiante, 1 coupe est placée à 37°C, et sur la dernière coupe, 10 µL de SGF ont été déposés. La digestion des lames tests est réalisée par le dépôt, au centre de la coupe, de 10 µL de solution de pepsine, à différentes concentrations (3; 5; 10 mg/mL) diluée dans le SGF à pH 1.8-2. Pour limiter la détérioration des coupes, seule la digestion par la pepsine est réalisée. Les lames sont placées dans des boîtes en plastique souple fermées, contenant un papier absorbant imbibé d'eau pour maintenir une atmosphère humide et éviter le dessèchement des coupes. Toutes les lames sont incubées pendant 2h dans une étuve à 37°C exceptée la coupe témoin à température ambiante. Les 2 séries supplémentaires de 4 coupes ont été incubées à 37°C pendant 2h. Chaque série comprend 2 coupes digérées avec 10 µL d'une solution de pepsine diluée à 10, 500, ou 3000 µg/mL dans le SGF et les deux dernières coupes avec 10 µL de SGF.

### C. Histologie

#### a. Histochimie

Les lames obtenues par les deux expérimentations peuvent être directement analysées en microscopie optique. Cependant, les coupes sont difficilement interprétables telles quelles. Ce pourquoi des colorations permettant de distinguer les différents types de tissus sur les coupes ont été réalisées. Une série transversale, une série longitudinale, les coupes issues de l'expérimentation 1 ainsi qu'une série de coupes cuites sont colorées avec hématoxyline éosine

et safran (HES). Une série transversale, une série longitudinale et une série de coupes cuites sont colorées avec le rouge sirius.

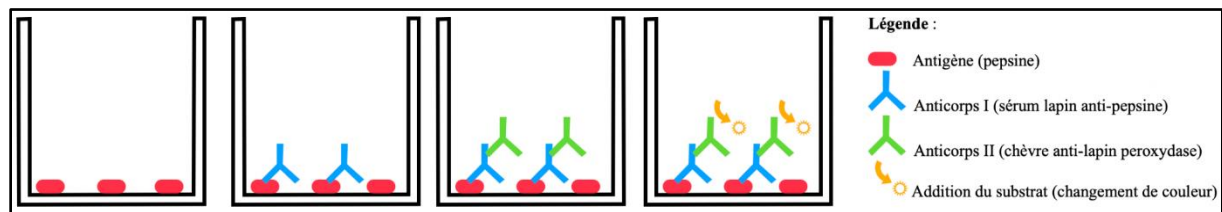
L'objectif de la **coloration HES** est de faire apparaître les fibres musculaires en rose et le tissu conjonctif en jaune orangé. En effet, l'hématoxyline colore les noyaux des cellules en violet, l'éosine fait ressortir les cytoplasmes en rose, et le safran colore les fibres de collagène en jaune (Source interne). Pour cela, les lames sont d'abord introduites dans l'hématoxyline de Harris (SURGIPATH Labonord), précédemment filtré, durant 5 min. Puis, les lames sont rapidement rincées dans deux bains d'eau déminéralisée. Elles sont ensuite plongées dans l'éosine (Y 0.5% w/v, Sigma-Aldrich) pour 15 secondes avant d'être à nouveau rincées comme précédemment. Elles sont alors déshydratées successivement dans des bains d'éthanol 80° (2min), d'éthanol 95° (5 min) et d'éthanol 100° (5 min). Puis, les lames sont placées dans une solution saturée de safran alcoolique (Labronord) pendant 8 min avant d'être rincées successivement dans deux bains d'alcool 100°. Enfin, les lames sont plongées dans deux bains successifs de méthylcyclohexane avant d'être montées en lamelle en déposant une goutte d'Eukitt (O.Kindler GmbH) sur la coupe.

La **coloration rouge sirius** teint les fibres musculaires en jaune et le collagène en rouge. Les lames sont d'abord plongées dans un bain d'acétone durant 60 minutes avant d'être trempées dans une solution de picro formalin (aldéhyde formique 5%, éthanol 90%, acide picrique saturé) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite rincées en premier à l'éthanol 90%, 1 minute puis à l'eau déminéralisée 10 min. Les lames sont alors colorées 60 min dans un bain de rouge sirius (0.1% rouge sirius, acide picrique) avant d'être acidifiées par de l'HCl 0,01M pendant 5 minutes. Un rinçage à l'eau déminéralisée est ensuite réalisé. Les coupes sont déshydratées dans l'éthanol 95° puis dans l'éthanol 100°C. Enfin, elles sont passées dans deux bains successifs de méthylcyclohexane pour être montées en lamelle en déposant une goutte d'Eukitt (O.Kindler GmbH) sur la coupe.

#### b. Immunohistofluorescence : Test ELISA

Afin de localiser la pepsine sur les coupes, une des techniques mise en œuvre est l'immunomarquage. Ceci permet de marquer une protéine sur coupe par fluorescence et ainsi de la visualiser et donc de la localiser sur la coupe par microscopie à fluorescence. Pour cela, la spécificité entre les anticorps et l'antigène a été testée via un test technique d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA). Cette méthode consiste à détecter la présence d'un antigène, ici la pepsine, grâce à la fixation spécifique d'un anticorps primaire. L'anticorps primaire est ensuite reconnu de la même manière par un anticorps secondaire sur lequel est fixée une enzyme. Cette dernière interagit ensuite avec son substrat pour libérer un composé

coloré (Figure 6).



**Figure 6 :** Schéma détaillant les étapes d'un test ELISA indirect

Pour réaliser le test **ELISA**, 200 $\mu$ L d'une solution de pepsine de concentrations comprise entre 0.1 et 30  $\mu$ g/mL ont été déposés sur une plaque de microtitration à 96 trous organisée selon le tableau II. Après incubation pendant la nuit à 4°C, la plaque a été vidée puis lavée par du tampon phosphate salin (PBS : 900 mL d'eau déminéralisée et 100 mL de la solution suivante : NaCl 80g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>12</sub> 29g (ou 14.2g si anhydre), KCl 2g, ajusté avec de l'eau à 1 kg). On a ensuite procédé à une étape de surcoating en incubant, pendant 1h à température ambiante, 200 $\mu$ L d'une solution de sérum de chèvre à 10 % en PBS. Cette étape permet de limiter les liaisons non spécifiques des anticorps directement à la plaque. Pour chacune des concentrations différentes en pepsine, 4 répliques ont été réalisées à même concentration en anticorps primaire. Les cupules sont ensuite vidées et lavées au PBS Tween (0.1%), un détergent, pour éliminer tout ce qui ne serait pas fixé au fond de la plaque. Après le lavage, 100  $\mu$ L de l'anticorps primaire, ici le sérum lapin anti-pepsine (Acris GmbH), dilué dans le PBS Tween sérum de chèvre 1%, sont ajoutés dans les cupules pendant 1h. Différentes dilutions d'anticorps primaires ont été préparées (1/3000, 1/1000, 1/300). La plaque est ensuite vidée et lavée pour enlever les anticorps non fixés à l'antigène. 100  $\mu$ L de solution d'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin peroxydase, Sigma-Aldrich) dilué à 1/100 dans le PBS Tween sérum de chèvre 1% sont ajoutés dans les cupules. Après 1h d'incubation, les cupules sont à nouveau vidées et lavées au PBS Tween 0.1%, puis remplies avec 100  $\mu$ L de substrat, le 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich), et laissées 30 min à l'obscurité. Sous l'action de la peroxydase, le TMB prend une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de peroxydase présente. Le TMB colore la solution en bleu, dont l'absorbance est mesurée par le lecteur spectrophotométrique (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum) à 630 nm.

**Tableau II** : Schéma de l'organisation de la plaque microtitre ELISA. Chaque couleur correspond à une dilution différente de l'anticorps primaire : en vert 1/3000, en bleu 1/1000 et en rouge 1/300. Les nombres dans les cellules correspondent à la concentration en pepsine dans la cupule en  $\mu\text{g/mL}$ .

/	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
C	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
D	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
G	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### c. Immunohistofluorescence : Immunomarquage

La méthode d'immunohistofluorescence se base sur les mêmes principes qu'un test ELISA à savoir, un antigène que l'on veut localiser grâce à la fixation d'un anticorps primaire, et d'un anticorps secondaire couplé à un marqueur fluorescent.

Un immunomarquage indirect de la pepsine a été réalisé sur les 2 séries 4 de coupes de viande crue précédemment digérées. Les coupes ont d'abord été détourées à l'aide d'un crayon hydrophobe afin d'empêcher les liquides des prochaines étapes de se mélanger. Après le détournage, 1 goutte du mélange PBS-sérum de chèvre (10%), est déposée au centre de la coupe et étalée afin de recouvrir toute la surface de la coupe. Le liquide est laissé 10 min en chambre humide à température ambiante pour diminuer le risque de formation de liaisons non spécifiques aux étapes ultérieures. A la fin des 10 min, les gouttes sont absorbées délicatement à l'aide d'un papier absorbant afin de retirer au maximum le liquide. L'anticorps primaire (sérum lapin anti-pepsine), est ensuite ajouté sur 4 coupes à raison de 50  $\mu\text{L}$  par coupe, quantité nécessaire et suffisante pour recouvrir la surface et ne pas déborder. La solution est laissée sur la coupe pendant 1h en chambre humide à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min

dans des bains de PBS Tween 0.1%, 50  $\mu$ L d'un anticorps secondaire, le chèvre anti-lapin, déjà couplé à un fluorochrome Sulfo-Cyanine3 (CY3) sont ajoutés sur toutes les coupes. Les lames sont laissées 1h à l'obscurité pour limiter toute excitation de la sonde fluorescente puis sont lavées 3 fois 5 minutes dans des bains de PBS Tween 0.1%. Les lames sont finalement montées en lamelles, en déposant 1-2 gouttes d'Aqueous Mount (Scytek Laboratories) pour coller les lamelles, et sont laissées 1 nuit à l'obscurité.

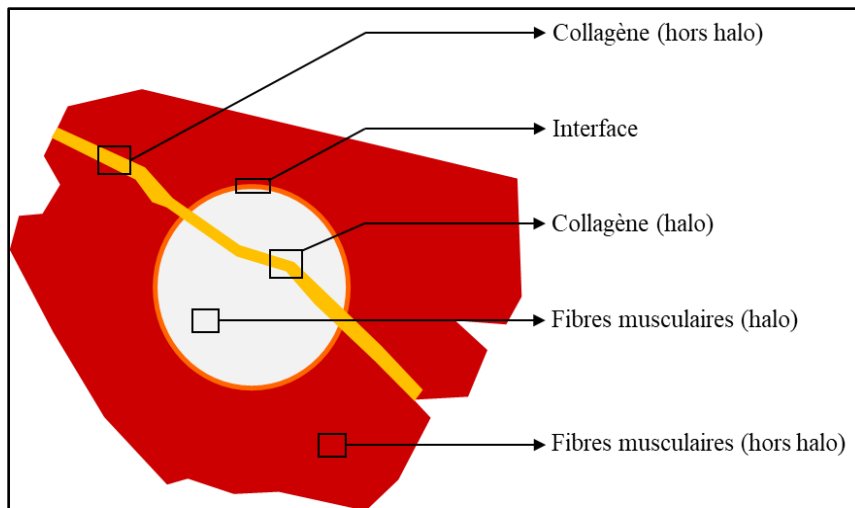
Un **immunomarquage de la laminine** a été réalisé sur 2 séries transversales, 2 séries longitudinales et 2 séries de coupes cuites (1 série témoin, 1 série test). Pour cela, le même protocole que celui de l'immunomarquage de la pepsine a été utilisé. Seuls les anticorps sont différents : le primaire est un sérum lapin anti-lamine (Sigma-Aldrich) dilué au 1/100 et le secondaire est un chèvre anti-lapin (Sigma-Aldrich), couplé à CY3, dilué au 1/100.

#### d. Observation au microscope et acquisitions d'images

Toutes les coupes ont été photographiées avant et après digestion en microscopie optique. Le jour suivant les colorations, les lames ont été analysées en microscopie optique (Olympus BX61) à l'aide d'une caméra (Olympus DP71) reliée au logiciel CellSens. Le jour suivant les immunomarquages, les lames ont été analysées par microscopie à fluorescence (Olympus BX61) en excitant la sonde fluorescente présente sur les coupes à 550 nm, avec un temps d'exposition de 600 ms, grâce à un boîtier d'éclairage fluorescent (X-Cite 120PC Q).

#### D. Microspectroscopie IR

Les coupes collectées sur les lames BaF<sub>2</sub> ont été analysées en spectroscopie IR grâce au microspectromètre équipé d'un détecteur mercure-cadmium-tellure IR (Nicolet iN10, ThermoFisher). L'acquisition s'effectue par transmission, en utilisant un détecteur refroidi sur une gamme spectrale de 675 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  et avec une résolution spectrale de 2  $\text{cm}^{-1}$  nombres d'ondes. On se concentrera sur la zone 900-1780  $\text{cm}^{-1}$ , appelée zone « fingerprint » très riche en informations. Les acquisitions ont été réalisées avec une résolution spatiale de 30  $\mu\text{m}$  x 30  $\mu\text{m}$  inférieure au diamètre des fibres. Différents secteurs se dessinent sur les coupes : une zone identifiable par un halo représentant la partie de la coupe sous la goutte de liquide, une zone à l'extérieur de ce halo et une zone à l'interface des zones précédentes (Figure 7). Des acquisitions ont été réalisées dans ces zones (n=10). Des acquisitions ont également été faites sur le collagène hors du halo et dans le halo (n=10). Enfin, des spectres ont été acquis sur les témoins, dans les fibres et le collagène (n=10). L'étude a été conduite sur les spectres des coupes transversales et longitudinales crues mais seuls les résultats des coupes longitudinales crues sont présentés.



**Figure 7 :** Zone d'acquisition des spectres sur les coupes. La zone non colorée correspond à la partie de la coupe sous la goutte de liquide digestif.

### E. Prétraitements des spectres et Analyse statistiques

Les spectres obtenus par spectroscopie IR ont d'abord été regroupés via le logiciel Spectragryph. Les spectres ont ensuite été prétraités en corrigeant la baseline et en effectuant une normalisation vectorielle sur le logiciel Matlab. Les spectres finaux ont ensuite été traités en utilisant les logiciels Statistica et Unscrambler pour réaliser des ACP (analyse en composantes principales) et des ANOVA (analyse de la variance). Des spectres moyens ont également été calculés pour comparer les groupes.

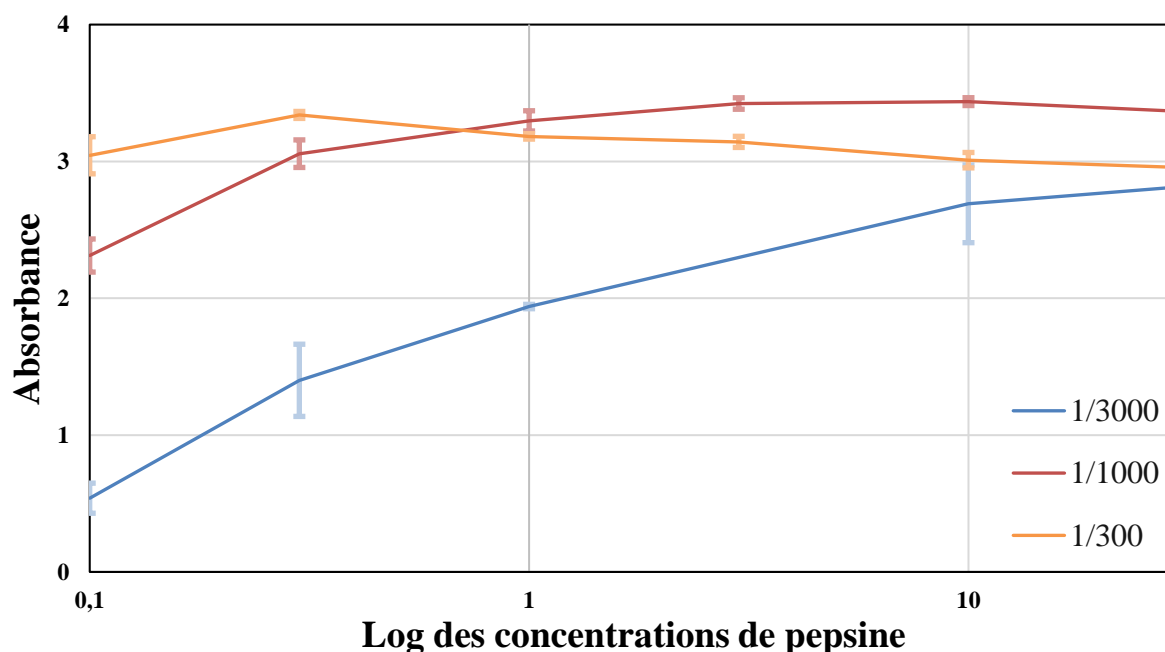
## IV. Résultats et discussion

### A. Caractérisation de la diffusion de la pepsine par immunomarquage

Afin de localiser la pepsine directement sur coupe et suivre sa diffusion lors de la digestion, un immunomarquage a été réalisé. Pour cela, la spécificité des anticorps entre eux et avec la pepsine a d'abord été testée.

#### a. Test Elisa

Les résultats du test ELISA ont permis d'attester la bonne spécificité de fixation de l'anticorps à la pepsine et des anticorps entre eux. L'expérience a également permis de montrer que même les plus petites concentrations de pepsine sont détectées par l'anticorps (0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) et qu'une faible concentration d'anticorps (1/3000) suffit pour mettre en évidence la pepsine (Figure 8). Par ailleurs, les résultats sont davantage cohérents à faible concentration d'anticorps primaire (1/3000). En effet, plus il y a de pepsine dans la cupule, plus il y a d'anticorps qui s'y fixent et plus il y a une coloration des cupules et donc d'absorbance. Pour la dilution à 1/300 de l'anticorps, les résultats ne sont pas cohérents puisque l'absorbance diminue quand la concentration en pepsine augmente.

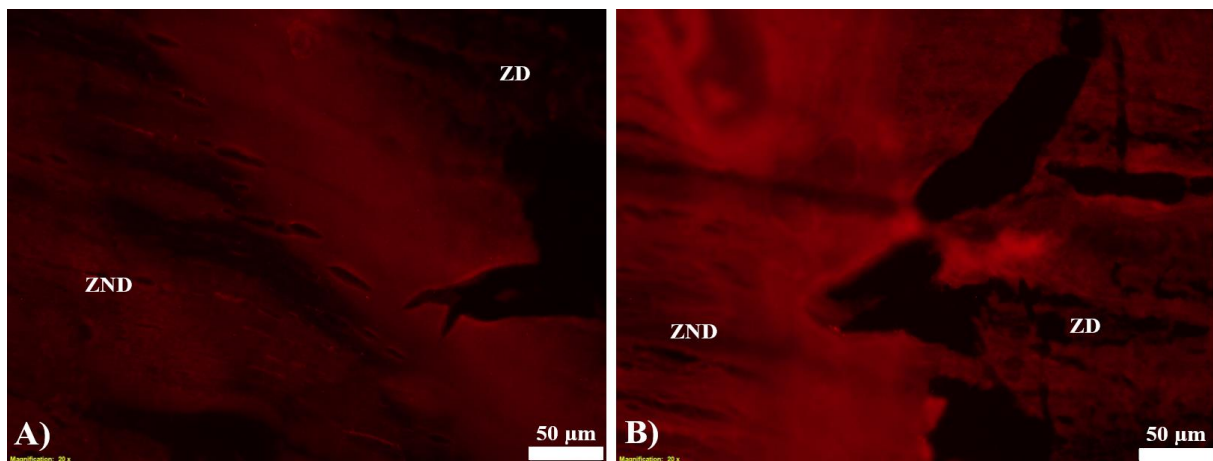


**Figure 8** : Graphique des moyennes des absorbances en fonction de la concentration en pepsine et en anticorps primaire (légende). Les résultats présentés sont des moyennes des 4 répliques pour chacune des concentrations en pepsine. Les écarts types sont représentés sous forme de barres d'erreurs pour chaque point.



### b. Immunomarquage de la pepsine

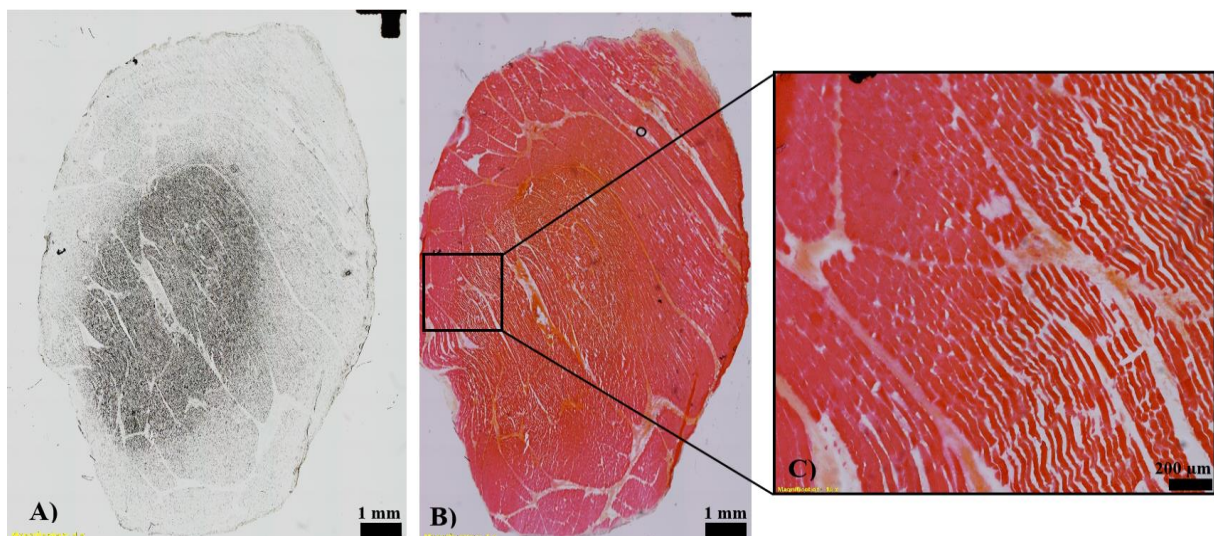
L'immunomarquage indirect doit mettre en évidence la pepsine par fluorescence sur une coupe de viande préalablement digérée. Grâce à la microscopie, nous avons été en mesure de voir de la fluorescence sur les coupes mais nous n'avons pas pu mettre en évidence la pepsine. En effet, la fluorescence était très faible et identique sur les témoins et les tests quelle que soit la concentration de pepsine sur la coupe (Figure 9). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de marquage de la pepsine. Le collagène possède notamment des propriétés d'autofluorescence qui faussent les résultats (Lutz et al., 2012). De plus, le pH acide du SGF impacte la structure des protéines musculaires en entraînant leur dénaturation ce qui a pu engendrer davantage de liaisons non spécifiques avec les anticorps primaires et créer de la fluorescence non spécifique. Enfin, lors du protocole d'immunomarquage, les lames ont été lavées dans des bains successifs ce qui pourraient extraire la pepsine de la coupe dans le bain de lavage.



**Figure 9** : Immunomarquage de coupes digérées 2h à 37 °C par la pepsine (3 mg/mL). A) coupe témoin sans anticorps primaire. B) coupe avec anticorps primaire. (ZD : zone digérée ; ZND : zone non digérée).

## B. Caractérisation de la diffusion de la pepsine dans un bloc de viande

Pour se rapprocher de la réalité, des blocs de viande ont été digérés et analysés pour identifier les zones impactées par la pepsine et en déduire sa diffusion. Sur les coupes, non colorées et colorées à l'HES, un halo est visible (Figure 10A et B). Ce dernier est maximal au centre du bloc et absent aux extrémités. A l'extérieur du halo, le diamètre des cellules semble plus grand que celui des cellules à l'intérieur du halo. Au contraire, l'espace intercellulaire de la zone extérieure au halo est moindre par rapport à celui dans la zone du halo Figure 10C. Le gonflement des myofibrilles est dû à la dénaturation des myosines, solubles à faible pH (Offer and Knight, 1988). Le halo dessiné serait donc lié à la pénétration du SGF (pH 2) dans le bloc de muscle. Au bout de 2h de digestion, le SGF diffuse par les extrémités du bloc mais n'atteint pas le cœur du bloc (Figure 10A). Les fibres situées au centre de la coupe ne sont pas encore impactées par l'acidité de la solution digestive et ne gonflent pas. Ces observations sont en accord avec la littérature scientifique (Astruc et al., 2014). La diffusion de la solution acide est perceptible par cette méthode au contraire de la diffusion de la pepsine. Aucun marqueur de digestion, comme des ruptures de fibres, n'est visible. Les résultats suggèrent une digestion par les extrémités et les fragments digérés qui tombent au fond de la boîte de pétri. Le bloc restant à la fin des 2h d'incubation correspondrait à la fraction non digérée. De plus, quand les blocs sont cryofixés ils ne sont pas tout à fait cubiques, un surfaçage important du bloc est nécessaire pour obtenir une coupe entière. On peut supposer que l'épaisseur de matière enlevée dépasse la profondeur de diffusion de la pepsine. Enfin, la pepsine étant déposée au fond de la boîte de pétri sa diffusion par capillarité pourrait être insuffisante pour être mise en évidence.



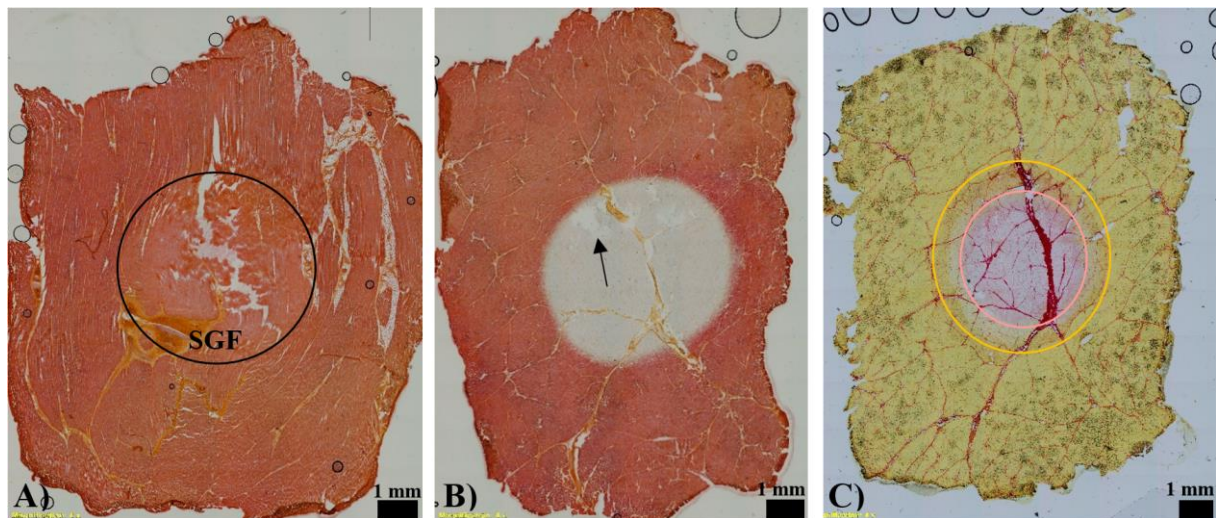
**Figure 10 :** Digestion enzymatique d'un bloc de viande (*Masseter*) dans une boîte de pétri, 2h, 37 °C. A) coupe au cœur du bloc, avec en foncé, la partie non atteinte par le liquide de digestion (pepsine + SGF). B) coupe A) colorée à l'HES. C) zoom de B) sur l'interface avec le halo.

### C. Caractérisation de la diffusion de la pepsine sur coupes de viande crue

Les résultats de digestion de blocs n'étant pas concluants, des digestions sur coupes ont été réalisées et analysées à l'aide de colorations susceptibles de mettre en évidence les zones digérées, pour déterminer le mode de diffusion de l'enzyme. De plus, pour investiguer les changements de structures moléculaires dus à la digestion, des analyses en spectroscopies IR ont été mises en œuvre.

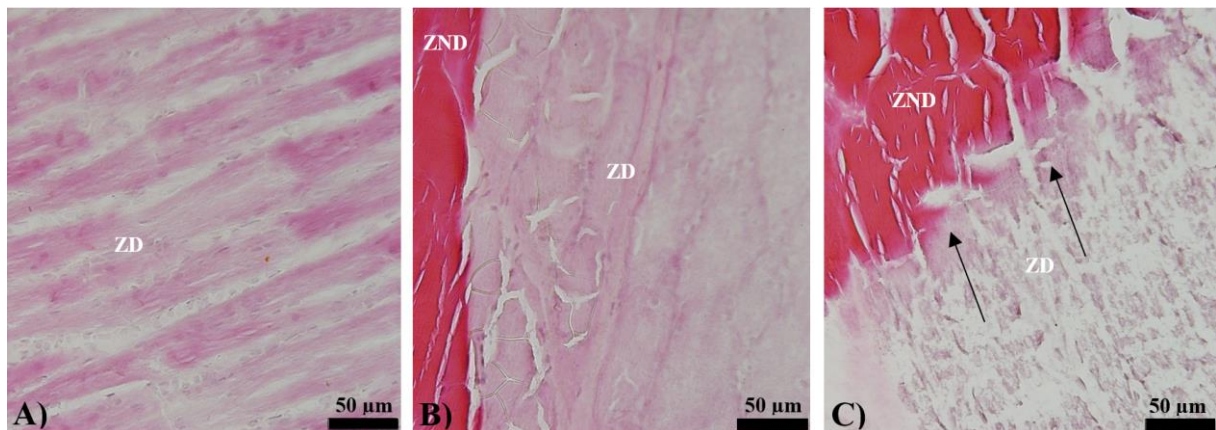
#### a. Digestion des fibres musculaires crues

Sur la coupe témoin SGF ainsi que sur les lames digérées par la pepsine, un halo a pu être identifié laissant apparaître 2 zones principales : la zone centrale décolorée correspondant à la partie située sous la goutte de solution digestive, et la zone externe non décolorée (Figure 11B). Les résultats sont similaires pour les coupes longitudinales et transversales. Pour le témoin SGF après coloration HES, le halo est moins marqué : une légère différence de couleur est observée délimitant alors la zone de diffusion du tampon SGF où les fibres musculaires sont davantage gonflées (Figure 11A). Des essais utilisant d'autres solutions (l'HCl 1M et 0,1M) au pH similaire permettent de confirmer ces résultats qui sont en accord avec ceux obtenus par Astruc et al. (2014b) et Offer and Knight (1985).



**Figure 11** : Coupes transversales crues après digestion (enzymatique ou non) (2h, 37 °C). A) coupe longitudinale témoin avec 10  $\mu$ L de SGF. Le cercle noir entoure la zone où les fibres musculaires sont gonflées. B) coupe transversale avec 10  $\mu$ L de solution de pepsine (5 mg/mL) coloration HES. La flèche noire pointe une zone où les fibres sont absentes. C) coupe transversale avec 10  $\mu$ L de solution de pepsine (5 mg/mL) coloration rouge sirius. Le halo rose encercle les fibres non colorées. Le halo orange regroupe les fibres dont le diamètre semble être supérieur à celui des fibres du reste de la coupe. Le collagène en rouge reste bien visible.

Sur les lames traitées par la pepsine, une décoloration est observable à l'endroit où la goutte a été déposée (Figure 11B et C). Grâce à la coloration rouge sirius, on peut observer deux halos : un halo de digestion où les fibres sont décolorées, et un halo plus grand où les fibres sont gonflées : le SGF diffuse donc plus que la pepsine (Figure 11C). Des digestions, dont la durée varie de 15 min à 4 h, ont notamment montré que la solution digestive, ainsi que le SGF ne diffusaient presque pas après le dépôt de la goutte. Ces résultats sont en accord avec ceux de Offer and Knight (1985) qui ont montré une diffusion de 0.25 mm/h d'une solution d'HCl dans un bloc de viande. Cependant, nous n'utilisons pas la même solution acide et la diffusion se réalise en 2D dans notre cas.



**Figure 12** : Coupes longitudinales crues après digestion enzymatique (2h, 37 °C) et coloration HES. A) fibres musculaires digérées par la pepsine (3 mg/mL). B) fibres musculaires digérées par la pepsine (5 mg/mL). C) fibres musculaires digérées par la pepsine (10 mg/mL). (ZD : zone digérée ; ZND : zone non digérée). Les flèches noires pointent les zones de coupures causées par la pepsine.

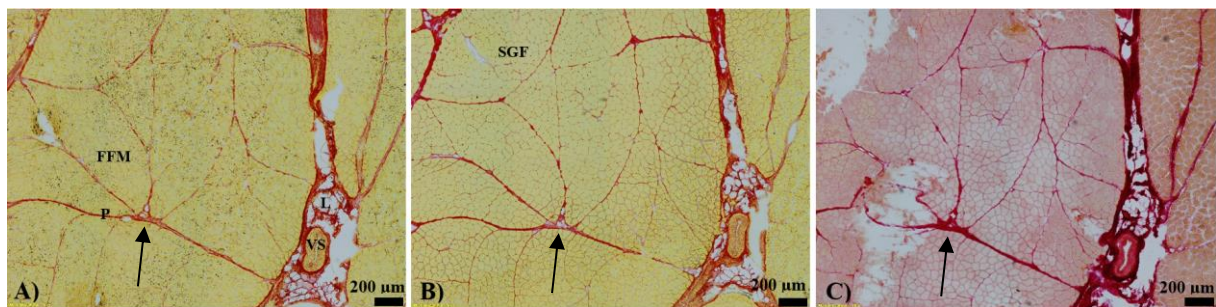
La coloration HES faisant apparaître les protéines des fibres musculaires en rose, on peut supposer que les fibres non colorées sur les coupes digérées (halo) sont dépourvues de ces protéines. Les différentes concentrations de pepsine ont notamment permis de montrer un gradient de décoloration du halo et donc de la concentration en protéines dans les fibres musculaires. Sur la coupe digérée par la pepsine à 3 mg/mL, les fibres sont plus contrastées que sur la coupe digérée à 5 mg/mL qui sont, elles-mêmes, plus contrastées que sur la coupe digérée à 10 mg/mL (Figure 12A, B et C). La digestion semble davantage marquée plus la concentration en pepsine augmente. Ces résultats attesteraient de la bonne efficacité de la pepsine. A l'interface entre les deux zones, des coupures franches sont observées (flèches noires) qui témoignent de l'activité de la pepsine puisque ces marqueurs ne sont pas présents sur les témoins (Figure 12C). Des observations similaires, mais sur les myofibrilles, ont été établies par Kaur et al. (2014) et Astruc (2014b). Cependant, les fibres sont encore distinguables, il reste donc du

matériel protéique qui n'a pas été digéré sur la coupe. On peut émettre l'hypothèse que la pepsine n'ait pas eu accès à toutes les protéines musculaires et qu'elle n'a pas pu tout digérer. En effet, les coupes étant collées sur les lames, il est probable que la partie au contact de la lame n'ait pas été attaquée par la pepsine contrairement au reste de l'épaisseur de la coupe (20 µm).

Néanmoins, des trous dans les coupes où il n'y a plus de matériel sont observé (Figure 11B). Ces trous ne sont pas présents sur les lames témoins. Ils peuvent correspondre à une digestion totale du fragment ou une digestion partielle dont le fragment est tombé dans les bains lors de la coloration. Si les fibres sont digérées, l'adhésion à la lame est peut-être moins forte et les fragments digérés peuvent s'en détacher quand les lames sont plongées dans les bains de coloration.

#### b. Digestion du tissu conjonctif cru

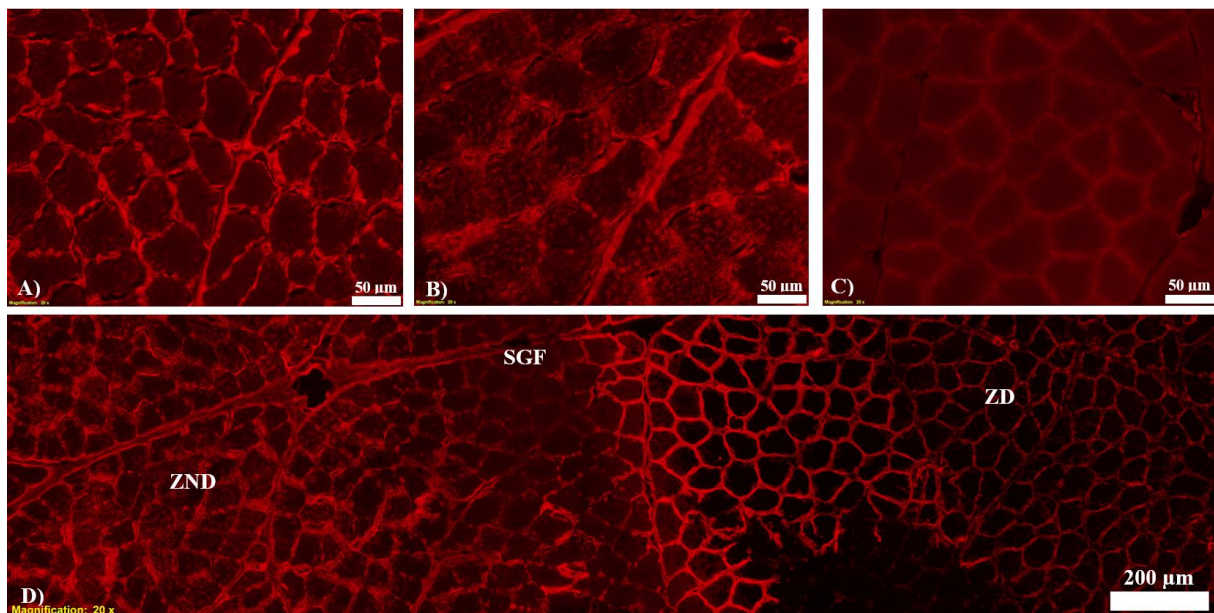
Grâce à la coloration rouge sirius, on peut observer que le collagène, coloré en rouge, est encore bien visible malgré la digestion par la pepsine dans le halo (Figure 13C). Toutefois, l'aspect du périmysium au sein du halo des lames digérées par la pepsine semble différent par rapport au reste de la coupe (Figure 13A, B et C). L'acidité du SGF impacte la structure du collagène et sépare les fibres les unes des autres expliquant peut-être l'aspect plus diffus sur la Figure 13B (Zhang, 2020). Il semblerait également que la pepsine ait un impact sur la structure du collagène puisque les trames apparaissent plus épaisses (Figure 13B). Ces résultats sont applicables à toutes les coupes effectuées, peu importe la quantité de pepsine ajoutée. On remarque que la pepsine n'a pas d'effet sur les lipides comme on pouvait s'y attendre.



**Figure 13** : Coupes transversales crues incubées 2h à 37 °C et colorées au rouge sirius. A) coupe témoin. B) coupe incubée à 37 °C (2h) avec 10 µL de SGF. C) coupe digérée par la pepsine (10 mg/mL). (FFM : faisceaux de fibres musculaires (qui regroupent les fibres entourées de l'endomysium); L : lipides; P : périmysium; VS : vaisseau sanguin). Les flèches noires pointent le périmysium affecté par le SGF et la pepsine.

De plus, les immunomarquages de la laminine ont permis de montrer que cette composante du tissu conjonctif n'était pas non plus totalement digérée par la pepsine. Tout d'abord, une différence d'intensité est observée entre la coupe incubée à température ambiante

et celle à 37°C : les 2 heures de chauffage auraient donc un effet sur la laminine (Figure 14A, B). La structure du tissu conjonctif est impactée par le chauffage à partir de 20°C (Astruc et al., 2012 ; Yu et al., 2017), empêchant en partie, la fixation de l'anticorps primaire à la laminine et expliquant la diminution de fluorescence sur la Figure 14B. Sur la Figure 14D, une forte fluorescence de laminine est visible dans la ZD. Néanmoins 2 zones semblent se différencier par l'intensité de fluorescence au sein de la ZD : la fluorescence est plus faible au centre de la ZD qu'aux extrémités (Figure 14D). Ces résultats donnent l'impression que la laminine est davantage digérée au centre qu'aux extrémités. A l'interface entre la ZD et la ZND, une zone de fluorescence moins forte se rapproche de la fluorescence de la Figure 14C permet de confirmer les résultats obtenus plus haut, à savoir, que le SGF diffuse plus loin que la pepsine. En effet, L'immunomarquage atteste également de la digestion des protéines des fibres musculaires puisqu'on peut voir dans la ZND de la Figure 14D, du matériel, absent dans la ZD.



**Figure 14** : Immunomarquage de laminine sur des coupes transversales de viande crue. A) coupe incubée à Température ambiante (2h). B) Coupe incubée à 37 °C (2h). C) Coupe incubée à 37 °C avec 10 µL de SGF. D) Coupe incubée à 37 °C avec 10 µL de solution de pepsine à 3 mg/mL. (ZD : zone digérée; ZND : zone non digérée; SGF : zone de diffusion du SGF)

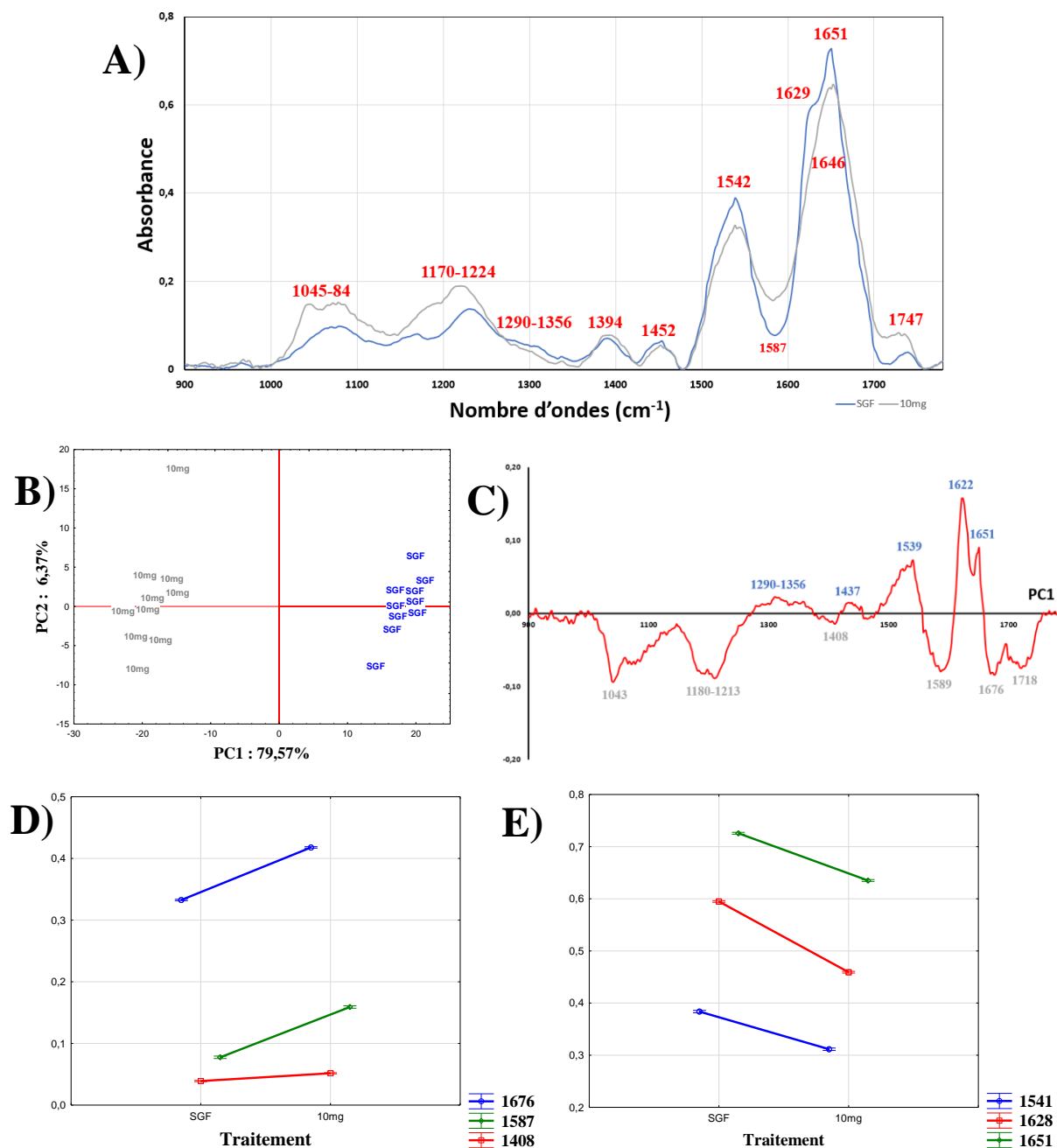
Finalement, les colorations et l'immunomarquage ont mis en avant la digestion prioritaire des protéines des fibres musculaires par rapport aux protéines du tissu conjonctif (collagène, laminine). En effet, les fibres de collagènes sont plus résistantes de par leur structure structure tertiaire et leur composition en acides aminés résistants (Kaur et al., 2010. Les colorations HES et rouge sirius sont donc des colorations pertinentes pour révéler la digestion par la pepsine.

### c. Structure moléculaire de la viande crue digérée

Pour tenter de caractériser la diffusion de la pepsine à l'échelle moléculaire, des acquisitions en microspectroscopie FTIR ont été réalisées dans des cellules musculaires individuelles.

Pour s'intéresser aux seuls effets de la pepsine, les spectres acquis sur la lame témoin SGF et la lame traitée par la pepsine (10 mg/mL) ont été étudiés. Les spectres acquis ont mis en évidence plusieurs nombres d'ondes permettant de discriminer 2 groupes : les fibres digérées par l'acide et celles digérées par la pepsine (Figure 15A). Une ACP a ensuite été réalisée pour étudier la variabilité des signatures spectrales des échantillons (Figure 15B). L'ACP ayant permis d'expliquer 85,95 % de la variabilité du modèle avec 2 composantes principales (PC), les graphiques présentent les résultats avec ces deux PC. Les résultats de l'ACP attestent d'une séparation des échantillons selon la PC1. Les loadings de la PC1 ont donc été exploités : les bandes spectrales situées dans le positif sont corrélées avec les spectres du témoin SGF tandis que les bandes spectrales dans le négatif sont corrélées avec les spectres de la coupe digérée par la pepsine (Figure 15C). L'étude des loadings a permis de mettre en évidence les bandes qui expliquent le plus la variabilité observée. Les bandes identifiées sont considérées comme des biomarqueurs de la digestion. Pour vérifier si les différences spectrales associées à ces biomarqueurs sont significatives, j'ai effectué des tests ANOVA sur les bandes d'intérêt identifiées (Figure 15D et E). Les biomarqueurs principaux identifiés présentent des différences significatives ( $p < 0,0001$ ).

La zone entre 1290 et 1356  $\text{cm}^{-1}$  ainsi que le pic à 1651  $\text{cm}^{-1}$  correspondent à la structure hélice- $\alpha$  des protéines musculaires tandis que les pics à 1622 et 1539  $\text{cm}^{-1}$  sont attribués aux feuilletts bêta. Lors de la digestion, la proportion de ces structures diminue significativement au profit du pic à 1676  $\text{cm}^{-1}$  attribué à un produit issu de la protéolyse de la sérum albumine bovine (BSA) par Güler et al. (2016) (Figure 15D et E). Un changement des pics à 1622 et 1651  $\text{cm}^{-1}$  vers 1646  $\text{cm}^{-1}$  peut-être observé lors de la digestion. Ce phénomène traduit la conversion d'une structure organisée vers une structure secondaire aléatoire. La digestion par la pepsine semble donc rompre les structures secondaires et tertiaires. Des résultats similaires ont été obtenus pour la digestion de la BSA et la  $\beta$ -lactoglobuline par la trypsine (Güler et al., 2011; 2016). Les pics à 1589 et 1408  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant aux  $\text{COO}^-$  libres, absorbent davantage sur la coupe digérée par la pepsine (Figure 15D). Ces composés apparaissent lors de l'hydrolyse des protéines. Les pics aux alentours de 1400  $\text{cm}^{-1}$  et 1589  $\text{cm}^{-1}$  sont donc des marqueurs de digestion. Cette partie de l'étude a donc permis d'identifier un nombre de biomarqueurs d'intérêt qui ont été associés avec l'activité de la pepsine dont la liste est détaillée dans le tableau III.



**Figure 15** : Résultats statistiques des acquisitions dans le halo d'une coupe crue longitudinale incubée à 37 °C (2h) digérée par la pepsine (10 mg/mL) ou par le SGF. A) Spectres moyens des acquisitions selon les traitements. B) ACP : projection des spectres mesurés à l'échelle de cellules individuelles. C) Loadings PC1. D) et E) résultats des ANOVA sur les bandes d'intérêt avec les barres verticales représentant les erreurs-types ( $p < 0,0001$ ).

Le pic à 1048  $\text{cm}^{-1}$ , attribué aux liaisons C=C, C=O, C=N des protéines, augmente lors de la digestion (Figure 15C). Une ACP réalisée sur les acquisitions spectrales des gouttes des liquides digestifs a permis de mettre en évidence des différences liées à la quantité de protéines (Annexe 4). On pourrait attribuer l'augmentation de la bande à 1048  $\text{cm}^{-1}$  à la présence de pepsine sur la coupe test qui n'est pas présente sur la coupe témoin. De plus, les moyennes des



concentrations en pepsine à 3 et 10 mg/mL ont permis de montrer une évolution progressive des bandes citées ci-dessus. La digestion est plus conséquente à 10 mg/mL qu'à 3 mg/mL (Annexe 5). Ces résultats sont également en accord avec les résultats d'histologie. Des résultats secondaires au projet de recherche sont en Annexe 6, 7 et 8.

**Tableau III** : Nombres d'ondes et changements moléculaires associés en spectroscopie IR. Le tableau regroupe les bandes d'intérêt issus de la digestion.

Nombres d'ondes (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
1045-80	C=C, C=O, C=N (Böcker, 2017)
1120	CNH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> (Böcker, 2017)
1180-1213	Déformation des carbohydrates (Kirschner 2004)
1240	Tissu conjonctif (Kohler, 2005)
1300	Hélice- $\alpha$ (Manning, 2005; Motoyama et al., 2018)
1396	COO <sup>-</sup> (Kirschner, 2004; Böcker, 2017)
1539-41	Feuillet bêta parallèle (Pelton et McLean, 2000) Hélice- $\alpha$ (Böcker, 2017)
1575-94	COO <sup>-</sup> (Venyaminov & Kalnin, 1990; Güler et al., 2011; Böcker, 2017)
1622-1630	Feuillet bêta (Kong et Yu, 2007; Carbonaro, 2009 ; Astruc, 2012)
1640-1648	Structure aléatoire (Carbonaro et al., 2011; Güler et al., 2016)
1645	Eau
1651-55	Hélice- $\alpha$ (Kong et Yu, 2007; Astruc, 2012)
1676	Feuillet bêta antiparallèle (Carbonaro, 2009; Kirschner, 2004) Produits issus de la protéolyse (Güler et al., 2016) C=O amide I turns (Pelton et McLean, 2000 ; Böcker, 2017)
1686-94	Agrégation des feuillets bêta (Kohler, 2005; Motoyama et al., 2018)
1745	Ester (Böcker, 2017)

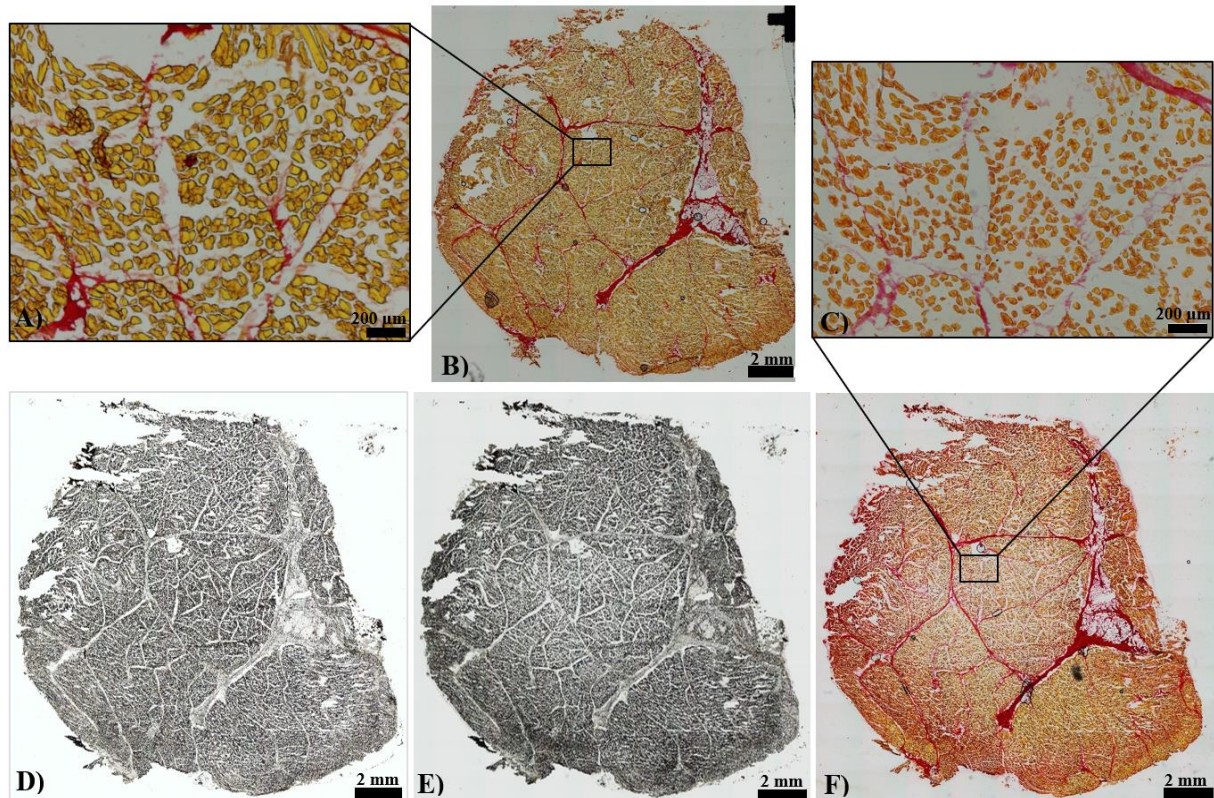
#### D. Caractérisation de la diffusion de la pepsine sur coupe de viande cuite

Une fois les protocoles établis, nous nous sommes intéressés à la viande cuite puisque c'est la forme sous laquelle elle est majoritairement consommée.

##### a. Digestion des fibres musculaires

La cuisson de la viande engendre un rétrécissement du diamètre des fibres musculaires (Figure 16A) en accord avec les résultats de Astruc et al. (2014b). La coloration HES d'une coupe non digérée n'est pas efficace puisque les fibres ne sont pas colorées en rose. Le collagène est néanmoins coloré en jaune. La mauvaise coloration est probablement due à la cuisson à 70°C qui impacte la structure des protéines musculaires et empêche la bonne fixation des colorants aux protéines. Au contraire, la coloration au rouge sirius semble avoir été fonctionnelle sur les témoins (fibres en jaune et collagène en rose) (Figure 16B). La diffusion des 10 µL de solution témoin et digestive déposés sur les coupes est quasi instantanée sur les lames Superfrost Plus. Lors de la cuisson, la viande exsude l'eau qu'elle contient. En effet, le rétrécissement des fibres entraîne l'expulsion de l'eau contenue dans les muscles (Offer, 1984). Les coupes absorbent donc complètement la goutte lors de la digestion. Cependant, ce phénomène n'est pas observé sur les lames BaF<sub>2</sub>. La composition des lames interfère avec la diffusion du liquide.

Sur le témoin SGF, aucun halo de variation de couleur n'est perçu. De plus, à grandissement supérieur, il n'y a pas de gonflement des fibres observé. Le pH aurait peu, voire pas d'influence sur la viande cuite à l'échelle macroscopique. Les protéines étant déjà dénaturées par le chauffage, les effets du pH seraient donc limités. L'effet de la pepsine est également peu marqué à faible concentration (3 mg/mL). La coloration des fibres en rouge est faible, comparé aux résultats de la viande crue, mais se distingue davantage si la concentration en pepsine augmente. Il semblerait que la digestion s'opère par les extrémités puisqu'un changement de couleur vers le rose apparaît au bord de la coupe (Figure 16F). Ces résultats sont en accord avec ceux de Kaur et al. (2014). Cependant, la digestion semble très lente puisqu'après 2h, seules les extrémités sont potentiellement digérées. La digestion de viande cuite est supposée être plus rapide que la viande crue (Bax et al., 2012; Kaur et al., 2014). La diffusion rapide de la goutte lors de la digestion est peut-être à l'origine de ce résultat. En effet, la pepsine diffusant avec le liquide, la concentration en un point de la coupe est plus faible que si la goutte était restée telle quelle comme pour la digestion de la viande crue.



**Figure 5** : coupes de viande cuite à 70 °C et incubée 2h à 37 °C. A) fibres rétrécies par la cuisson et colorée au rouge sirius. B) coupe témoin. C) zoom de F) pour montrer le collagène diffus et l'augmentation de l'espace intercellulaire après digestion. D) coupe avant digestion. E) coupe après digestion par la pepsine (10 mg/mL). F) coupe colorée au rouge sirius.

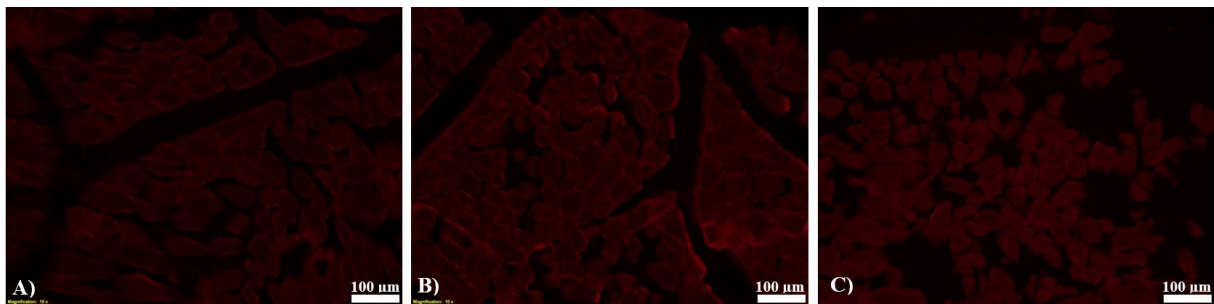
#### b. [Digestion du tissu conjonctif cuit](#)

Au centre des coupes digérées, là où la solution de pepsine a été ajoutée, on observe une augmentation de l'espace intercellulaire mais pas de variation du diamètre des fibres (Figure 16D et E). Baugreet et al. (2019) ont observé une séparation des fibres lors de la digestion gastrique qui pourrait expliquer ce phénomène. Cependant, il semblerait que la matrice extracellulaire composée essentiellement de collagène et de protéoglycanes, ait été digérée par la pepsine (Listrat et al., 2016). En effet, ces résultats observés sur les coupes non colorées, la diminution ou disparition de la matrice ne peut être due aux trempages successifs dans les bains de coloration. Kaur et al. (2014) ont notamment montré la digestion du sarcolemme sur une viande cuite à 100°C et digérée par la pepsine. Zhang et al. (2020) ont par ailleurs mis en avant la digestibilité maximale du collagène une fois cuit à 70°C pendant 30 min. Cependant, ces tests ont été réalisés sur des solutions de collagène et non sur de la viande. La digestion est probablement différente dans une matrice complexe qu'est la viande que dans une solution quasi pure de collagène.

Le pérимыsium est toujours présent après digestion sur la totalité de la coupe (Figure 16C). La structure du tissu conjonctif est tout de même différente par rapport aux échantillons témoins, elle paraît plus diffuse sur les tests. Le pérимыsium serait moins voire non digestible dans une viande cuite à 70°C. Le pérимыsium étant composé d'une quantité plus importante de collagène que l'endomysium (McCormick, 1994), sa digestibilité pourrait être diminuée.

L'immunomarquage de coupe de viande précédemment cuite à 70°C ne permet pas de mettre en évidence la laminine. La fluorescence est identique sur toutes les coupes, les fibres musculaires sont distinguables grâce à l'immunomarquage non spécifique (Figure 17A, B et C). Par cette méthode, il n'est pas possible d'identifier les zones digérées, ni même les zones à pH acide. La fixation des anticorps primaires à la laminine est possiblement empêchée par un changement conformationnel de la protéine dû à la cuisson.

La digestion pourrait se réaliser en deux temps : en premier au centre de la coupe lors du dépôt de la goutte et en second par les extrémités une fois le liquide dispersé.



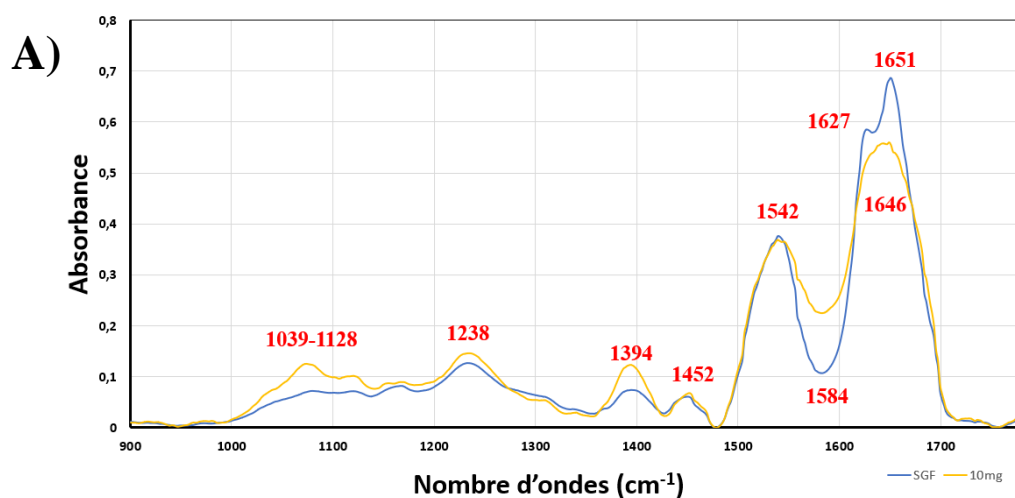
**Figure 17** : immunomarquage de laminine sur des coupes de viande cuite. A) coupe témoin incubée à température ambiante (2h). B) coupe incubée à 37°C (2h) avec 10 µL de SGF. C) coupe incubée à 37°C avec 10 µL de solution de pepsine à 10 mg/mL.

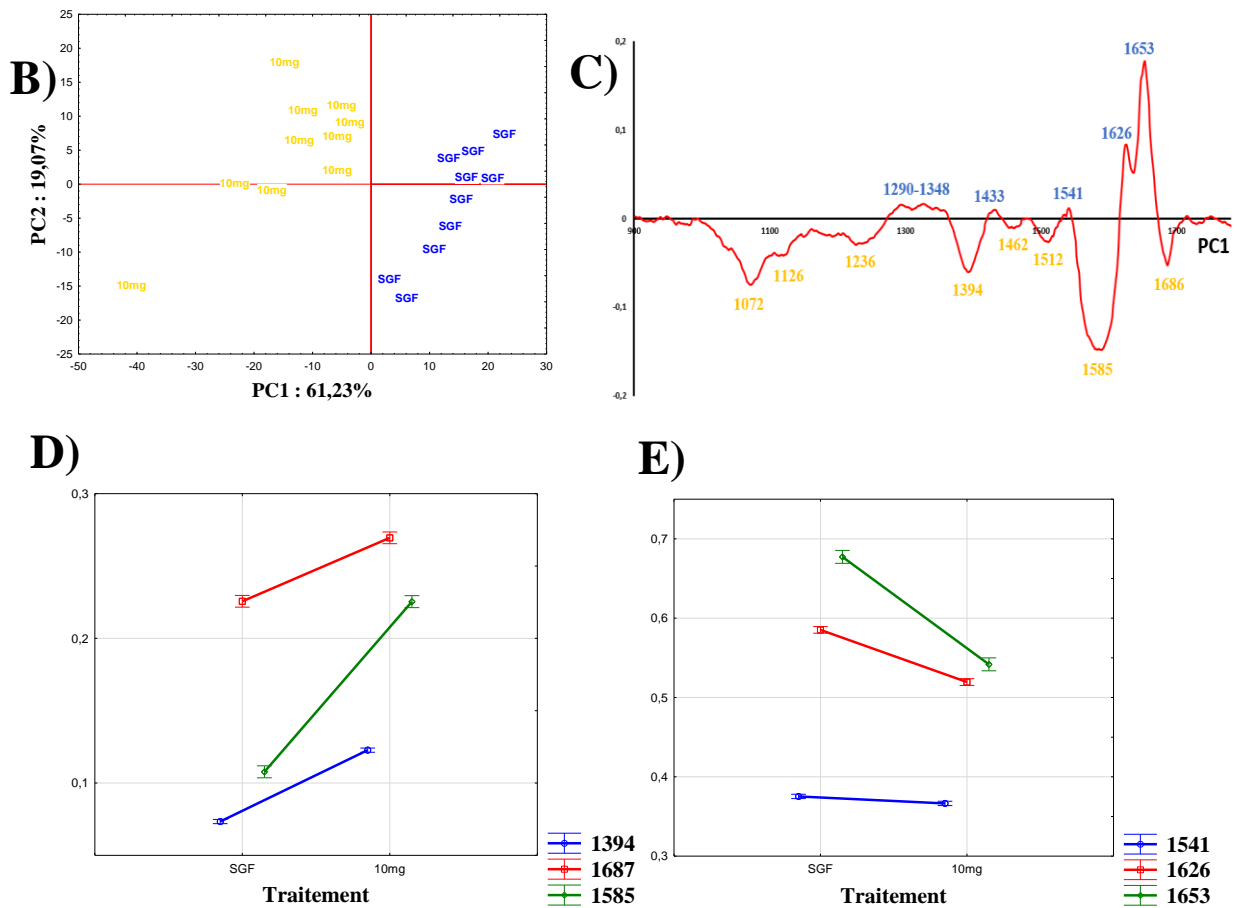
### c. [Structure moléculaire de la viande cuite digérée](#)

Pour caractériser la diffusion de la pepsine à l'échelle moléculaire, des acquisitions spectrales IR ont été réalisées dans des cellules musculaires individuelles. L'effet de la cuisson à 70 °C sur la dénaturation des protéines est connu (Meersman et al., 2002; Torrecillas et al., 2004). Un des résultats principaux est l'augmentation de la proportion de feuillets bêta au profit des hélices alpha. De la même manière que pour les échantillons crus, une différence moléculaire des composants de la coupe selon la localisation qui sont dues au faible pH de la solution est observé (Motoyama et al., 2018).

Pour s'intéresser aux effets seuls de la pepsine, une ACP sur la zone impactée par le SGF de la coupe témoin et sur la zone digérée par la pepsine (10 mg/mL) a été conduite. Les spectres acquis ont mis en évidence plusieurs longueurs d'ondes permettant de discriminer 2 groupes : les fibres digérées par l'acide et celles digérées par la pepsine (Figure 18A). Une ACP

a été réalisée pour étudier la variabilité (et la distribution) des échantillons et pour expliquer 80,3 % de la variabilité, seulement 2 PC sont nécessaires (Figure 18B). Les résultats de l'ACP attestent d'une séparation des échantillons selon la PC1. L'étude des loadings de la PC1 a permis de mettre en évidence les bandes qui expliquent le plus la variabilité observée. Ces bandes sont considérées comme des biomarqueurs de la digestion. Pour vérifier si les différences spectrales associées à ces biomarqueurs sont significatives, j'ai effectué des tests ANOVA sur les bandes d'intérêt identifiées (Figure 18D et E). Les biomarqueurs principaux identifiés présentent des différences significatives ( $p < 0,0001$ ). La zone entre  $1290$  et  $1348 \text{ cm}^{-1}$  ainsi que le pic à  $1653 \text{ cm}^{-1}$  correspondent à la structure hélice- $\alpha$  des protéines musculaires tandis que les pics à  $1626$  et  $1541 \text{ cm}^{-1}$  sont attribués aux feuillets beta. Lors de la digestion, la proportion de ces structures diminue et le pic caractéristique de l'agrégation des feuillets bêta ( $1686 \text{ cm}^{-1}$ ) augmente significativement (Figure 18D et E). Un changement du pic à  $1626$  et  $1653 \text{ cm}^{-1}$  vers  $1646 \text{ cm}^{-1}$  est visible lors de la digestion. Ce phénomène traduit la conversion d'une structure organisée vers une structure secondaire aléatoire. La digestion par la pepsine semble donc rompre les structures secondaires et tertiaires et provoquer l'agrégation de certaines protéines musculaires (Güler et al., 2011, 2016). Les pics à  $1394$  et  $1585 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux  $\text{COO}^-$  libres (issus de de l'hydrolyse des protéines) absorbent significativement plus sur la coupe digérée par la pepsine (Figure 18D). Le pic à  $1048 \text{ cm}^{-1}$  qui augmente lors de la digestion a été expliqué avant par la présence de la pepsine qui croît avec la concentration. Cette partie de l'étude a donc permis d'identifier un nombre de biomarqueurs d'intérêt qui ont été associés avec l'activité de la pepsine.





**Figure 18** : Résultats statistiques des acquisitions dans le halo d'une coupe cuite transversale incubée à 37 °C (2h) digérée par la pepsine (10 mg/mL) ou par le SGF. A) Spectres moyens des acquisitions selon les traitements. B) ACP : projection des spectres mesurés à l'échelle de cellules individuelles. C) Loadings PC1. D) et E) résultats des ANOVA sur les bandes d'intérêt avec les barres verticales représentant les erreurs-types ( $p < 0,05$ ).

## V. Conclusion

Les études menées ont permis d'identifier des méthodes et techniques de localisation de la pepsine indirectement en observant ses effets sur la matrice alimentaire. Les résultats diffèrent selon la structure de la viande : la cuisson à 70°C sous-vide engendre des modifications structurales des protéines qui impacte la digestibilité (Bax et al., 2012).

Les analyses histologiques ont mis en avant l'efficacité des colorations hématoxyline éosine, safran et rouge sirius pour identifier les zones digérées sur des coupes de viandes crues. Ces méthodes laissent apparaître une zone non colorée, associée à la digestion des protéines sur les coupes. Cependant, sur la viande cuite, l'identification est plus difficile. Les protéines sont modifiées par la cuisson et sont moins réactives aux colorants. L'enzyme semble diffuser plus rapidement dans la viande cuite qui absorbe le liquide digestif. La pepsine a besoin du SGF pour diffuser et digérer les protéines.

La microspectroscopie IR a donné des résultats sensiblement identiques sur les échantillons crus et cuits. Des biomarqueurs témoignant de la digestion des protéines ont été identifiés à 1400  $\text{cm}^{-1}$  et 1590  $\text{cm}^{-1}$ . Cela a permis de confirmer les conclusions tirées grâce à l'histologie sur la diffusion de la pepsine : la zone sous la goutte de liquide digestif est bien une zone digérée. Les acquisitions sur le collagène ont permis de mettre en évidence les mêmes biomarqueurs que pour les fibres attestant sa bonne digestion. Néanmoins, la quantification n'a pas pu être établie pour renseigner sur une digestion probablement plus importante des fibres musculaires par rapport aux fibres de collagène.

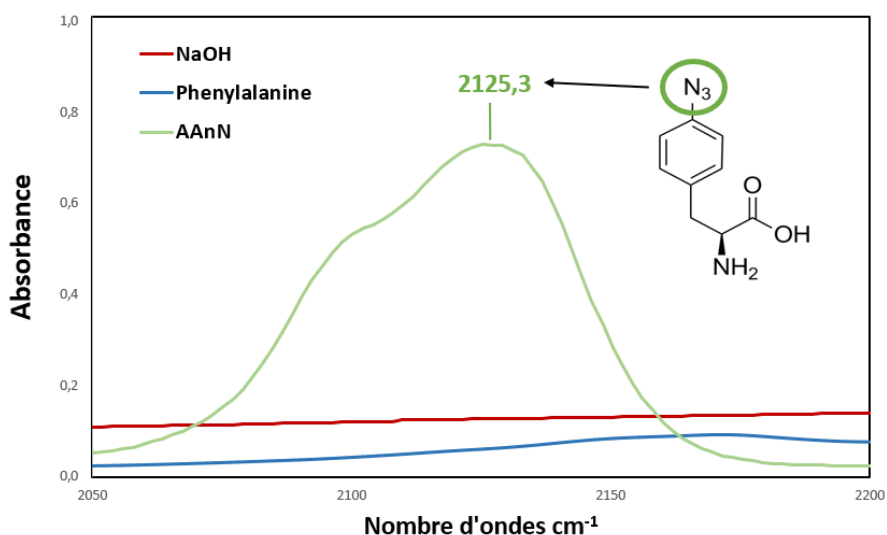
Ces méthodes nous ont permis d'établir une diffusion plus aléatoire et localisée pour la viande crue et une digestion en deux temps (par les extrémités et le centre) pour la viande cuite. Les résultats, laissant paraître que la viande cuite est digérée plus lentement que la viande crue, sont en contradiction avec la littérature (Santé-Lhoutellier et al., 2008; Bax et al., 2012). De plus, ces méthodes nous ont permis de montrer que les fibres musculaires sont digérées préférentiellement au collagène qui est légèrement digéré. Un effet concentration en pepsine a pu être observé, plus il y a d'enzymes digestives sur la coupe, plus les protéines sont digérées.

Ce protocole possède tout de même des limites puisque la digestion orale n'est pas prise en compte ce qui pourrait impacter la diffusion de la pepsine. De plus, les digestions se font sur des coupes quasiment en 2D qui s'éloignent de la réalité. Enfin, l'histologie ne nous permet pas d'identifier pleinement les parties digérées sur la viande cuite.

A long terme, l'étude de la digestion in vitro des aliments permet d'identifier des procédés de transformation qui optimise la digestibilité des aliments. Cela permet de proposer des aliments plus adaptés aux personnes présentant des troubles digestifs.

## VI. Perspectives

L'étude de l'activité et la diffusion de la pepsine peut encore être approfondie. La pepsine utilisée lors de mon stage est une enzyme d'origine porcine et bien qu'elle soit proche structurellement de celle de l'Homme, les résultats peuvent différer. Pour se rapprocher de la réalité, l'institut de biotechnologies de Toulouse a travaillé sur la fabrication d'une pepsine recombinante, semblable à la pepsine humaine, à l'aide d'*E.Coli*. L'unité de laboratoire a réussi à produire la pepsinogène A3 qui donne des résultats d'activité comparables à l'enzyme humaine. Afin de visualiser cette pepsine dans les matrices alimentaires, un acide aminé non naturel (AAnN), une phénylalanine possédant un groupement azoté ( $N_3$ ) supplémentaire, a été introduit dans la séquence protéique (Figure 19). Cet AAnN est réactif avec une molécule fluorescente qui pourra être visualisée au microscope et permettre de suivre la pepsine sur une matrice alimentaire (Sahli J., 2021). De plus, le groupement azoté de l'AAnN possède une signature infrarouge spécifique à  $2125,3\text{ cm}^{-1}$  (Figure 19). La correspondance entre le pic et le groupement azoté a été confirmée par les travaux de Ye et al (2009). Cependant, ce groupement spécifique est le lieu de fixation du fluorochrome. Il faudrait donc vérifier si cette fixation influencerait le spectre de l'AAnN. Dans le cas où le pic serait toujours présent, il serait possible de localiser directement la pepsine sur une coupe par spectroscopie IR en réalisant une cartographie.



**Figure 19** : Spectres obtenus par IR pour la phénylalanine, la soude et l'AAnN. Un pic est présent à  $2125,3\text{ cm}^{-1}$  correspondant au groupement triazoté de la phénylalanine non naturelle (AAnN).



# Bibliographie

1. Astruc, T. 2014a. « CONNECTIVE TISSUE: STRUCTURE, FUNCTION, AND INFLUENCE ON MEAT QUALITY ». In *Encyclopedia of Meat Sciences*, 321-28. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00186-0>.
2. ———. 2014b. « Muscle Structure and Digestive Enzyme Bioaccessibility to Intracellular Compartments ». In *Food Structures, Digestion and Health*, 193-222. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404610-8.00007-4>.
3. ———. 2018. « Analyse multi-échelle des produits carnés par imageries multimodale et multispectrale ». *Agroalimentaire*, septembre. <https://doi.org/10.51257/a-v1-f4030>.
4. Astruc, T., Gatellier P., Labas, R., Santé Lhoutellier, V., et Marinova. P., 2010. « Microstructural Changes in m. Rectus Abdominis Bovine Muscle after Heating ». *Meat Science* 85 (4): 743-51. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.035>.
5. Astruc, T., Peyrin, F., Vénien, A., Labas, R., Abrantes, M., Dumas, P., et Jamme, F., 2012a. « In Situ Thermal Denaturation of Myofibre Sub-Type Proteins Studied by Immunohistofluorescence and Synchrotron Radiation FT-IR Microspectroscopy ». *Food Chemistry* 134 (2): 1044-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.012>.
6. Bailey, A.J., Light, N.D.,. 1989. « Connective Tissue in Meat and Meat Products ». Elsevier Applied Science, London.
7. Baugreet, S., Gomez, C., Auty, M. A. E., Kerry, J. P., Hamill, R. M., & Brodtkor, A. (2019). In vitro digestion of protein-enriched restructured beef steaks with pea protein isolate, rice protein and lentil flour following sous vide processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 54,152–161.
8. Bax, M.L., Aubry, L., Ferreira, C., Daudin, J.D., Gatellier, P., Rémond,D., et Santé-Lhoutellier, V., 2012. « Cooking Temperature Is a Key Determinant of in Vitro Meat Protein Digestion Rate: Investigation of Underlying Mechanisms ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (10): 2569-76. <https://doi.org/10.1021/jf205280y>.
9. Bejerholm, C., Tørngren, M. A., & Aaslyng, M. D. 2014. Cooking of meat | cooking of meat. In M. Dikeman, & C. Devine (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences* (p. 370–376) (2ème ed.). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00187-2>.
10. Böcker, U., S.G. Wubshet, D. Lindberg, N.K. Afseth. 2017. Fourier-transform infrared spectroscopy for characterization of protein chain reductions in enzymatic reactions. *The Analyst*, 142 (15), pp. 2812-2818, [10.1039/c7an00488e](https://doi.org/10.1039/c7an00488e)
11. Boland, M. 2016. « Human Digestion - a Processing Perspective ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (7): 2275-83. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7601>.
12. Boland, M., Golding M., et Singh, H., éd. 2014. *Food Structures, Digestion, and Health*.

Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.

13. Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., et al. 2019. « INFOGEST Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion ». *Nature Protocols* 14 (4): 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
14. Campos, L.A., et Sancho, J., 2003. « The Active Site of Pepsin Is Formed in the Intermediate Conformation Dominant at Mildly Acidic PH ». *FEBS Letters* 538 (1-3): 89-95. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00152-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00152-2).
15. Carbonaro, M., P. Maselli, et A. Nucara. 2012. « Relationship between Digestibility and Secondary Structure of Raw and Thermally Treated Legume Proteins: A Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic Study ». *Amino Acids* 43 (2): 911-21. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1151-4>.
16. Carbonaro, M., et A. Nucara. 2010. « Secondary Structure of Food Proteins by Fourier Transform Spectroscopy in the Mid-Infrared Region ». *Amino Acids* 38 (3): 679-90. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0274-3>.
17. Cascella M., Micheletti C., Rothlisberger U., Carloni P. 2005. « Evolutionarily conserved functional mechanics across pepsin-like and retroviral aspartic pro- teases », 2005.
18. Centre d'étude et de valorisation des algues. 2004. « Biodisponibilité : guide pour l'étude de la biodisponibilité des nutriments alimentaires », 8.
19. Chian, F.M., Kaur, L., Oey, I., Astruc, T., Hodgkinson, S., et Boland, M. 2019. « Effect of Pulsed Electric Fields (PEF) on the Ultrastructure and in Vitro Protein Digestibility of Bovine Longissimus Thoracis ». *LWT* 103 (avril): 253-59. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.005>.
20. Cooper, J.B., Khan, G., Taylor, G., Tickle, I.J., and Blundell, T.L., 1990. « X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. » *J. Mol. Biol.* 214: 199–222.
21. Davey, C. L., & Gilbert, K. V. 1974. Temperature-dependant toughness in beef. *Journal of Science Food and Agriculture*, 25, 931.
22. de Lamballerie-Anton, M., Delepine, S., & Chapleau, N. 2002. « High-pressure effect on meat and lupin protein digestibility. » *High Pressure Research* 22: 649-52. <https://doi.org/10.1080/08957950212419>.
23. Dufour E., Bertrand D., 2006. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. 2ème édition. Paris : Lavoisier, pagination multiple (Sciences et Techniques agroalimentaires).
24. Dunn, Ben M. 2003. « Structure and Mechanism of the Pepsin-Like Family of Aspartic Peptidases ». *ChemInform* 34 (6). <https://doi.org/10.1002/chin.200306266>.

25. Ertbjerg, P., et E. Puolanne. 2017. « Muscle Structure, Sarcomere Length and Influences on Meat Quality: A Review ». *Meat Science* 132 (octobre): 139-52. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.261>.
26. Findlay, C. J., Parkin, K. L., & Stanley, D. W. 1989. Differential scanning calorimetry can determine kinetics of thermal denaturation of beef muscle proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 10, 1–15.
27. Gautel, M., et K. Djinović-Carugo. 2016. « The Sarcomeric Cytoskeleton: From Molecules to Motion ». Édité par Stan L. Lindstedt et Hans H. Hoppeler. *Journal of Experimental Biology* 219 (2): 135-45. <https://doi.org/10.1242/jeb.124941>.
28. Goode, M. R., Cheong, S. Y., Li, N., Ray, W. C., & Bartlett, C. W. 2014. « Collecte et d'extraction de l'ADN de la salive pour le séquençage de prochaine génération ».
29. Güler, G., E. Džafić, M.M. Vorob'ev, V. Vogel, et W. Mäntele. 2011. « Real Time Observation of Proteolysis with Fourier Transform Infrared (FT-IR) and UV-Circular Dichroism Spectroscopy: Watching a Protease Eat a Protein ». *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 79 (1): 104-11. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.01.055>.
30. Güler, G., M.M. Vorob'ev, V. Vogel, et W. Mäntele. 2016. « Proteolytically-Induced Changes of Secondary Structural Protein Conformation of Bovine Serum Albumin Monitored by Fourier Transform Infrared (FT-IR) and UV-Circular Dichroism Spectroscopy ». *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 161 (mai): 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.02.013>.
31. Hamm, R. 1977. Changes of muscle proteins during the heating of meat. In T. Ho"yem & O. Kva"le (Eds.), *Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing* (p. 101–134). Applied Science Publishing.
32. Herriott, Roger M., 1962. « Pepsinogen and Pepsin ». *The Journal of General Physiology* 45 : 57-76.
33. Kajak-Siemaszko, K., L. Aubry, F. Peyrin, M.-L. Bax, P. Gatellier, T. Astruc, W. Przybylski, D. Jaworska, B. Gaillard-Martinie, et V. Santé-Lhoutellier. 2011. « Characterization of Protein Aggregates Following a Heating and Freezing Process ». *Food Research International* 44 (10): 3160-66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.043>.
34. Kaur, L., T. Astruc, A. Vénien, O. Loison, J. Cui, M. Irastorza, et M. Boland. 2016. « High Pressure Processing of Meat: Effects on Ultrastructure and Protein Digestibility ». *Food & Function* 7 (5): 2389-97. <https://doi.org/10.1039/C5FO01496D>.
35. Kaur, L., E. Maudens, D.R. Haisman, M.J. Boland, et H. Singh. 2014. « Microstructure and Protein Digestibility of Beef: The Effect of Cooking Conditions as Used in Stews and Curries ». *LWT - Food Science and Technology* 55 (2): 612-20.

- <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.023>.
36. Kaur, L., Rutherford, S.M., Moughan, P.J., Drummond, L., & Boland, M.J. 2010. Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed using an in vitro gastric digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 : 5068-5073. <https://doi.org/10.1021/jf903332a>
  37. Kiela, Pawel R., et Fayez K. Ghishan. 2016. « Physiology of Intestinal Absorption and Secretion ». *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 30 (2): 145-59. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007>.
  38. Kirschner, C., R. Ofstad, H.-J. Skarpeid, V. Høst, et A. Kohler. 2004. « Monitoring of Denaturation Processes in Aged Beef Loin by Fourier Transform Infrared Microspectroscopy ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (12): 3920-29. <https://doi.org/10.1021/jf0306136>.
  39. Kohler, A., C. Kirschner, A. Oust, et H. Martens. 2005. « Extended Multiplicative Signal Correction as a Tool for Separation and Characterization of Physical and Chemical Information in Fourier Transform Infrared Microscopy Images of Cryo-Sections of Beef Loin ». *Applied Spectroscopy* 59 (6): 707-16. <https://doi.org/10.1366/0003702054280649>.
  40. Kong, J., et S. Yu. 2007. « Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures ». *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39 (8): 549-59. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>.
  41. Lana, A., et L. Zolla. 2016. « Proteolysis in Meat Tenderization from the Point of View of Each Single Protein: A Proteomic Perspective ». *Journal of Proteomics* 147 (septembre): 85-97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.011>.
  42. Leclaire, Stéphane. 2008. « Digestion et absorption des nutriments ». *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 43 (1): 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(08\)70279-7](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(08)70279-7).
  43. Lee, Seonmin. 2021. « Improvement of Meat Protein Digestibility in Infants and the Elderly ». *Food Chemistry*, 11.
  44. Listrat, A., B. Lebret, I. Louveau, T. Astruc, M. Bonnet, L. Lefaucheur, B. Picard, et J. Bugeon. 2016. « How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality ». *The Scientific World Journal* 2016: 1-14. <https://doi.org/10.1155/2016/3182746>.
  45. Lutz, V., M. Sattler, S. Gallinat, H. Wenck, R. Poertner, F. Fischer, 2012. « Characterization of fibrillar collagen types using multi-dimensional multiphoton laser scanning microscopy ». *International Journal of Comestic Science* (34) : 209-215. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00705.x>
  46. Manning, Mark Cornell. 2005. « Use of Infrared Spectroscopy to Monitor Protein

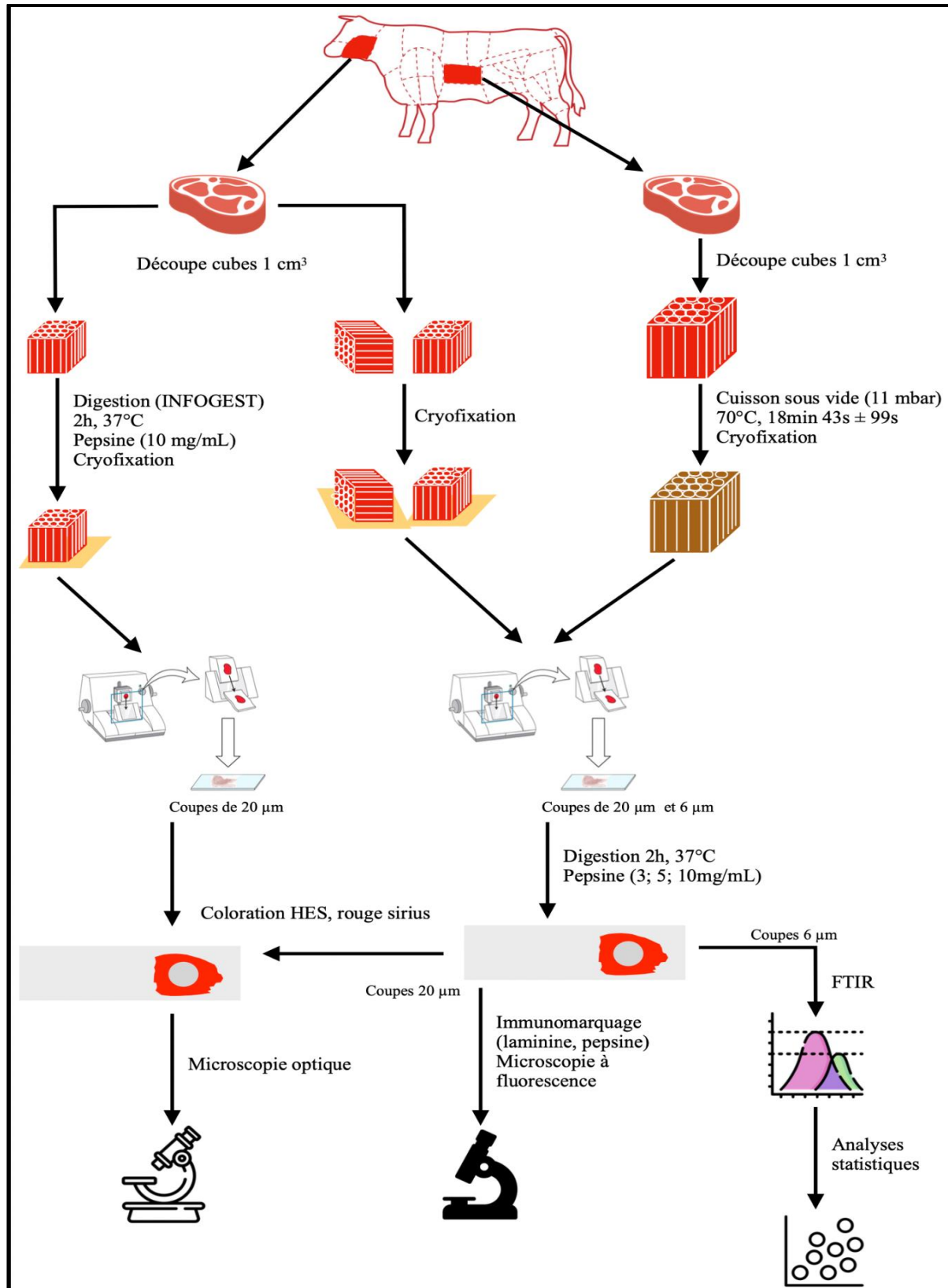
- Structure and Stability ». *Expert Review of Proteomics* 2 (5): 731-43. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.5.731>.
47. McCormick RJ. 1994. The flexibility of the collagen compartment of muscle. *Meat Sci* 36:79–91.
  48. McMillan, Kay S., Anthony G. McCluskey, Annette Sorensen, Marie Boyd, et Michele Zagnoni. 2016. « Emulsion Technologies for Multicellular Tumour Spheroid Radiation Assays ». *The Analyst* 141 (1): 100-110. <https://doi.org/10.1039/C5AN01382H>.
  49. Meersman, F., Smeller, L., & Heremans, K. (2002). Comparative Fourier transform infrared spectroscopy study of cold-, pressure-, and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin. *Biophysical Journal*, 82(5), 2635–2644.
  50. Minekus, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113–1124 (2014).
  51. Mohseni-Shahri, Fatemeh S., Farid Moeinpour, et Masoumeh Nosrati. 2018. « Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulation Study on the Interaction of Sunset Yellow Food Additive with Pepsin ». *International Journal of Biological Macromolecules* 115 (août): 273-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.080>.
  52. Monogioudi, E., G. Faccio, M. Lille, K. Poutanen, J. Buchert, et M.L Mattinen. 2011. « Effect of Enzymatic Cross-Linking of  $\beta$ -Casein on Proteolysis by Pepsin ». *Food Hydrocolloids* 25 (1): 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.007>.
  53. Motoyama, M., A. Vénien, O. Loison, C. Sandt, G. Watanabe, J. Sicard, K. Sasaki, et T. Astruc. 2018. « In Situ Characterization of Acidic and Thermal Protein Denaturation by Infrared Microspectroscopy ». *Food Chemistry* 248 (mai): 322-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.031>.
  54. Northrop, D., 2001. *Account of Chemical Research*, 34, 790.
  55. Nutrixeal Info, 2022. Collagène. Consulté le 6 Mai 2022 à l'adresse suivante <https://nutrixeal-info.fr/index/collagène/>
  56. Nutrixeal Info, 2021. Suc gastrique : caractéristiques et rôles biologiques. Consulté le 1er Novembre 2021 à l'adresse suivante <https://nutrixeal-info.fr/index/suc-gastrique/>
  57. Offer, G., & Knight, P. (1988). The structural basis of water-holding in meat. Part 1: General principles and water uptake in meat processing. In R. Lawrie (Ed.), *Developments in meat science – 4* (pp. 63). London: Elsevier Applied Science.
  58. Offer, G, et Knight, P, The structural basis of water-holding in meat. 1985. In R. Lawrie Ed, *Development in Meat Science*, Vol. 4, pp. 150-152. London: Elsevier Applied Science.
  59. Offer, G. 1984. Progress in the biochemistry, physiology and structure of meat. In *Proceedings of the 30th European meeting of meat research workers*, Bristol, UK (p. 87).

60. Pedersen, Am, A Bardow, S Beier Jensen, et B Nauntofte. 2002. « Saliva and Gastrointestinal Functions of Taste, Mastication, Swallowing and Digestion: Saliva and Gastrointestinal Functions ». *Oral Diseases* 8 (3): 117-29. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x>.
61. Pelton, J. T., & McLean, L. R. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry*, 277(2), 167–176.
62. Piper, D W, et B H Fenton. 1965. « PH Stability and Activity Curves of Pepsin with Special Reference to Their Clinical Importance. » *Gut* 6 (5): 506-8. <https://doi.org/10.1136/gut.6.5.506>.
63. Purslow, Peter P. 2018. « Contribution of Collagen and Connective Tissue to Cooked Meat Toughness; Some Paradigms Reviewed ». *Meat Science* 144 (octobre): 127-34. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.03.026>.
64. Rajiv H., F. Toro, C.R. Tombazzi. 2021. « Physiology, Pepsin ». *Stat Pearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537005/>.
65. Ravikumar, K. M., & Hwang, W. (2008). Region-specific role of water in collagen unwinding and assembly. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 72(4), 1320–1332. <https://doi.org/10.1002/prot.22026>.
66. Richter, C., T. Tanaka, et R.Y. Yada. 1998. « Mechanism of Activation of the Gastric Aspartic Proteinases: Pepsinogen, Progastricsin and Prochymosin ». *Biochemical Journal* 335 (3): 481-90. <https://doi.org/10.1042/bj3350481>.
67. Sams, L., J. Paume, J. Giallo, et F. Carrière. 2016. « Relevant PH and Lipase for in Vitro Models of Gastric Digestion ». *Food & Function* 7 (1): 30-45. <https://doi.org/10.1039/C5FO00930H>.
68. Santé-Lhoutellier, V., T. Astruc, P. Marinova, E. Greve, et P. Gatellier. 2008. « Effect of Meat Cooking on Physicochemical State and in Vitro Digestibility of Myofibrillar Proteins ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (4): 1488-94. <https://doi.org/10.1021/jf072999g>.
69. Sayd, T., C. Chambon, et V. Santé-Lhoutellier. 2016. « Quantification of Peptides Released during in Vitro Digestion of Cooked Meat ». *Food Chemistry* 197 (avril): 1311-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.020>.
70. Sinkovits, A.F., B.C. Bryksa, T. Tanaka, et R.Y. Yada. 2007. « Understanding the Structure–Function Role of Specific Catalytic Residues in a Model Food Related Enzyme: Pepsin ». *Enzyme and Microbial Technology* 40 (5): 1175-80. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.029>.
71. Supaphon, P., S. Kerdpi boon, A. Vénien, O. Loison, J. Sicard, J. Rouel, et Thierry Astruc. 2021. « Structural Changes in Local Thai Beef during Sous-Vide Cooking ». *Meat Science* 175 (mai): 108442. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108442>.

72. Suwareh, O., D. Causeur, J. Jardin, V. Briard-Bion, S. Le Feunteun, S. Pezenec, et F. Nau. 2021. « Statistical Modeling of in Vitro Pepsin Specificity ». *Food Chemistry* 362 (novembre): 130098. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130098>.
73. Tornberg, E. 2005. « Effects of Heat on Meat Proteins – Implications on Structure and Quality of Meat Products ». *Meat Science* 70 (3): 493-508. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.11.021>.
74. Torrecillas, A., Corbalan-Garcia, S., & Gomez-Fernandez, J. C. (2004). An infrared spectroscopic study of the secondary structure of protein kinase C alpha and its thermal denaturation. *Biochemistry*, 43(8), 2332–2344.
75. Venyaminov, S. Y., & Kalnin, N. N. (1990). Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H<sub>2</sub>O) solutions. 1. Spectral parameters of amino-acid residue absorption-bands. *Biopolymers*, 30(13–14), 1243–1257.
76. Ye, S., Huber, T., Vogel, R. *et al.* FTIR analysis of GPCR activation using azido probes. *Nat Chem Biol* **5**, 397–399 (2009). <https://doi.org/10.1038/nchembio.167>
77. Yu, T.Y., J.D. Morton, S. Clerens, et J.M. Dyer. 2017. « Cooking-Induced Protein Modifications in Meat : Cooking-Induced Protein Modifications... ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (1): 141-59. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12243>.
78. Zhang, M., D. Zhao, S. Zhu, Y. Nian, X. Xu, G. Zhou, et C. Li. 2020. « Overheating Induced Structural Changes of Type I Collagen and Impaired the Protein Digestibility ». *Food Research International* 134 (août): 109225. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109225>.

# Annexes

## Annexe 1 : plan expérimental





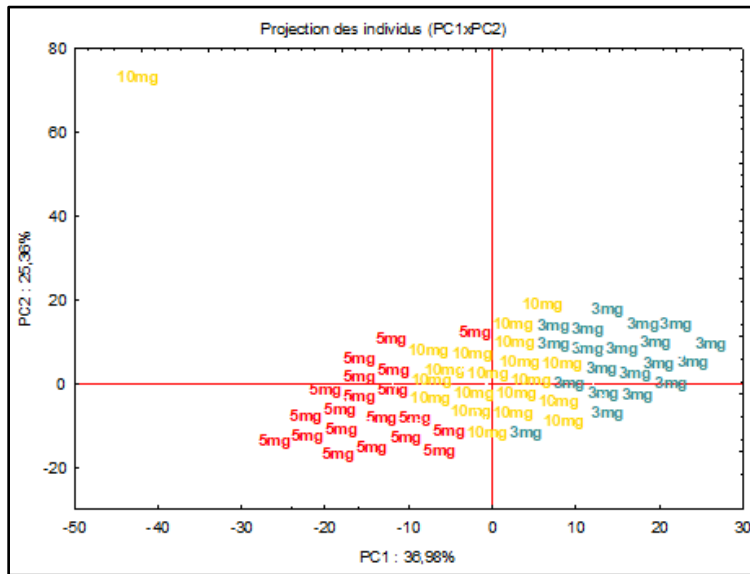
**Annexe 2** : Tableau récapitulatif des effectifs des échantillons (MF : microscopie à fluorescence  
MO : microscopie optique)

Echantillons	Digestion	Microtome	Immunohistochimie	Observation	Nombre de coupes
Bloc de viande crue (1 cm <sup>3</sup> )	Boite de pétri (INFOGEST) : Pepsine (10 mg/mL) dans SGF + témoin SGF => cryofixation	Coupes de 20 µm tous les 100 µm	HES	MO	12 (6/bloc)
Bloc de viande crue (1 cm <sup>3</sup> ) transversale	Digestion 2h sur coupe (4 séries) 3 témoins : témoin 20°C, témoin 37°C, témoin SGF 37°C 3 tests : pepsine 3 mg/mL, pepsine 5 mg/mL, pepsine 10 mg/mL	Coupes de 20 µm	HES	MO	6
			Rouge Sirius	MO	6
			Immunomarquage laminine	MF	12
Bloc de viande crue (1 cm <sup>3</sup> ) longitudinale	Digestion 2h sur coupe (4 séries) 3 témoins : témoin 20°C, témoin 37°C, témoin SGF 37°C 3 tests : pepsine 3 mg/mL, pepsine 5 mg/mL, pepsine 10 mg/mL	Coupes de 6 µm (BaF <sub>2</sub> )	IR	Spectres	6
			HES	MO	6
			Rouge Sirius	MO	6
Bloc de viande cuite (1 cm <sup>3</sup> ) transversale	Digestion 2h, 37°C sur coupe (2 séries) 1 témoin : SGF 3 tests : pepsine 0,01 mg/mL, pepsine 0,5 mg/mL, pepsine 3 mg/mL	Coupes de 20 µm	Immunomarquage pepsine	MF	8
			IR	Spectres	6
			HES	MO	6
Bloc de viande cuite (1 cm <sup>3</sup> ) transversale	Digestion 2h sur coupe (4 séries) 3 témoins : témoin 20°C, témoin 37°C, témoin SGF 37°C 3 tests : pepsine 3 mg/mL, pepsine 5 mg/mL, pepsine 10 mg/mL	Coupes de 6 µm (BaF <sub>2</sub> )	Rouge Sirius	MO	6
			Immunomarquage laminine	MF	12
			IR	Spectres	6

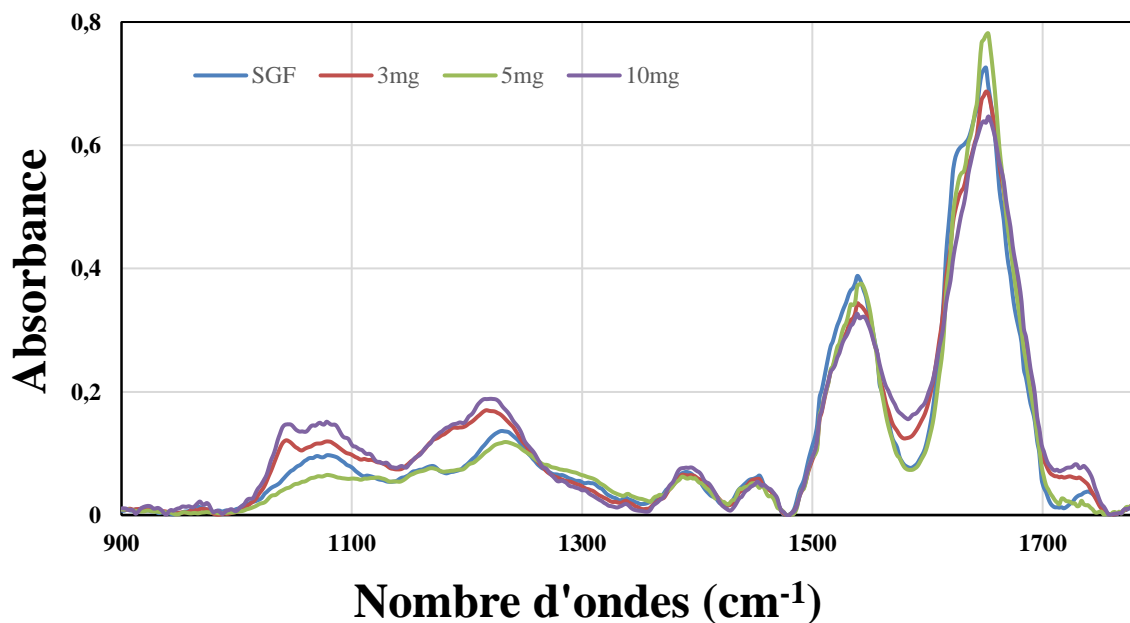
**Annexe 3** - Tableau des Volumes de solutions mères utilisés pour produire 400 mL de fluide simulé.

Sels minéraux	Concentrations solutions mères		Quantité de solution mère nécessaire pour préparer 0.4 L (FSS) (ml)	Concentration minérale finale dans FSS (mM)	Quantité de solution mère nécessaire pour préparer 0.4 L (FGS) (ml)	Concentration minérale finale dans FGS (mM)
	(g/L)	(M)				
KCl	37.3	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0.5	3.7	3.7	0.9	0.9
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	6.8	13.6	12.5	25
NaCl	117	2	-	-	11.8	47.2
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30.5	0.15	0.5	0.15	0.4	0.12
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5
HCl		6	0.09	1.1	1.3	15.3
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	44.1	0.3	0.025	1.5	0.005	0.15

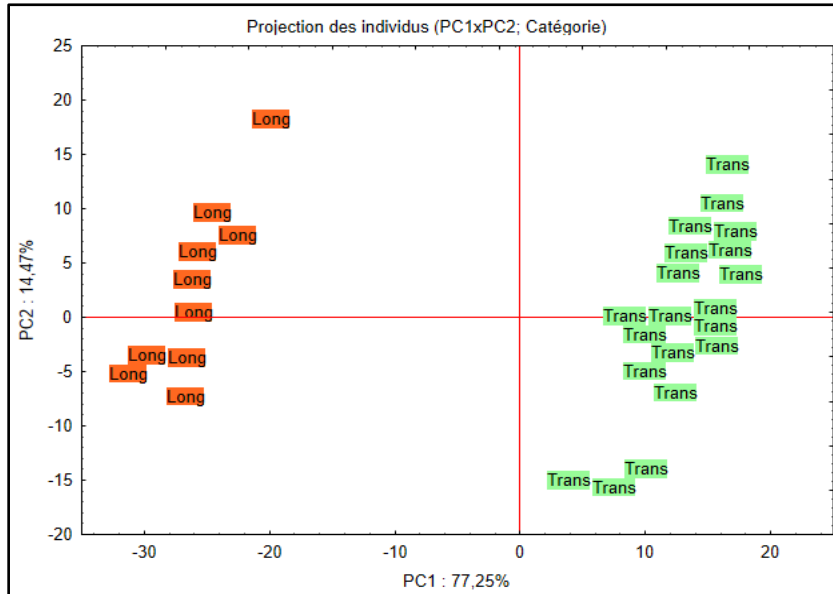
**Annexe 4** : ACP des spectres acquis sur des gouttes de liquide de digestion (concentration en pepsine 3 ; 5 ; 10 mg/mL) déposée sur des lames BaF<sub>2</sub>.



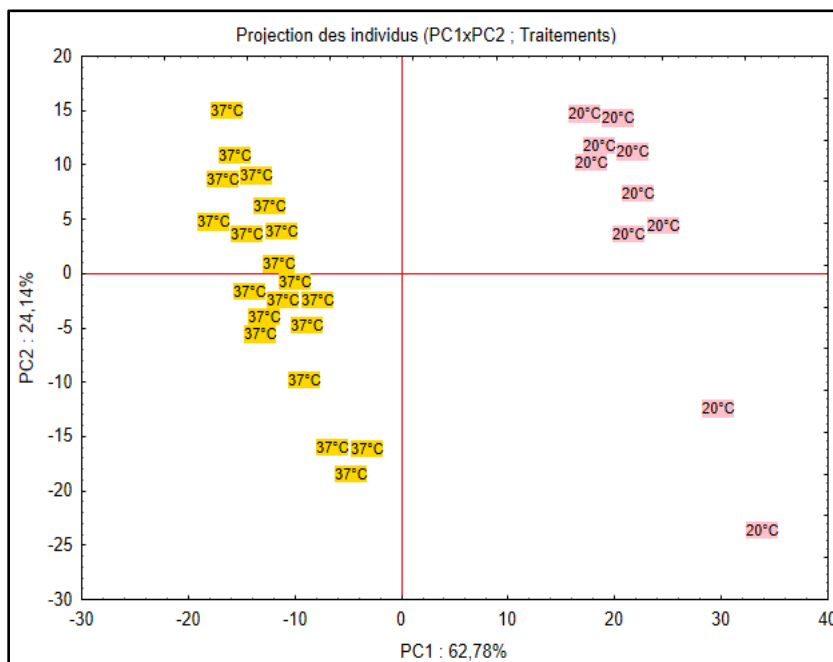
**Annexe 5** : ACP coupes crues longitudinales incubées à 37 °C (2h) et digérées par la pepsine (3; 5; 10 mg/mL) ou par le SGF. L'ACP sépare bien les échantillons selon leurs traitements. Ces différences peuvent être dues à la quantité de protéines (pepsine) sur la coupe. Les courbes montrent une évolution progressive selon la concentration utilisée, plus il y a de pepsine, plus les différences avec les biomarqueurs identifiés sont importantes. Néanmoins, la valeur pour la concentration à 5 mg/mL ne sont pas cohérentes. De plus, ces résultats sont en contradiction avec les résultats d'histologie.



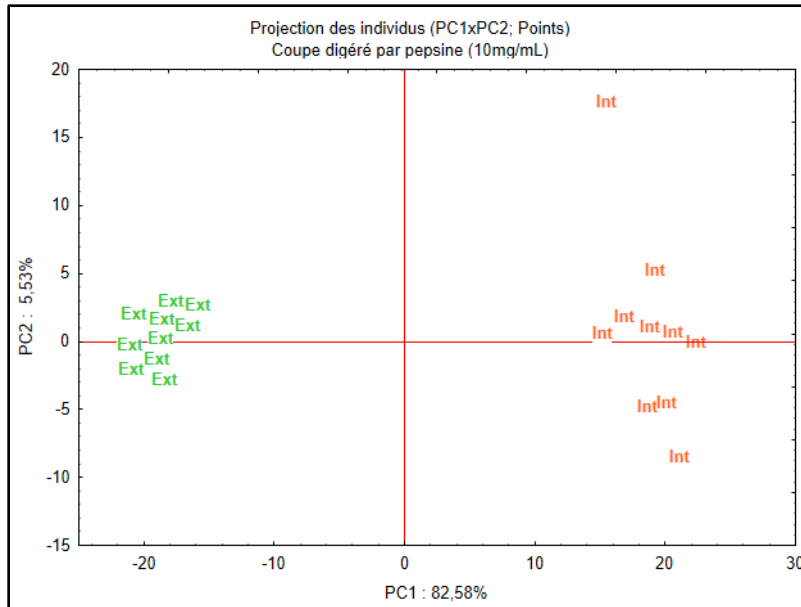
**Annexe 6** : ACP de coupes crues longitudinales et transversales incubées à 20 °C (2h). Deux PC (expliquant 91,72 % la variabilité des échantillons) séparent les groupes selon l'orientation des fibres. On suppose que la quantité de protéines en un point n'est pas la même selon l'orientation des fibres.





**Annexe 7** : ACP de coupes crues longitudinales incubées à 20 °C ou 37 °C (2h). Une séparation entre les témoins incubés à 37 °C et 20 °C par la PC1, expliquant 86,92 % de la variabilité des échantillons, est notable. Ces résultats sont en accord avec Astruc et al. (2012) et confirment les constatations observées par l'immunomarquage.



**Annexe 8** : Résultats statistiques de la coupe longitudinale crue digérée par la pepsine (10 mg/mL). Projection des spectres sur 2 PC expliquant 88,11 % de la variabilité. (Ext : extérieur du halo de digestion ; Int : intérieur du halo de digestion). Une différence moléculaire des composants de la coupe selon la localisation est notable. Certaines de ces différences sont dues au faible pH de la solution qui dénature les protéines en les déroulant (Motoyama et al., 2018).



 	Diplôme : Ingénieure Oniris, Master 2 NSA
Auteure : Joanne HOLTZER	Structure d'accueil : INRAE
Nombre de pages : 61    Annexes : 8	Adresse : Saint Genès Champanelle
Année de soutenance : 2022	Maître de stage : Thierry ASTRUC
<b>Titre</b> : Localisation et effets de la pepsine dans la viande digérée <i>in vitro</i>	
<b>Title</b> : Localisation and effects of pepsin in <i>in vitro</i> digested meat	
<p><b>Résumé</b> : La viande est une source de protéines à haute valeur nutritionnelle. Durant la digestion, ces protéines sont majoritairement digérées par la pepsine dans le compartiment gastrique. Cependant, les mécanismes de la pepsine sont encore assez méconnus. Pour mieux comprendre le rôle joué par la composition et l'organisation de la structure de la viande sur la diffusion et l'action de la pepsine, des méthodes d'histologie et de spectroscopie infrarouge ont été mises en œuvre. Une approche innovante de digestion enzymatique sur coupe histologique de viande crue et cuite révèle l'action de la pepsine par une décoloration de la zone digérée de la coupe qui permet de localiser indirectement l'enzyme de par ses effets sur la structure du muscle. Les résultats suggèrent une digestion prioritaire des fibres musculaires comparativement au collagène. La diffusion de l'enzyme semble facilitée dans la viande cuite mais la digestion des protéines est plus élevée dans la viande crue. Des analyses en composantes principales sur les spectres IR font apparaître des biomarqueurs de la digestion. Une bande d'intérêt à 1400 cm<sup>-1</sup> (COO<sup>-</sup>) augmente après digestion témoignant de l'action protéolytique de la pepsine.</p>	
<p><b>Abstract</b> : Meat is a source of high nutritional value proteins. During digestion, meat proteins are mainly digested by pepsin in the gastric compartment. However, the mechanisms of pepsin remain unknown. To better understand the impact of meat composition and structural organisation on pepsin diffusion and activity, histology and infrared spectroscopy were implemented. A novel approach to enzymatic digestion on histological sections of raw and cooked meat revealed pepsin activity from located discoloration in the non-digested areas of the section. As a result, it was possible to locate pepsin through its effects on the muscle structure. The results suggest pepsin first digested muscle fibers, and then collagen. The enzyme diffusion seemed to be facilitated in cooked meat whereas protein digestion was higher in raw meat. Principal component analyses on IR spectra helped identify biomarkers of digestion. A band of interest at 1400 cm<sup>-1</sup> (COO<sup>-</sup>) increased after digestion demonstrating the proteolytic action of pepsin.</p>	
<p>Mots-clés : Digestion, pepsine, protéines musculaires, structure, spectroscopie infrarouge, cuisson, microscopie, histologie</p> <p>Key Words: Digestion, pepsin, meat proteins, structure, infrared spectroscopy, cooking, microscopy, histology</p>	