



Impact de l'état de fraîcheur et du salage sur l'ultrastructure et la composition du muscle de truite (*Oncorhynchus mykiss*)

Brayan Castulovich

► To cite this version:

Brayan Castulovich. Impact de l'état de fraîcheur et du salage sur l'ultrastructure et la composition du muscle de truite (*Oncorhynchus mykiss*). Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03720458

HAL Id: hal-03720458

<https://hal.inrae.fr/hal-03720458>

Submitted on 12 Jul 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)

Impact de l'état de fraîcheur et du salage sur l'ultrastructure et la composition du muscle de truite (*Oncorhynchus mykiss*)

Par : **Brayan CASTULOVICH**



Institut National de la Recherche Agronomique et de l'environnement

Unité Qualité des Produits Animaux - QuaPA

Centre de Recherches ARA ouest Site de Clermont-Ferrand / Theix

Stage du 3/01/2022 au 30/06/2022

Soutenu à Nantes le : 24/06/2022

Document confidentiel : ~~oui~~ - non

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de l'équipe d'Imagerie & Transfert de m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein de leur équipe. Je tiens tout particulièrement à remercier Arnaud Germond et Thierry Astruc qui ont été des encadrants de qualité tout au long de ces six mois. Merci de m'avoir permis de faire mon stage dans votre équipe et de faire partie du projet INNOSALT, pour votre patience et vos conseils avisés lors de la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier encore Arnaud Germond pour tous les conseils, pour son expertise au quotidien et les conversations partagées tout au long de mon séjour, grâce à ces conseils j'ai pu accomplir mes tâches.

Je tiens à remercier Annie Vénien et Christine Ravel qui, avec patience et sagesse, ont partagé avec moi leur expertise dans différentes techniques de laboratoire.

Bien sûr un grand merci à toute l'équipe de QuaPA pour l'aide et le soutien pendant ces 6 mois. Je tiens à remercier infiniment, Jacques pour ses apports dans les différentes analyses et toute l'équipe pour leur sympathie et encouragements.

Je tiens à remercier mes coéquipiers Joanne Holtzer, Noémie Petit, Guillaume De Briansson, Susana Ribes qui, grâce aux discussions, m'ont appris de nouvelles connaissances.

Merci à vous tous car malgré la barrière de la langue, vous avez su me conseiller et me guider au jour le jour durant cette étape.

Liste des abréviations et acronymes

BaF₂ : fluorure de baryum

ACP : analyse en composantes principales

PC : composantes principales

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

CITPPM : Confédération des industries de traitement des produits des pêches maritimes et de l'aquaculture

MET : microscopie électronique en transmission

QuaPA : Qualité des Produits Animaux

O.C.T. : milieu d'enrobage cryogénique

Liste des figures

Figure 1. Schéma représentant la truite arc-en-ciel après dissection du flanc droit.....	4
Figure 2. Schéma d'un filet de poisson (saumon) en coupe longitudinale.....	4
Figure 3. Schéma de l'organisation et la répartition de la musculature sur une darne (coupe transversale) de truite.....	4
Figure 4. (a) Evolution post-mortem de la capacité de rétention d'eau de la chair de la truite arc-en-ciel, (b) Changements dans l'apparence visuelle.....	5
Figure 5. Spectre électromagnétique.....	12
Figure 6. Localisation dans la truite de chaque échantillon et des morceaux utilisés pour cette étude.....	16
Figure 7. Cryostat Leica CM1950.....	17
Figure 8. Fenêtre du logiciel d'acquisition de Thermoscientific iN10 représentant les coupes, les points choisis lors de l'acquisition et les spectres obtenus.....	18
Figure 9. Ultramicrotome Reichert-Jung Ultracut E.....	20
Figure 10. Photo, manipulation du microscope électronique en transmission Hitachi H-7650.....	20
Figure 11. Moyenne des spectres des échantillons non salés normalisés montrant les temps de J0 à J15.....	22
Figure 12. ACP des cellules de muscles de truites prélevées à J0 (en bleu) et J7 (en rouge) après abattage.....	23
Figure 13. Loadings associé à la PC1 des échantillons non salés.....	24
Figure 14. Boîtes à moustache montrant les différences significatives ($p < 0,05$) entre J0 et J7 dans les bandes 1078, 1246, 1552, 1635, 1654 et 1747 cm^{-1}	27
Figure 15. Coupes semi-fines longitudinales des échantillons non salés à J0, J7 et J15 colorées au bleu de toluidine. Les flèches noires indiquent des ruptures des myofibrillaires, les flèches blanches indiquent une séparation de l'endomysium. Barre d'échelle = $50\text{ }\mu\text{m}$	29
Figure 16. Structure du sarcomère à J0 observée par microscopie électronique. Barre d'échelle = $0.5\text{ }\mu\text{m}$	29
Figure 17. Coupes longitudinales des échantillons non salés au cours du temps post-mortem (sar, sarcomère). Les espaces intermyofibrillaires ont augmenté à J7 et à J15. Barre d'échelle = 500 nm	30
Figure 18. Mitochondries (m) des échantillons non salés à J0, à J7 et à J15. Barre d'échelle = 500 nm	31
Figure 19. Moyenne des spectres de cellules musculaires mesurées sur les échantillons salés aux temps J0 à J15 après abattage.....	32
Figure 20. ACP des échantillons de muscles de truites salées à J0 (en bleu) et à J7 (en rouge).....	33
Figure 21. Loadings associés à la PC1 des échantillons salés.....	34
Figure 22. Graphique montrant les différences entre chaque zone H1, H2, H3 contre la moyenne des spectres.....	35
Figure 23. Graphique montrant les variations d'intensité spectrale à 1654 cm^{-1} (Amide I) et 1747 cm^{-1} (Étirement C=O des esters : acides gras libres) en fonction du temps post-mortem.....	36
Figure 24. Coupes semi-fines longitudinales des échantillons salés colorées au bleu de toluidine à J0, J7 et J15. Barre d'échelle = $50\text{ }\mu\text{m}$	37
Figure 25. Coupes longitudinales des échantillons salés à J0, à J7 et à J15. Z : ligne Z, M : ligne M. Barre d'échelle = $2\text{ }\mu\text{m}$	37
Figure 26. Mitochondries (m) des échantillons salés à J0, J7 et à J15. Barre d'échelle = 500 nm	38

Liste des tableaux

Tableau I. Temps de prélèvement.....	15
Tableau II. Principales bandes identifiées par la méthode d'ACP permettant de distinguer les différences de l'état de fraîcheur de muscle aux temps J0 et J7.....	25
Tableau III. Taille moyenne de sarcomères en coupe longitudinale (μm) mesurée sur une truite. Au total, 50 sarcomères ont été mesurés pour les temps J0, J7, et J15. Les valeurs présentées sont la moyenne $\pm$ l'écart type. Les lettres a, b, c montrent une différence significative entre les échantillons (analyse ANOVA, suivie d'un test post-hoc de Tukey HSD, $p < 0,05$).....	30

Sommaire

Remerciements

Liste des abréviations et acronymes

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

1. INTRODUCTION	1
2. LABORATOIRE D'ACCUEIL	2
3. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
3.1 - Le poisson	3
3.1.1 - La truite	3
3.1.2 - Anatomie générale	3
3.1.3 - Muscle et composition chimique	4
3.1.4 - Evolution post-mortem du muscle	5
3.1.5 - Evaluation de la qualité du muscle	6
3.2 Transformation du poisson dans l'industrie	7
3.2.1 - Les enjeux du salage	7
3.2.2 - Le salage : des techniques de salage	7
3.2.2.1 - Le salage à sec	7
3.2.2.2 - Le salage en saumure (ou salage humide)	7
3.2.2.3 - L'injection de saumure	8
3.2.3 - Effet du temps post-mortem sur la qualité du salage	8
3.2.4 - Effet du sel sur la composition et la structure des muscles	9
3.2.4.1 - Dénaturation des protéines	9
3.2.4.2 - Solubilité des protéines	9
3.2.4.3 - Augmentation de la protéolyse	10
3.3 - La microscopie : un atout pour comprendre les modifications structurales et chimiques du muscle	10
3.3.1 - Microscopie électronique	11
3.3.2 - Microscopie spectroscopie Infrarouge (imagerie vibrationnelle : pour avoir une cartographie de l'effet indirect du sel sur les filets)	12
4. MATERIEL ET METHODES	15
4.1 - Mesures par microspectroscopie infrarouge	17
4.1.1 - Préparation des coupes cryofixées	17
4.1.2 - Microspectroscopie infrarouge	17
4.2 - Microscopie électronique en transmission	19

4.2.1 - Préparation des résines.....	19
4.2.2 - Préparation de coupes au microtome.....	19
4.2.3 - Observation et acquisition des images.....	20
4.2.4 - Analyse des images.....	20
4.3 - Microscopie optique.....	21
4.4 - Analyses statistiques	21
5. RESULTATS ET DISCUSSION.....	22
5.1 - Evolution de la composition chimique des muscles de truite selon l'état de fraîcheur	22
5.2 - Variations de la structure du muscle au cours du temps post-mortem.....	28
5.3 - Effet du salage sur la composition et la structure du muscle de truite.....	32
5.3.1 - Effet de la structure et de la composition sur la diffusion du sel	35
5.3.2 - Effet du salage sur la structure du muscle.....	36
5.4 - Comparaison des structures sur les échantillons salés et non salés.	38
6. CONCLUSION ET PERPECTIVES.....	39
7. BIBLIOGRAPHIE	40
8. ANNEXES.....	45

1. INTRODUCTION

La consommation de poisson est en augmentation depuis plus de 20 ans et atteignait 24 kg/an/habitant en 2017. Depuis plusieurs décennies, la France est l'un des acteurs majeurs, avec l'Italie et le Danemark, de l'élevage de truites arc-en-ciel en eau douce. (France AgriMer, 2020) Le poisson est une denrée rapidement périssable dont la qualité est étroitement liée à son état de fraîcheur.

Les industriels de la transformation des produits de la mer font face à une importante variabilité de leur matière première qui dépend des dates et lieu d'approvisionnement. Cette variabilité est susceptible d'impacter les procédés de transformation ou la qualité des produits finis (Candogan *et al.* 2021). Pour caractériser cette variabilité, les industriels de la transformation peuvent solliciter les scientifiques, qui sont à même de fournir une expertise sur la structure et la composition des produits durant toute la chaîne de transformation.

Le projet INNOSALT, co-financé par le CITPPM, vise à caractériser et optimiser le processus de transformation des salmonidés dans le but d'obtenir une meilleure homogénéité du salage et d'améliorer ainsi la qualité du produit, mais aussi pour limiter la quantité de sel dans les effluents et réduire l'impact sur l'environnement.

Le muscle est composé principalement de protéines myofibrillaires et ce contenu est plus élevé chez les poissons (60-80%) que chez les mammifères (40%). La structure des myofibrilles semble évoluer moins rapidement chez le poisson que chez les mammifères terrestres (Delbarre-Ladrat *et al.* 2006), mais la littérature scientifique sur le sujet est très limitée. Cependant, l'évolution postmortem ne se juge pas aux seules ruptures myofibrillaires. Les objectifs de mon stage étaient 1) de caractériser l'évolution structurale et physicochimique du muscle de poisson au cours du temps après abattage et 2) de vérifier si l'état de fraîcheur, et donc la structure et la composition du muscle, influence son évolution au salage.

2. LABORATOIRE D'ACCUEIL

L'INRAE, l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement est né le 1er janvier 2020. Il est issu de la fusion entre INRA, Institut National de la Recherche Agronomique et IRSTEA, Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture. Dans le cadre de la fusion INRA-IRSTEA, 2 nouveaux centres de recherche ont été créés en région Auvergne-Rhône-Alpes. Le Centre Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes rassemble les unités situées sur le territoire auvergnant, réparties sur 8 sites et 20 unités. Le stage s'est déroulé dans L'unité Qualité des Produits Animaux, QuaPA, qui est rattachée au département TRANSFORM (Processus de transformation de matières organiques alimentaires et produits biosourcés ; valorisation des résidus de l'activité humaine).

Dans l'unité QuaPA 2 axes porteurs sont privilégiés : le première est la conception raisonnée d'aliments carnés spécifiques (par exemple pour les personnes âgées), et le second concerne l'amélioration de la durabilité des systèmes alimentaires dans un contexte de transition alimentaire mondiale, notamment au travers des études sur la sécurité chimique des produits, la limitation de pertes en produits d'origine animale et la valorisation de la biomasse issue des coproduits animaux.

L'unité est située sur le site de Theix du Centre INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes. Elle est structurée en trois équipes de recherches disciplinaires : Biochimie et Protéines du Muscle (BPM), Imagerie et Transferts (IT) Microcontaminants, Arômes et Sciences Séparatives (MASS) et deux plateformes : Agro Résonance et Protéomique.

3. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

3.1 - Le poisson

3.1.1 - La truite

La truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, fait partie des salmonidés, terme usuel désignant la famille des Salmonidae qui regroupe trois sous-familles : les *Thymallinae*, les *Coregoninae*, et les *Salmoninae*. La sous-famille des *Salmoninae* regroupe notamment les genres *Salvelinus*, *Salmo* (dont le saumon atlantique *S. salar* et la truite commune *S. trutta*), et *Oncorhynchus* (truite arc-en-ciel et saumon du Pacifique). Le nom commun de la truite arc-en-ciel vient de la bande longitudinale irisée caractéristique sur ses flancs, mais la coloration générale du corps est très variable selon l'âge, le milieu et le stade physiologique. Elle présente la forme fusiforme de la plupart des salmonidés, mais s'en distingue notamment par une bouche moins fendue. C'est l'une des espèces de poissons téléostéens dont l'élevage intensif est le mieux maîtrisé.

La France est le 5^{ème} producteur mondial. Cette production est orientée essentiellement vers la truite de taille portion (250-300 g). On constate actuellement un déplacement de la production de la truite portion vers la truite filet portion (600-800 g) ainsi qu'une diversification vers la grande truite (1,5 kg). L'élevage de truites arc-en-ciel est prépondérant avec une production de 32.000 tonnes (35.152 tonnes en 2009), soit 80 % du tonnage « poissons d'eau douce », pour un chiffre d'affaire (CA) évalué à environ 115 M d'€. Le premier producteur mondial est le Chili avec 220.000 tonnes de poissons élevés (Grasteau, 2016).

3.1.2 - Anatomie générale

La truite arc-en-ciel a une forme allongée, fusiforme avec 60-66 vertèbres, 3-4 épines dorsales, 10-12 rayons mous dorsaux, 3-4 épines anales, 8-12 rayons mous anaux, 19 rayons caudaux. La coloration varie avec l'habitat, la taille, et les conditions de maturité sexuelle. (FAO, 2009)

Les truites arc-en-ciel présentent des tailles variables, ce qui est un facteur important pour les industriels qui souhaitent adapter leur process de salage ; les formes sédentaires mesurent jusqu'à une cinquantaine de centimètres alors que les formes sauvages peuvent atteindre soixante-dix centimètres lorsqu'elles vivent dans des lacs ou migrent vers la mer.

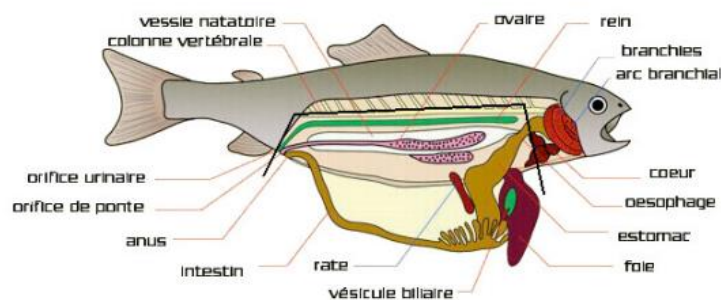


Figure 1. Schéma représentant la truite arc-en-ciel après dissection du flanc droit. (Grasteau, 2016)

3.1.3 - Muscle et composition chimique

Les muscles situés de chaque côté de la colonne vertébrale (les grands latéraux), sont composés de myomères ou myotomes, séparés par une cloison de tissu conjonctif de quelques millimètres d'épaisseur, appelé myosepte ou myocome (Listrat *et al.* 2015).

Cette organisation particulière, avec alternance de feuillets musculaires et conjonctifs, constitue une structure appelée « métamérique ». La forme des myomères chez un poisson « rond » au stade commercial ressemble à un W sur un filet (**Figure 2**), mais cette organisation se révèle plus complexe en coupe transversale (darne) (**Figure 3**).

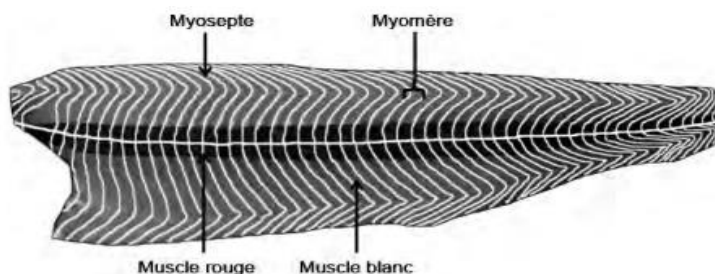


Figure 2. Schéma d'un filet de poisson (saumon) en coupe longitudinale (Listrat *et al.* 2015).

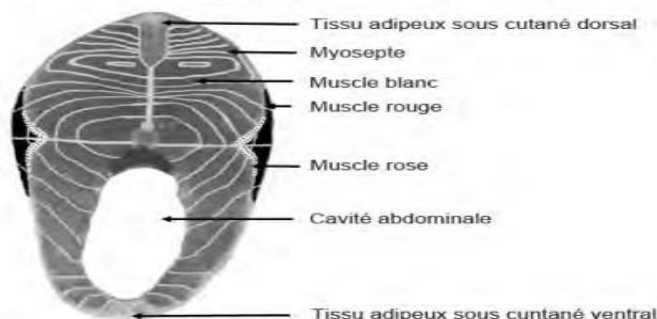


Figure 3. Schéma de l'organisation et de la répartition de la musculature sur une darne (coupe transversale) de truite (Listrat *et al.* 2015).

La composition chimique moyenne de la chair de la truite portion ou filet portion est la suivante : 70 à 80 % d'eau, 15 à 22 % de protéines et 2 à 9 % de lipides ce qui en fait un produit peu gras et riche en protéines (Kiessling *et al.* 1991).

La teneur en eau de la chair de la truite arc-en-ciel portion et filet portion varie de 65 à 80 % du poids frais. La capacité de rétention d'eau diminue au cours de l'installation de la *rigor mortis* puis augmente lors de sa résolution (**Figure 4**). Cette évolution est associée à une augmentation du pH de la chair. Cela traduit des réagencements dans les protéines myofibrillaires au début de phase de maturation (Azam *et al.* 1990). En revanche congeler en pré ou en post-rigor (5 semaines à -20°C) n'a pas d'effet significatif sur la capacité de rétention d'eau.

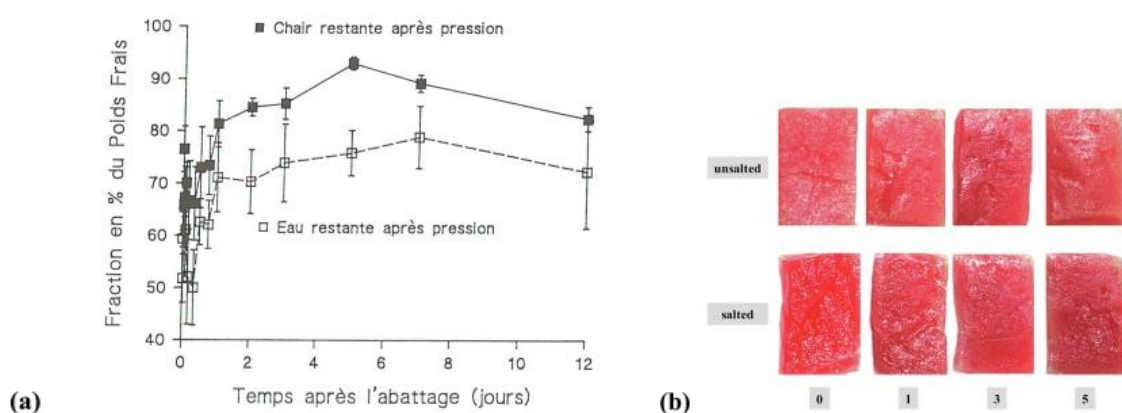


Figure 4. (a) Evolution post-mortem de la capacité de rétention d'eau de la chair de la truite arc-en-ciel (Fauconneau *et al.* 1993a), (b) Changements dans l'apparence visuelle (Jiang *et al.* 2019).

Les protéines présentes dans la chair sont constituées à plus de 60 % par des protéines myofibrillaires. Les composants myofibrillaires présents dans la chair sont peu altérés par la congélation qui provoque d'une part une augmentation de la capacité à extraire des protéines et d'autre part une dégradation partielle des composants comme les chaînes lourdes de la myosine (Leblanc et Leblanc, 1989).

Les lipides présents dans la chair sont localisés dans des tissus adipeux spécifiques : tissu adipeux sous cutané dorsal et tissu adipeux sous cutané abdominal qui sont bien développés chez la truite portion et tissus adipeux intermusculaires dont le développement est plus tardif (Fauconneau *et al.* 1993b). Une partie des lipides est stockée dans les fibres du muscle rouge.

3.1.4 - Evolution post-mortem du muscle

La transformation du muscle après l'abattage est un processus complexe impliquant de nombreux changements biochimiques et physiques. Le tissu musculaire évolue d'un système

extensible et métaboliquement actif vers un système inextensible et où les réactions biochimiques sont restreintes (Bendall, 1973).

Après la mort du poisson, la vitesse de transformation de l'adénosine tri phosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) est plus importante que la capacité de synthèse (réaction de Lohmann et glycolyse anaérobie). Les principales réactions biochimiques qui ont lieu lors de la glycolyse anaérobie sont des dégradations du glycogène et de la phosphocréatine (CP), accompagnées d'une production d'acide lactique et d'une baisse du pH.

La *rigor mortis* est un phénomène où le poisson, après sa mort, devient raide. Le mécanisme à l'origine de ce phénomène est la contraction musculaire due à un manque d'ATP (adénosine tri phosphate). La *rigor* s'achève lorsque presque toutes les fibres musculaires sont contractées.

Des facteurs endogènes et exogènes tels que l'état physiologique (épuisement, jeûne, stress), le mode d'abattage ainsi que la température après la mort vont jouer fortement sur la vitesse et la nature des réactions biochimiques qui accompagneront l'installation de la *rigor mortis*. Il ressort de ces expérimentations que la phase de *rigor mortis* apparaît plus rapidement pour les poissons qui ont été asphyxiés ou étourdis par électrocution. Cette phase est également accompagnée d'une diminution des quantités de CP et d'ATP. La résolution de la phase de *rigor mortis* est également plus rapide. Leurs teneurs initiales en CP et ATP sont également plus faibles en comparaison des truites anesthésiées ou assommées. Il est donc possible que si la vitesse d'apparition de la *rigor* du muscle de poisson est influencée par les concentrations initiales en CP et ATP (donc influencée par les conditions d'abattage du poissons), la qualité de conservation du poisson soit seulement dépendante des concentrations initiales en CP et ATP si ces concentrations se situent au-dessus d'un certain seuil (Proctor *et al.* 1992).

3.1.5 - Evaluation de la qualité du muscle

Les études disponibles démontrent que l'aptitude à la transformation et les qualités organoleptiques des salmonidés sont dépendantes de la teneur (Faure 1989, Magnussen et Rosjo, 1989) et de la nature des lipides de la chair (Boggio *et al.* 1985). La texture de la chair de truite est une des qualités organoleptiques qui conditionnent l'acceptabilité du produit. Elle est principalement déterminée par la composition et l'organisation tridimensionnelle des tissus constitutifs du muscle (fibres musculaires, tissus conjonctif et adipeux). Les protéines musculaires ont un rôle prépondérant dans la détermination de la texture. Parmi les facteurs externes influants sur la texture de la chair, le stress d'abattage, souvent associé à une intense

activité musculaire, a un impact majeur. Il modifie notamment le métabolisme post-mortem des protéines (Lefevre *et al.* 2007).

Immédiatement après la mort, le muscle est totalement détendu et la texture élastique et souple pendant quelques heures, après quoi le muscle se contracte. Cela signifie qu'il est important de traiter le muscle rapidement ou bien attendre la fin de la *rigor mortis* pour éviter des problèmes de fabrication comme ceux abordés dans le chapitre suivant.

3.2 Transformation du poisson dans l'industrie

3.2.1 - Les enjeux du salage

Les industriels doivent adapter leurs processus de salage afin de i) préserver la qualité nutritionnelle des produits, ii) respecter les normes sanitaires, et iii) garantir les propriétés organoleptiques du poisson, notamment des filets du poisson pour lesquels la texture, la couleur et l'odeur sont importants. Le salage a pour effet de rendre le milieu défavorable aux microorganismes en raison de l'abaissement de la teneur en eau et de l'augmentation de la teneur en sel. Seuls les germes halophiles peuvent s'y développer. Cependant les produits salés évoluent sous l'effet des transformations physiques, chimiques et bactériologiques qui se produisent pendant le transport, le stockage, et la transformation des produits.

3.2.2 - Le salage : des techniques de salage

Le salage est une méthode ancestrale de conservation du poisson. En plus de son effet antimicrobien, le chlorure de sodium est un exhausteur de goût (Machado *et al.* 2016).

Le processus de salage au sel sec a est associé à deux phénomènes qui s'opposent : le sel de surface entraîne une extraction de l'eau endogène du poisson et parallèlement, la migration du sel extérieur vers la chair du poisson.

3.2.2.1 - Le salage à sec

C'est la technique la plus traditionnelle : elle consiste à déposer du sel sur le poisson et à l'empiler de telle manière que la saumure qui en résulte s'égoutte. La pénétration du sel peut prendre plusieurs heures.

3.2.2.2 - Le salage en saumure (ou salage humide)

Dans ce procédé, le poisson est mélangé à du sel et entreposé dans des récipients étanches dans sa propre saumure (liquide qui se forme par dissolution du sel dans l'eau extraite des tissus du poisson).

3.2.2.3 - L'injection de saumure

Cette technique repose sur l'injection de saumure sous pression dans la chair du poisson à l'aide d'aiguilles qui percent la chair avec une profondeur variable. Elle permet d'uniformiser le salage en faisant pénétrer la saumure à différentes concentrations, et à différentes pressions.

Cette méthode de salage par injection est rapide par opposition au salage sec et au salage par saumure. Ici, la saumure est mécaniquement forcée de se répartir dans le tissu musculaire dans les zones proches des aiguilles d'injection en raison de la pression exercée sur la saumure à travers le système d'injection. Ainsi, la distribution du sel dans le muscle est moins dépendante du mécanisme de diffusion passive du sel (Birkeland *et al.* 2007).

L'utilisation industrielle de l'injection peut également permettre d'augmenter le poids des produits. Les principaux produits concernés sont le saumon et la truite.

Le salage par injection présente d'autres avantages. Le premier est qu'il permet de limiter les manipulations du produit. Le deuxième est de diminuer la durée du salage, et par conséquent, l'exposition du produit à des températures favorables à la prolifération des bactéries (soit 12 à 15°C en salage traditionnel). Le troisième argument favorable à l'utilisation de cette technologie est de permettre de traiter les produits à cœur avec une meilleure répartition du sel et ce de manière plus reproductible (Knockaert, 2002).

3.2.3 - Effet du temps post-mortem sur la qualité du salage

La *rigor mortis* a un effet majeur sur l'absorption et la distribution du sel dans les tissus musculaires pendant le salage, (Wang *et al.* 1998, 2000). L'absorption de sel, la concentration en sel d'équilibre, l'homogénéité et la diffusion du sel dans le muscle du saumon sont toutes affectées de façon significative par l'état de rigorr du muscle au début du salage en saumure. Le muscle *pré rigor* montre une absorption beaucoup plus faible, une homogénéité réduite et une concentration de sel d'équilibre plus faible en fonction du temps de saumure par rapport au muscle en post rigor. Les différences dans l'absorption et la distribution du sel dans le muscle entre le *pré* et *post rigor* ont été attribuées aux pompes ATP actives qui maintiennent des gradients de concentration à travers les membranes cellulaires. Ces dernières sont davantage résistantes à la distribution du sel dans un muscle en *prerigor* (Wang *et al.* 2000). La dégradation des structures cellulaires par les enzymes dans un muscle est plus importante en post-rigor que dans un muscle en *prerigor* (Wang *et al.* 1998).

Røra *et al.* 2004 ont observé des différences dans la teneur en sel et la distribution des filets de saumon traités dans des conditions de rigor différentes. Les filets séchés salés et fumés

provenant d'un muscle en *pré rigor* présentaient une teneur en sel significativement plus faible et une distribution du sel moins uniforme que les filets fumés provenant d'un muscle en *pré rigor* . Ainsi, les processus de salage dépendant de la diffusion à partir de la surface pour l'approvisionnement et la distribution de sel dans le tissu musculaire ne semblent pas optimaux pour les filets en *pré rigor* de saumon atlantique utilisés pour le fumage à froid.

L'utilisation du salage par injection comme méthode d'alimentation et de distribution du sel dans un filet en *pré rigor* peut constituer une technologie appropriée pour surmonter les problèmes observés pendant le salage à sec et le salage par saumure en ce qui concerne les attributs fondamentaux de l'absorption et de la distribution du sel.

3.2.4 - Effet du sel sur la composition et la structure des muscles

3.2.4.1 - Dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines du muscle se traduit par des effets multiples (perte d'activité biologique, déstructuration du muscle, accroissement de la viscosité intrinsèque) ce qui impacte la texture, la couleur, le goût et d'autres critères de qualité du produit. Plusieurs facteurs peuvent causer la dénaturation des protéines, comme la température et les transformations physiques (exemple : le barattage). Le sodium, qui est abondant dans l'eau de mer mais se trouve en faible concentration à l'intérieur des cellules, est considéré comme un déstabilisateur de protéines : les ions sodium Na^+ interagissent de préférence à la surface des protéines, qui perdent alors leur structure tridimensionnelle et se déplient (Bowlus et Somero, 1979). Les changements de pH peuvent modifier la charge des chaînes latérales des acides aminés et, par conséquent, perturber les interactions non covalentes qui contribuent à la conformation des protéines (Koner mann, 2012).

3.2.4.2 - Solubilité des protéines

Le salage peut potentiellement avoir plusieurs effets dans les muscles de poisson, notamment : augmenter la solubilité des protéines, causer la dénaturation des protéines et améliorer l'hydratation et la capacité de rétention d'eau (Petit *et al.* 2019). Par exemple, l'utilisation d'environ 2-3% de NaCl dans les viandes transformées permet de solubiliser les protéines myofibrillaires (Sun et Holley, 2011). En outre, le sel modifie la structure des protéines et leur interaction avec d'autres composants (c'est-à-dire l'eau et les lipides), ce qui contribue à maintenir le sel dans le muscle et aide à prévenir les pertes d'humidité et de matières grasses (Elias *et al.* 2019).

3.2.4.3 - Augmentation de la protéolyse

L'un des rôles fonctionnels important du NaCl dans la transformation du poisson est son action inhibitrice sur l'activité enzymatique musculaire. La protéolyse est un phénomène biochimique qui s'opère dans le poisson post-mortem, et qui affecte sa texture et sa saveur dans les produits transformés (Delbarre-Ladrat *et al.* 2006). Les principales protéases sont les cathepsines, les dipeptidyl peptidases et les aminopeptidases.

L'activité de ces enzymes est dépendante de la concentration en cations dans le micro-environnement cellulaire. Les cations monovalents, tels que Na⁺ et K⁺, exercent une action inhibitrice décisive sur les cathepsines et autres protéases telles que l'alanyl aminopeptidase (AAP), la lipase neutre et l'estérase acide (Toldrá et Flores, 1998). D'autre part, l'activité de la transglutaminase F-XIIIa augmente dans le NaCl, ce qui améliore la dureté du muscle, la cohésion et l'élasticité du produit.

Pour les raisons évoquées ci-avant, on comprend que le sel et les processus de salages (injection, sel sec, etc.) influencent les structures des muscles, donc leur qualité et leur propriété de conservation. Cependant les mécanismes sous-jacents qui permettent d'expliquer les modifications structurales et biochimiques ne sont pas encore bien connus. Pour répondre à cette problématique, les chercheurs s'appuient sur des techniques de pointe, notamment des études biochimiques, mais aussi, sur des techniques de microscopie et de spectroscopie.

3.3 - La microscopie : un atout pour comprendre les modifications structurales et chimiques du muscle

Pour étudier les propriétés des muscles (de produits carnés, poissons) lors de l'évolution post-mortem et étudier comment les procédés de transformation utilisés par les industriels impactent ces propriétés, et potentiellement la qualité du produit (nutritionnelle, sanitaire, sensorielle etc.), les industriels collaborent avec les chercheurs qui disposent d'outils de mesure de pointe. Par exemple, l'imagerie par microscopie et spectroscopie génèrent des données permettant de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents à la diffusion du sel et à la qualité des aliments. Parmi la pléthore de techniques optiques disponibles permettant l'étude de tissus biologiques, on s'intéressera surtout aux méthodes qui peuvent i) soit observer les structures du muscle, ii) soit cartographier directement la présence de sel, iii) soit mesurer les effets indirects du sel sur la composition chimique du muscle.

3.3.1 - Microscopie électronique

L'observation du microrelief d'une surface est impossible à fort grossissement avec un microscope optique conventionnel (dit « photonique »). En effet, le pouvoir séparateur (ou résolution spatiale latérale) des systèmes optiques conventionnels est limité à environ 250 nm, le grossissement maximal est limité à environ 1 500, et la profondeur de champ est limitée à environ 1 μm . Ces caractéristiques dépendent de la longueur d'onde des rayonnements visibles et des propriétés physiques du système optique. C'est pourquoi s'est développée l'idée de former une image d'un échantillon à partir :

- soit d'un faisceau d'électrons suffisamment accélérés pour que la longueur d'onde associée soit inférieure au nanomètre. C'est le principe de la Microscopie Electronique en Transmission, désignée généralement par le sigle MET (et Transmission Electron Microscopy en Anglais) ;
- soit d'un pinceau d'électrons très fin presque parallèle qui balaye l'échantillon et permet à partir des électrons secondaires émis de former une image point par point (microscopie électronique par balayage, désignée généralement par le sigle SEM (Scanning Electron Microscopy) (Ruste, 2015).

Le MET permet une analyse morphologique, structurale et chimique d'échantillons solides à l'échelle atomique. Cette technique repose sur l'interaction des électrons avec la matière. Principalement, la détection des électrons ayant traversé l'échantillon ainsi que tous les signaux résultants de l'interaction électrons-matière (Rayons X, photons) permettent d'obtenir des informations sur les propriétés de l'échantillon. Les échantillons étudiés doivent donc être préalablement amincis afin d'être transparents aux électrons (Université de Montpellier, 1965).

La microscopie électronique à balayage MEB (ou « Scanning Electron Microscopy » SEM) est une technique puissante d'observation de la topographie des surfaces. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ. La MEB utilise, en complément, les autres interactions des électrons primaires avec l'échantillon : émergence des électrons rétrodiffusés, absorption des électrons primaires, ainsi que l'émission de photons X et parfois celle de photons proches du visible. Chacune de ces interactions est souvent significative de la topographie et/ou de la composition de la surface (Ruste, 2015). En outre, la technique de microscopie à balayage MEB peut être couplée à des

méthodes de spectroscopie afin de cartographier les éléments (C, O, Na, Cl) et observer comment le sel est distribué le long du muscle (Filgeras *et al.* 2016).

Les deux techniques serviront de support pour atteindre les objectifs de mon stage. Grâce à la Microscopie Électronique en Transmission (MET), nous pourrions observer l'ultrastructure du muscle. L'ultrastructure du muscle a été montrée comme un facteur important de la diffusion du sel dans les produits carnés (Astruc *et al.* 2018). On ne sait pas en revanche comment les modifications de l'ultrastructure durant le temps post-mortem (discuté plus haut) impacte la diffusion du sel. L'ultrastructure régit également les propriétés organo- sensorielles du produit, notamment sa texture, etc. qui sont des éléments essentiels pour déterminer la qualité du produit.

3.3.2 - Microscopie spectroscopie Infrarouge (imagerie vibrationnelle : pour avoir une cartographie de l'effet indirect du sel sur les filets)

Le rayonnement infrarouge (IR) a été découvert en 1800 par l'astronome Frédéric Wilhelm Hershel. C'est une onde électromagnétique de fréquence inférieure à celle de la lumière visible : le rouge, d'où son nom tiré du latin « infra » signifiant « plus bas ». Les radiations du rayonnement infrarouge, dont le domaine s'étend de 0,8 μm à 1000 μm , sont situées entre la région du spectre visible et les ondes hertziennes. Ce domaine est divisé en 3 régions : le proche, le moyen et le lointain infrarouge. Le proche infrarouge se situe entre 0,8 et 2,5 μm (12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge entre 2,5 et 25 μm (4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge entre 25 et 1000 μm (400-10 cm^{-1}) (Figure 5).

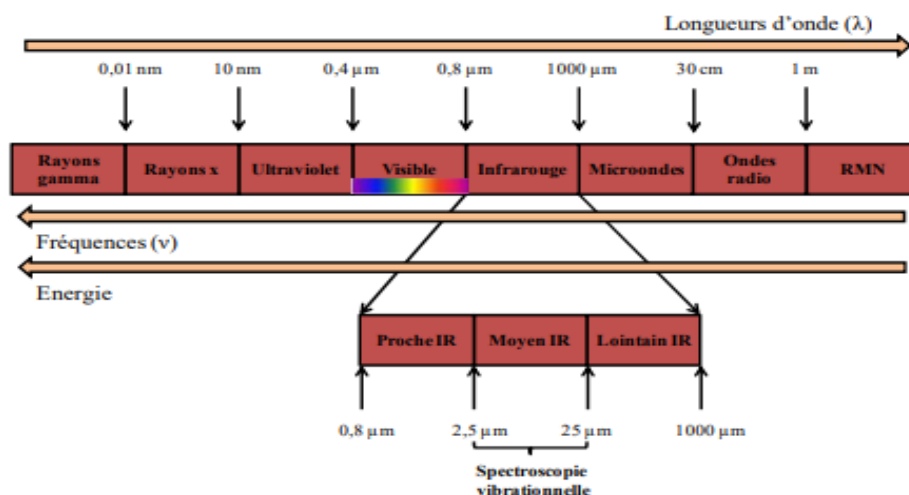


Figure 5. Spectre électromagnétique (Lecellier, 2013)

Lorsqu'on illumine un échantillon donné par un rayonnement infrarouge, des vibrations correspondants aux mouvements internes des molécules sont générées. Le type et la fréquence

des vibrations sont spécifiques à la nature des liaisons chimiques (par exemple, C-C, C-N, C=C, CO, ...) qui composent les molécules (Lecellier, 2013). On dit ainsi que la spectroscopie infrarouge est un type de spectroscopie « vibrationnelle ». Une partie des photons est redirigée dans toutes les directions, photons dont la fréquence va être relativement spécifiques aux composés moléculaires de l'échantillon. Un détecteur permet de capturer ces photons et leur fréquence. Ainsi, la spectroscopie vibrationnelle permet de cartographier les liaisons chimiques présentes au sein d'un échantillon.

L'application de la spectroscopie vibrationnelle à l'étude d'échantillon biologique à environ 20 ans. A partir des études publiées dans la littérature, il est possible d'inférer le type de composé biologique présent : protéine, lipide saturé ou insaturé, Amide I, Amide II, ADN, ARN, carbohydrates, etc. Il est à noter que l'échantillon n'est pas détruit lors de l'analyse. La résolution spatiale est proche de la limite de la diffraction de la lumière (soit 250 nm, échelle sub-cellulaire) dans un système optique dit « confocal ».

Des études montrent que la micro-spectroscopie vibrationnelle permet d'identifier des longueurs d'ondes spécifiques à l'effet du salage de muscles ou l'effet de la cuisson des muscles chez le bœuf (Boker *et al.* 2006). Des études préliminaires de l'INRAE (Germond, communication personnelle) montreraient que la micro-spectroscopie infrarouge permet d'obtenir des biomarqueurs spécifiques de la dénaturation des protéines qui s'opère dans le muscle de poisson au cours du temps post-mortem. De tels procédés sont potentiellement intéressants pour développer à terme des méthodes innovantes s'adressant aux besoins des industriels.

OBJECTIFS

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'état fraîcheur et l'effet du salage au cours du temps post-mortem.

Pour ce faire, une première partie du travail a consisté à déterminer, i) la composition chimique des muscles de truite selon l'état de fraîcheur.

Dans une deuxième partie de l'étude, l'objectif a été de déterminer l'effet du salage sur la composition et la structure du muscle de truite ainsi que la diffusion du sel au travers du muscle.

Les questions de recherche auxquelles cette étude tentera de répondre sont :

- Est-il possible de trouver des biomarqueurs pour déterminer l'état de fraîcheur du muscle de truite ?

- Est-ce que la structure du muscle est impactée par l'effet du salage ?
- Est-ce que le sel diffuse de façon homogène dans le muscle ?

Pour essayer de répondre à ces questions, des techniques d'imagerie telles que la microspectroscopie infrarouge et la microscopie électronique en transmission ont été mises en œuvre.

4. MATERIEL ET METHODES

Dans ce projet la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* a été utilisée. Six truites ont été fournies par l'entreprise Aqualande pour ce projet. Les truites proviennent du même lot et ont été choisies pour la similarité de leur calibre et leur morphologie (5.75 ± 0.25 Kg). Elles ont été transportées et conservées sur de la glace (température 0°C). Sur chaque truite, une darne a été prélevée et partagée en deux parties identiques au niveau de l'arête. La première 1/2 darne a été découpée au frais, elle a servi pour des échantillons témoins /contrôles et pour assurer une analyse de l'évolution post-mortem du tissu frais entre J0 et J15. La seconde 1/2 darne a été débarrassée de la peau, pesée, salée au sel sec sur champs et déposée à 8°C.

Les truites ont été échantillonnées à 10 moments différents de la cinétique post-mortem (**Tableau I**).

Tableau I. Temps de prélèvement

Temps de prélèvement (après la mort)	Nom d'échantillon
40 minutes	J0
4 heures	J0H4
8 heures	J0H8
12 heures	J0H12
1 jour	J1
3 jours	J3
5 jours	J5
7 jours	J7
9 jours	J9
15 jours	J15

Un des objectifs de ce projet était étudier l'impact du temps post-mortem et l'impact du salage sur le muscle de truite. Dans la **Figure 6** nous pouvons observer en détail la stratégie d'échantillonnage pour les différentes analyses qui ont été effectuée. Par mesure de simplicité, les échantillons J0H4, J0H8, J0H12 n'ont pas été considérés pour cette étude.

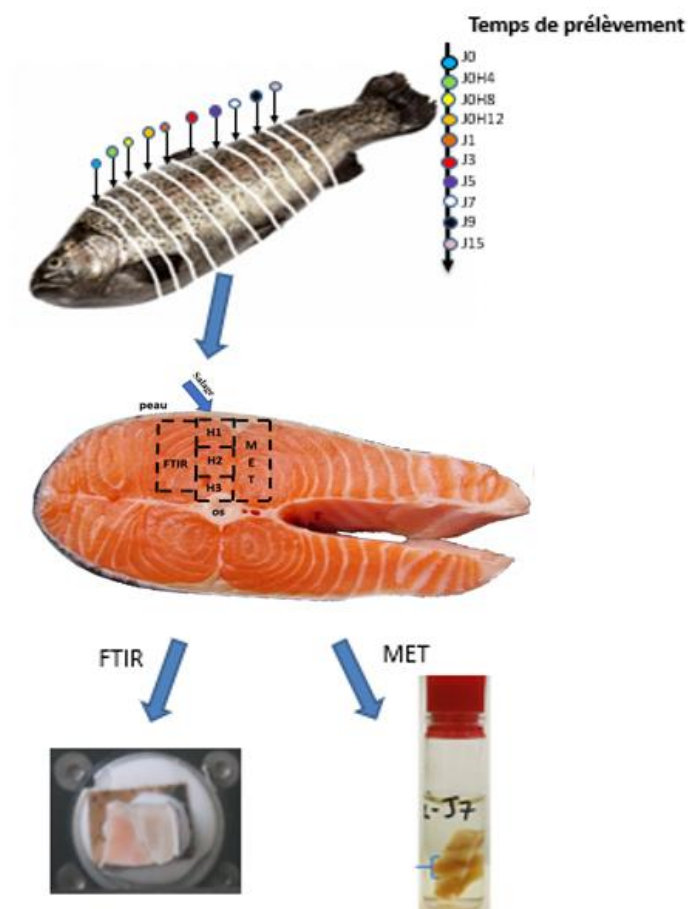


Figure 6. Localisation dans la truite de chaque échantillon et des morceaux utilisés pour cette étude.

Deux groupes différents d'échantillons ont été traités, ceux qui n'étaient pas salés ($n=3$) et une autre moitié qui avait été salée ($n=3$), afin que les échantillons non salés puissent servir de témoin potentiel pour expliquer les différences par rapport aux échantillons salés. Le salage a été effectué du côté de la peau. Pendant 3h, avec du sel sec. Le sel a diffusé pendant 3h puis a été retiré avec un pinceau. Les échantillons salés ont été placés à 8°C pendant 21h pour laisser le sel diffuser.

Des blocs d'environ 1 cm ont été prélevés (**Figure 6**) pour les différentes techniques mises en œuvre. Des blocs de 3 truites ont été obtenus pour la microscopie infrarouge (FTIR) et ont été cryofixés à -160 °C dans l'isopentane précédemment refroidi à l'azote liquide puis conservés à -20°C.

Pour l'étude structurale des échantillons salés, nous avons traité 3 zones différentes (**Figure 6**) : H1 qui a été en contact avec la peau et H3 en contact avec l'os et H2 entre les deux. Il est à noter

que pour des raisons pratiques de microscopie électronique en transmission, seule la zone médiane (H2) a été utilisée.

4. 1 - Mesures par microspectroscopie infrarouge

4.1.1 - Préparation des coupes cryofixées

Les échantillons conservés à -20°C ont été utilisés pour réaliser des coupes fines de $6\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur au microtome à -25°C . Pour chaque échantillon, les tissus musculaires ont été coupés en orientation transversale à -25°C à l'aide d'un microtome Leica (**Figure 7**). L'échantillon cryofixé a été collé sur la platine au moyen des pinces avec le milieu de montage O.C.T. La platine était avancée manuellement, en se servant du volant, par déplacement micrométrique en direction du couteau. Ensuite des coupes de 20 ou 30 μm ont été réalisées afin d'obtenir une surface plane de notre échantillon. L'orientation des fibres musculaires (longitudinale ou transversale) a été vérifiée par microscopie optique. Ensuite, des coupes longitudinales de $6\text{ }\mu\text{m}$ ont été réalisées. Les coupes de tissus ont été placées sur des lames fluorure de baryum (BaF_2) qui sont transparentes aux rayons infrarouges.

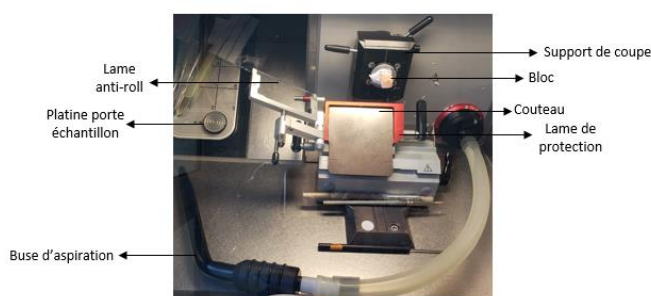


Figure 7. Cryostat Leica CM1950

4.1.2 - Microspectroscopie infrarouge

Les coupes ont été analysées avec un microscope FTIR (Thermoscientific iN10, Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) équipé d'un détecteur refroidi à l'azote liquide.

Après l'obtention d'une cartographie générale du tissu par imagerie optique (**Figure 8**), les centres de cellules uniques ont été ciblés. Le signal de chaque cellule est acquis à partir de la moyenne de 256 spectres, avec une ouverture de $30\text{ }\mu\text{m}$. Les spectres d'environ 40 cellules ont été acquis sur chaque coupe avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1} dans la gamme de 600 à 2500 cm^{-1} .

Le signal de la plaque BaF_2 a été obtenu avec 256 répétitions près de l'échantillon de tissu. Ce signal de fond du BaF_2 a été soustrait des spectres de chaque cellule. Afin d'optimiser la qualité du signal, les spectres des cellules ont ensuite été traités comme décrit dans Germond *et al.*

2018, en effectuant une correction de la ligne de base à l'aide d'une correction polynomiale (5e ordre, 200 itérations) selon la méthode dite de ModPoly (Liebler *et al.* 2003) et une normalisation vectorielle ($X = \sqrt{\sum_{i=0}^{n-1} x_i^2}$). La zone comprise entre 900 et 1780 cm^{-1} a été considérée pour les analyses d'apprentissage automatique ultérieures car elle correspond à la zone dite « fingerprint », riche en informations. Bien que le spectre acquis soit plus large, et contienne des informations notamment entre la zone 2600 et 3000 cm^{-1} , cette zone n'a pas été analysée par mesure de simplicité (notamment pour les analyses multivariées). Nous verrons plus tard que la zone entre 900 et 1780 cm^{-1} permet de répondre aux objectifs de l'étude.

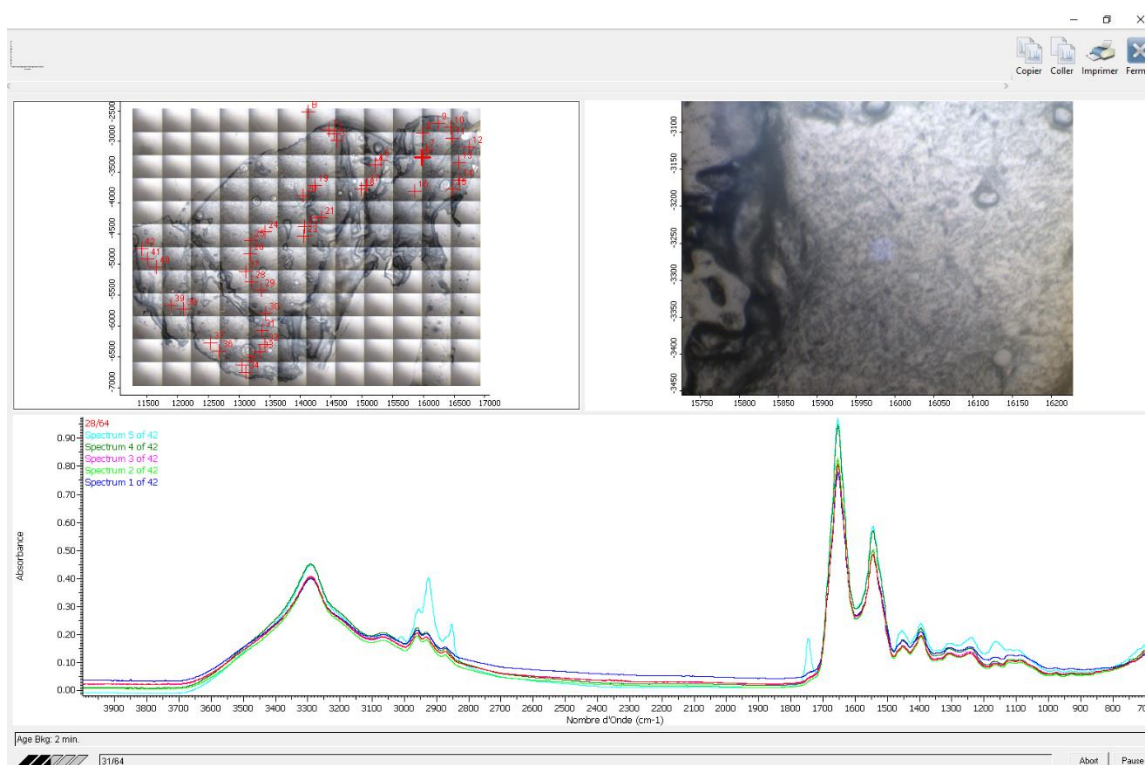


Figure 8. Fenêtre du logiciel d'acquisition de Thermoscientific iN10 représentant les coupes, les points choisis lors de l'acquisition et les spectres obtenus. L'image en haut à gauche montre le cartogramme avec la sélection des points à traiter. L'image supérieure droite montre en temps réel le point analysé et la partie inférieure montre les spectres moyens de chaque cellule, selon une acquisition entre les longueurs d'ondes 700 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} .

4.2 - Microscopie électronique en transmission

4.2.1 - Préparation des résines

Après leurs prélèvements, les échantillons ont été fixés et conservés dans une solution de glutaraldéhyde à 2.5% dans du tampon cacodylate de sodium à 0.1 M et pH6,4. Les échantillons ont été ensuite découpés en morceaux de 1mm par 0,5 mm avant de les fixer dans de l'acide osmique à 1% dilué dans du tampon cacodylate pendant 1 heure. Par la suite, les échantillons ont été déshydratés par passages successifs dans des bains d'alcool : de l'éthanol à 70°C, suivi de l'éthanol 95°, en puis de l'éthanol à 100°C. De l'oxyde de propylène a été utilisé pour le dernier bain.

La phase suivante a ensuite consisté à inclure la résine dans l'échantillon à l'aide d'un mélange oxyde de propylène – résine (1 :1) pendant 1h. La résine a été préparée à partir de 50 ml de EMBED 812 Resin, 25 ml de Dodeceny Succinic Anhydride (DDSA), 25 ml de Nadic Meyhyl Anhydride (NMA) et 2 ml de N-Benzyl diméthylamine (BDMA). Ensuite nous avons laissé les petits morceaux dans la résine pure pendant 12 h. Le lendemain, une inclusion a été réalisée en déposant les échantillons dans des moules en plastique en position transversale et longitudinale. Les moules ainsi remplis ont été laissés 2h à 37°C puis 72h à 60°C dans une étuve JOUAN EB55S pour permettre la polymérisation de la résine.

Une fois la résine polymérisée, les échantillons étaient prêts pour la confection des coupes.

4.2.2 - Préparation de coupes au microtome

L'ultramicrotome (**Figure 9**) permet de réaliser des coupes semi-et ultra fines. Des coupes semi-fines de 1 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un couteau de diamant. Les coupes ont été déposées sur des lames en verre. Ces lames ont été placées sur une plaque chauffante pour fixer le tissu sur la lame, puis les coupes ont été colorées au bleu de toluidine en les laissant sur la plaque chauffante pendant environ 30 secondes et en éliminant le colorant avec de l'eau distillée ultrapure.

Les images ont été observées à l'aide d'un microscope optique. Cette procédure est utilisée pour observer les éventuelles zones à étudier en microscopie électronique en transmission.

Les coupes ultrafines de 90 nm ont été réalisées de la même façon puis déposées sur des grilles en cuivre. Un contraste à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb est alors effectué.

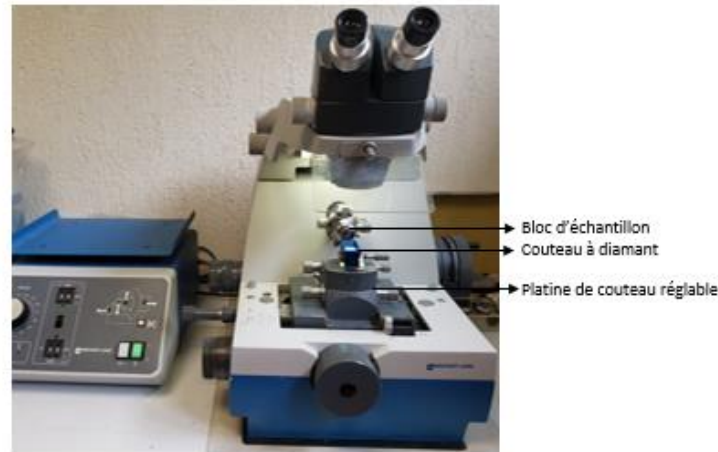


Figure 9. Ultramicrotome Reichert-Jung Ultracut E

4.2.3 - Observation et acquisition des images

Les échantillons ont été observés avec un microscope électronique en transmission (MET) Hitachi H-7650 (Japan) à 80kV, équipé d'une caméra Hamamatsu AMT40 située en position latérale (**Figure 10**).

Les grilles ont été introduites dans la chambre à vide où les électrons produits par le canon à électrons traversent l'échantillon grâce aux lentilles électromagnétiques. Les images ont été acquises grâce à une caméra numérique (Hamamatsu) En moyenne, 50 images ont été traitées pour chaque échantillon de muscle à chaque temps de prélèvement, prises à des grossissements de 3000x, 7000x, 12 000x, 20 000x et 50 000x..



Figure 10. Photo, manipulation du microscope électronique en transmission Hitachi H-7650

4.2.4 - Analyse des images

Pour quantifier la taille des sarcomères, le logiciel Image J pour Windows 10 a été utilisé. Une moyenne de 50 sarcomères a été mesurée pour J0, J7 et J15 (échantillons non salés). La mesure de taille des sarcomères dans les échantillons salés n'a pas été effectuée en raison de la difficulté de la visualisation des structures.

4.3 - Microscopie optique

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope optique à transmission Olympus BX 61 équipé d'un appareil photo numérique couleur Olympus DP 71 et du logiciel Cell Sens. Pour chaque échantillon des coupes semi-fines de bleu de toluidine, une mosaïque a été prise avec l'objectif 4x, puis des images ont été prises avec les objectifs 10x et 20x pour montrer plus en détails les éventuelles altérations des échantillons.

4.4 - Analyses statistiques

Les analyses de variance ANOVA ont été réalisées avec le logiciel Statistica. En utilisant un test de Tukey avec un seuil de signification de 0,05.

Pour la recompilation des spectres et la soustraction du signal de fond, le logiciel Spectragryph pour Windows (version 1.2.15) a été utilisé. Pour corriger la baseline et effectuer une normalisation des spectres (vector norm), le logiciel Matlab a été utilisé avec un algorithme développé par le Dr. Germond. Pour étudier la distribution des signatures chimiques obtenus par analyse en infrarouge, les spectres moyens des cellules ont été analysés par une analyse en composantes principales (ACP) avec Unscrambler X. L'analyse des loadings a été effectuée sur Excel.

5. RESULTATS ET DISCUSSION

Les industriels de la transformation des produits marins font face à une variabilité importante de leur matière première qu'ils souhaitent caractériser. Les objectifs scientifiques de cette étude étaient de caractériser la variabilité de la matière première au cours du temps post-mortem. Selon Delbarre-Ladrat *et al.* (2006) l'état de fraîcheur du poisson peut être mesuré par l'analyse sensorielle, des méthodes chimiques, des paramètres microbiens et des méthodes physiques.

Dans cette étude nous avons comparé des échantillons de muscle de truite prélevés juste après l'abattage (J0), et après plusieurs jours de maturation en utilisant la microscopie électronique et la spectroscopie infrarouge. En particulier, nous ferons des comparaisons plus détaillées entre J0 et J7.

5.1 - Evolution de la composition chimique des muscles de truite selon l'état de fraîcheur

Afin, de mettre en évidence des différences de composition chimique entre les échantillons de muscles de truites prélevés à différents temps, des analyses biochimiques ont été conduites en amont de ce stage. Pour compléter ces analyses, une étude du tissu musculaire de truite par spectrométrie infrarouge (FTIR) a été réalisée. Pour cette analyse, la zone dite fingerprint, très riche en informations, notamment sur la présence de lipides, protéines, carbohydrates et acides nucléiques, a été considérée (Al-Jowder *et al.* 1999; Karoui *et al.* 2010).

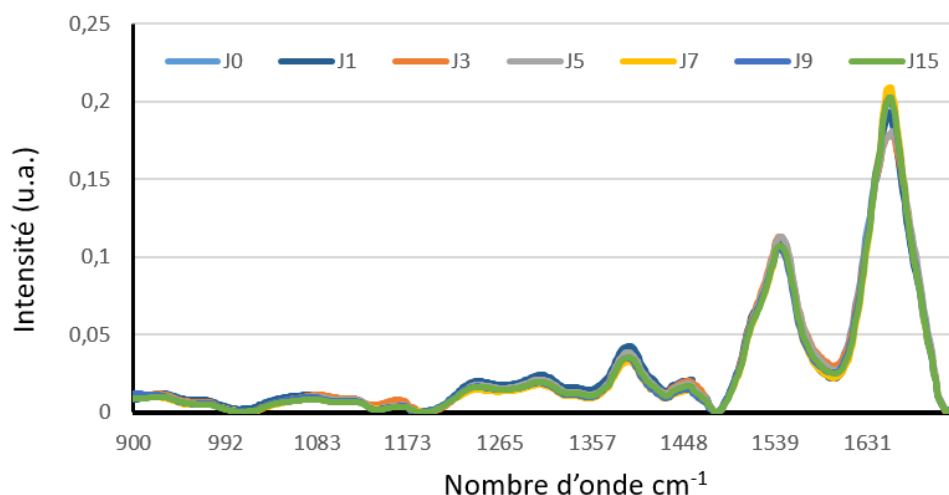


Figure 11. Moyenne des spectres des échantillons non salés normalisés montrant les temps de J0 à J15

Sur la **Figure 11** est représenté le spectre moyen pour chacun des temps considérés (moyenne à travers les cellules uniques du muscle). Bien que les différences entre les spectres semblent minimales, nous pouvons observer des variations des intensités moyennes, au niveau de la

longueur d'onde vers 1650 cm^{-1} . Cette bande est associée à la région Amide I correspondant aux hélices α (Yu, 2005). Des bandes voisines permettent également d'obtenir des informations sur la conformation de la structure secondaire de la protéine, comme la bande vers 1650 cm^{-1} , qui est associée aux hélices α , et vers 1635 cm^{-1} , associée aux feuillets β des protéines, respectivement. Une comparaison des spectres entre le temps J0, après abattage, et les autres temps peut ensuite être réalisée pour mettre en évidence des différences de composition chimique. Cependant, les industriels prenant part à ce projet (le CITPPM) souhaitent surtout savoir si des variations notoires existaient dans les 7 jours après l'abattage, car la transformation des filets de salmonidés se fait souvent jusqu'à cette période. Nous avons donc réalisé une comparaison fine entre les temps J0 et J7. En revanche, une comparaison avec d'autres temps montre des différences de composition dès le 5ème jour post-mortem (Annexe 1).

Pour ce faire, une ACP a été réalisée à partir de 380 spectres obtenus sur des cellules uniques mesurées aux temps J0 et J7, sur la base de 3 truites, dont entre 30 et 40 cellules ont été étudiées pour J0 et J7 (**Figure 12**). L'ACP permet d'étudier la variabilité des signatures spectrales des cellules musculaires, dans un espace à dimension réduite et a permis de visualiser des différences entre les échantillons dans la région spectrale située entre 900 cm^{-1} et 1780 cm^{-1} . Chaque point du graphique de la Figure 7 correspond à une cellule donnée.

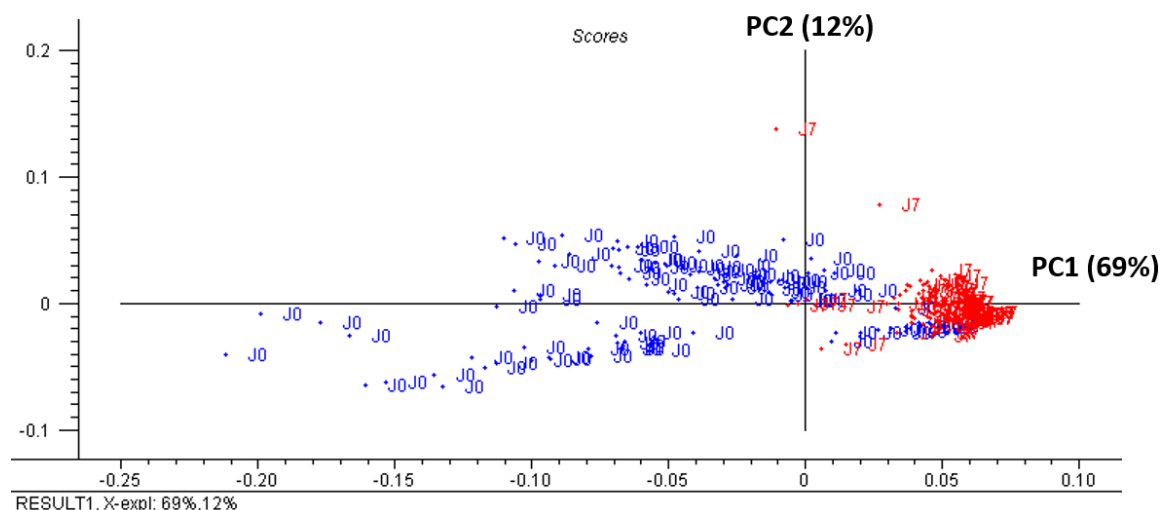


Figure 12. ACP des cellules de muscles de truites prélevées à J0 (en bleu) et J7 (en rouge) après abattage.

La **Figure 12** montre la projection des observations pour la première et la deuxième composante principale. Cette analyse révèle que la variation des spectres pour J0 est très forte par rapport au groupe au J7, mais que l'ACP permet clairement de séparer les deux groupes. La PC1

contribue largement à l'identification des groupes J0 et J7. La PC1 contribue en effet à expliquer 69% de la variation. L'un des avantages de la méthode d'ACP est qu'elle permet de faire une analyse non-supervisée des données, et qu'elle permet d'extraire le vecteur d'information (les loadings) de chaque composante.

La **Figure 13** présente le vecteur associé à la ACP. Ici, les valeurs positives sont plus associées au groupe J0, et les valeurs négatives au J7. Le score PC1 nous permet de distinguer un certain nombre de pics correspondants à des composés biologiques bien connus. Pour toutes ces bandes majeures trouvées dans les loadings de la PC1, des tests ANOVA effectués sur le maximum des bandes, ont révélé que les différences étaient significatives entre J0 et J7 ($p < 0.05$). Ces différences significatives sont marquées d'une étoile sur la **Figure 13**. A la vue de ces résultats, nous avons considéré que ces bandes spectrales sont des biomarqueurs de l'état de fraîcheur du muscle. De manière intéressante, nous avons retrouvé les bandes associées aux amides I et II en plus du pic des acides gras à 1747 cm^{-1} .

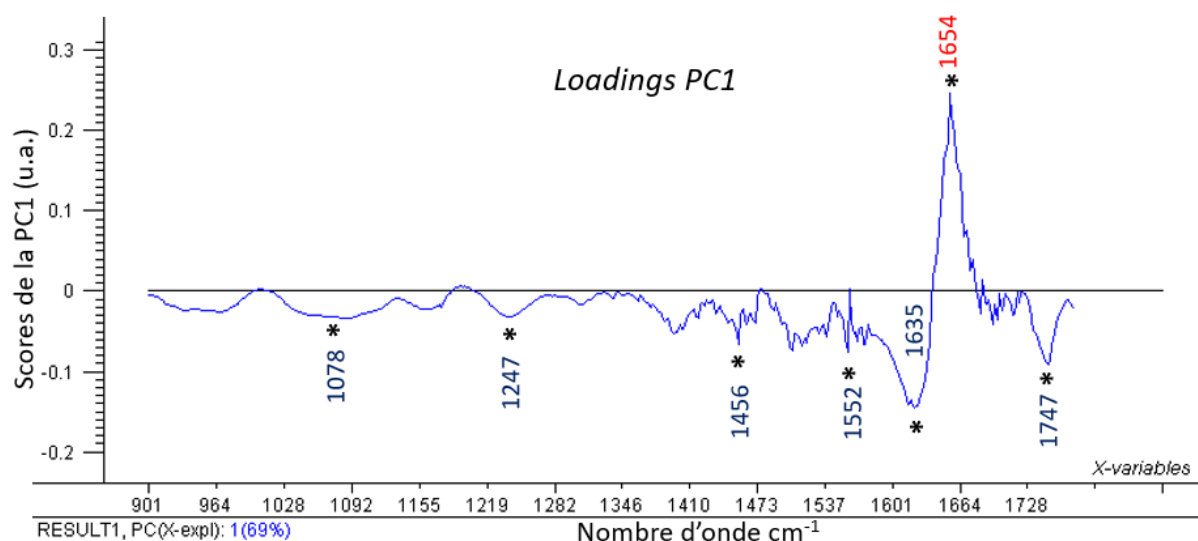


Figure 13. Loadings associé à la PC1 des échantillons non salés. Ce vecteur nous permet d'identifier un certain nombre de bandes qui permettent d'identifier les différences de l'état de fraîcheur entre J0 et J7. * indique des différences significatives ($p < 0,05$) entre J0 et J7, calculées sur les intensités des spectres originaux.

Tableau II. Principales bandes identifiées par la méthode d'ACP permettant de distinguer les différences de l'état de fraîcheur de muscles aux temps J0 et J7.

Nombre d'ondes	Biomarqueur pour	Associé à	Composés biologiques	Réf
1078 cm ⁻¹	J0	PO ₂ ⁻	Phosphate I	Dovbeshko <i>et al.</i> 2000
1247 cm ⁻¹	J0	PO ₂ ⁻	Phosphate I	Dovbeshko <i>et al.</i> 2000
1400 cm ⁻¹	J0	COO ⁻	Vibration d'étirement symétrique du groupe COO ⁻ des acides gras et des acides aminés.	Wood <i>et al.</i> 2004
1456 cm ⁻¹	J0	CH ₃	Vibration de flexion CH ₃ (lipides et protéines)	Fabian <i>et al.</i> 2006
1552 cm ⁻¹	J0	Amide II	Feuille prédominante en alpha de l'amide II	Eckel <i>et al.</i> 2001
1635 cm ⁻¹	J0	Structures des feuillets β de Amide I	Proportion de structures protéiques secondaires (pic d'épaule)	Eckel <i>et al.</i> 2001 ; Fabian <i>et al.</i> 2006
1654 cm ⁻¹	J7	Amide I	Amide I (des protéines en conformation d'hélice alpha)	Paluszkiewicz <i>et</i> Kwiatek, 2001
1747 cm ⁻¹	J0	C=O	Étirement C=O des esters : acides gras libres	Wu <i>et al.</i> 2001

Dans le **Tableau II**, nous avons établi une liste des biomarqueurs potentiels qui ont été identifiés à partir des informations de l'ACP. Nous y avons indiqué les molécules associées ainsi que leur contribution à l'état de fraîcheur (J0) ou au temps post-mortem avancé (J7). Nous n'avons considéré que les bandes où les différences sont les plus marquées.

Parmi les biomarqueurs, nous trouvons dans la région d'Amide I la bande à 1654 cm^{-1} , associée aux hélices α et la bande à 1635 cm^{-1} , associée aux feuillets β . Or, Zhang *et al.* (2020) ont montré que la bande associée aux α -hélices diminue en intensité. En revanche, l'intensité de la bande associée aux feuillets β augmente au cours du temps de stockage. La déstabilisation et la dénaturation des protéines dans les tissus carnés peuvent être suivies dans la région de l'amide I (1650 cm^{-1}) des spectres FTIR.

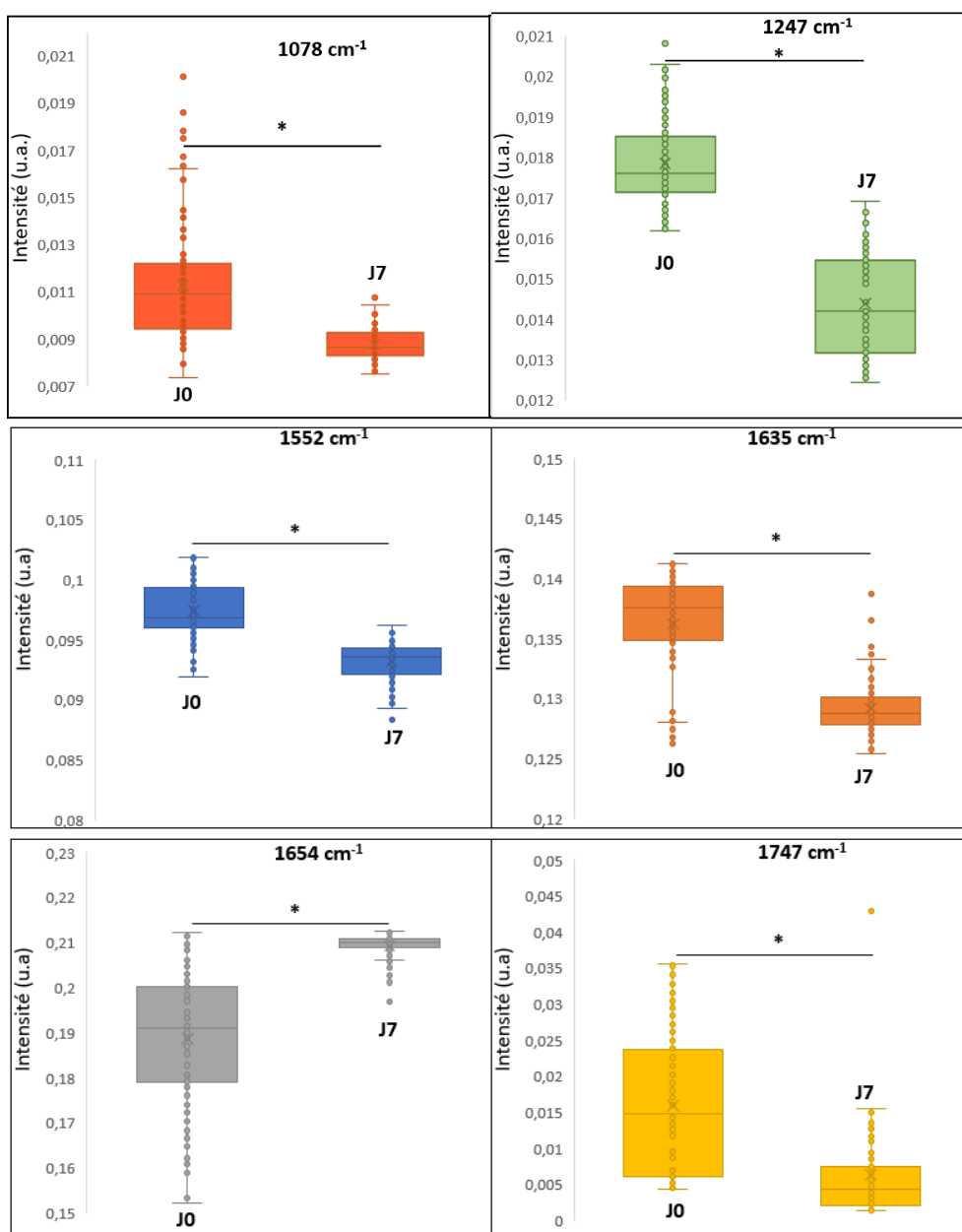


Figure 14. Boîtes à moustache montrant les différences significatives ($p < 0,05$) entre J0 et J7 dans les bandes 1078, 1246, 1552, 1635, 1654 et 1747 cm^{-1}

Chez le poisson, au cours du temps post-mortem, plusieurs études ont montré qu'il y a une rapide dégradation des acides nucléiques (comme l'ARN, l'ADN, etc.) (Sanchez-Alonso *et al.* 2012). Nous remarquons que les bandes moléculaires liées aux acides nucléiques, telles que PO_2 (1078 et 1247 cm^{-1}), sont clairement associées aux muscles frais (**Tableau II**). Ce résultat n'est pas surprenant car les acides nucléiques sont connus pour être dégradés et non renouvelés dans les tissus après la mort cellulaire. Il convient de noter qu'une étude précédente menée par Sanchez-Alonso *et al.* (2012) a utilisé la spectroscopie Raman, une technique de spectroscopie vibrationnelle complémentaire à la FTIR, pour surveiller l'effet du stockage par congélation sur les filets de merlu. Les auteurs ont montré que le stockage par congélation du poisson

provoquait la disparition de la bande PO_2^- , qu'ils ont attribué à l'hydrolyse des lipides membranaires et au durcissement de la chair du poisson, ce qui entraîne une variation de l'intensité des bandes associées au groupe PO_2 . Notre étude confirme que ces bandes peuvent être utilisées comme biomarqueurs de l'état de fraîcheur.

De plus, plusieurs études conduites chez le poisson montrent que l'intensité de la bande à 1747 cm^{-1} diminue avec le temps post-mortem (Carton *et al.* 2009). Cette diminution est associée à une oxydation des lipides. Nos résultats montrent une forte diminution (**Figure 14**), ce qui semble concordant avec la littérature.

Wei *et al.* 2018 et Guillén et Cabo (2004), ont montré que l'intensité des hélices α (1654 cm^{-1}) diminue tandis que l'intensité des structures des feuillets β (1635 cm^{-1}), β -turn ($1670\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$) et bobine aléatoire ($1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) augmente, indiquant que l'hélice α de la myosine se transforme partiellement en feuillet β , β -turn et bobine aléatoire. Cette transition implique un réarrangement des liaisons hydrogènes des protéines (Ogawa *et al.* 1999). La diminution d'intensité de la bande α -hélice est considérée comme un indicateur de dénaturation partielle des protéines. De la même manière, selon Larrea-Wachtendorff *et al.* (2015) sur le muscle *prérigor* chez *Seriola lalandi*, l'intensité de la bande spectrale à 1654 cm^{-1} est plus forte par rapport au muscle *postrigor*, tandis que l'intensité de la bande à 1635 cm^{-1} est plus faible. Ces résultats suggèrent que la diminution d'intensité des bandes associées aux hélices α est causée par le processus de dégradation protéolytique.

De plus, j'ai vérifié si la totalité ou une partie des bandes d'intérêt, ou biomarqueurs, identifiés à J7, étaient aussi trouvés à d'autres temps post-mortem plus avancés, comme au temps J15 (Annexe 2). Pour J15 la bande à 1654 cm^{-1} montre une intensité également élevée, tandis que les bandes à 1627 , 1558 , 1456 cm^{-1} présentent une diminution d'intensité.

5.2 - Variations de la structure du muscle au cours du temps post-mortem

La désorganisation du muscle du poisson est liée aux composants myofibrillaires du muscle. Il est connu que des changements ultrastructuraux dans la viande se produisent après 7 jours de stockage (Taylor *et al.* 1995). Nous nous sommes donc intéressés aux variations de structure du muscle de poisson.

Tout d'abord, nous avons comparé des coupes histologiques à différents temps en microscopie optique. La **Figure 15** s'intéresse en particulier aux temps J0, J7 et J15 pour mettre en évidence

d'éventuelles différences de structures. A J7 comme à J15, nous pouvons observer une augmentation de l'espace intermyofibrillaire à l'intérieur des fibres (flèches blanches), qui vient de la désorganisation de la structure du muscle. De plus, à J15, nous observons ces désorganisations, mais aussi des ruptures des fibres complètes (flèches noires).

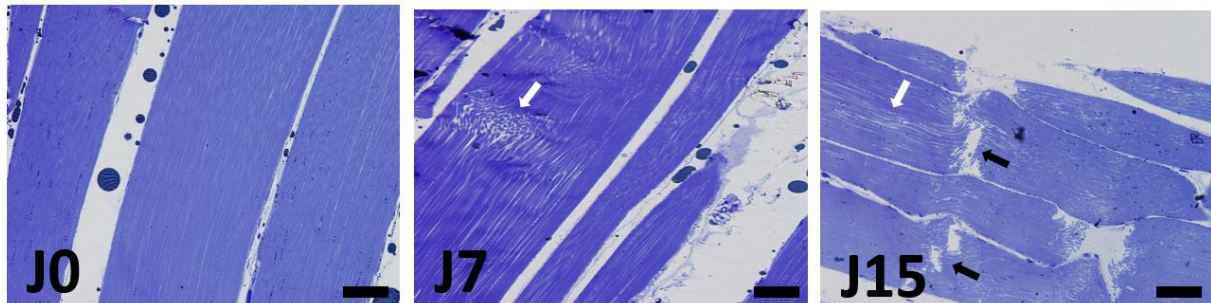


Figure 15. Coupes semi-fines longitudinales des échantillons non salés à J0, J7 et J15 colorées au bleu de toluidine. Les flèches noires indiquent des ruptures des myofibrillaires, les flèches blanches indiquent un élargissement de l'espace intermyofibrillaire. Barre d'échelle = 50 μ m

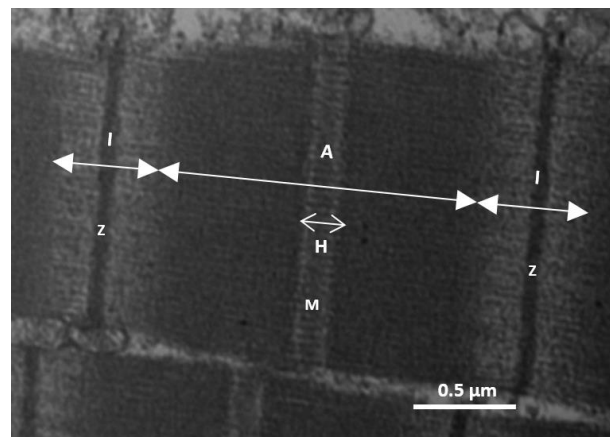


Figure 16. Structure du sarcomère à J0 observée par microscopie électronique. Barre d'échelle = 0.5 μ m

Selon Caballero *et al.* 2009, cette séparation est observée lorsque les filets de poisson sont soumis à des procédés de congélation.

Nous avons ensuite étudié l'ultrastructure des muscles par microscopie électronique. Dans les échantillons à J0, la section longitudinale de la fibre musculaire est intacte, avec le motif typique des sarcomères et ses zones A, I et H provenant des filaments épais et fins qui se recouvrent partiellement (**Figure 16**). Les filaments fins (filaments d'actine) sont attachés aux disques Z et les filaments épais adjacents (myosine) sont connectés aux lignes M. Dans chaque sarcomère,

au niveau du disque Z, deux citernes terminales enveloppent le tubule transversal vu comme un canal étroit.

Une variation de la taille des sarcomères a été observée dans les échantillons J0, J7, J15, comme le montre le **Tableau III**.

Tableau III. Taille moyenne de sarcomères en coupe longitudinale (μm) mesurée sur une truite. Au total, 50 sarcomères ont été mesurés pour les temps J0, J7, et J15. Les valeurs présentées sont la moyenne $\pm$ l'écart type. Les lettres a, b, c montrent une différence significative entre les échantillons (analyse ANOVA, suivie d'un test post-hoc de Tukey HSD, $p < 0,05$).

	J0	J7	J15
Poisson 3	$1.46 \pm 0.07\text{a}$	$1.80 \pm 0.04\text{b}$	$2.33 \pm 0.10\text{c}$

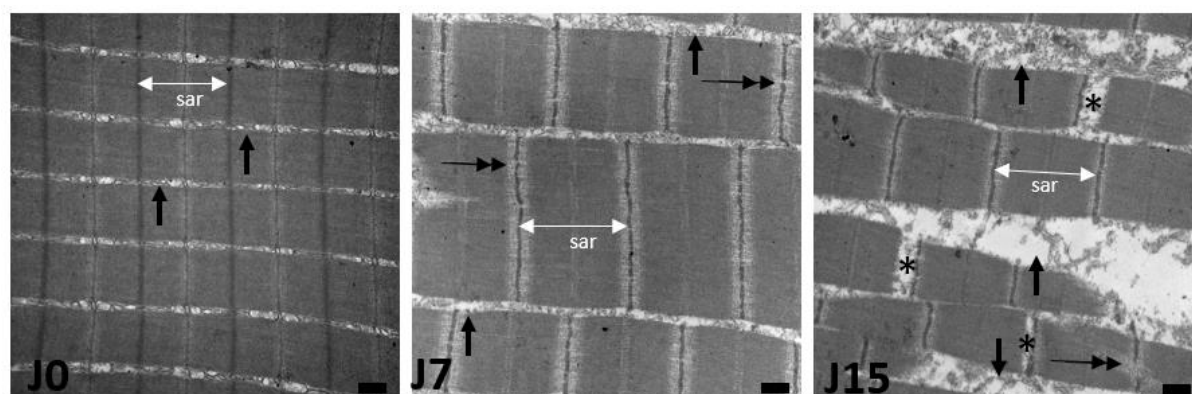


Figure 17. Coupes longitudinales des échantillons non salés au cours de temps post-mortem (sar, sarcomère). Les espaces intermyofibrillaires ont augmenté à J7 et à J15. Barre d'échelle = 500 nm.

Les flèches indiquent des espaces intermyofibrillaires réguliers (J0) et larges (J7, J15). Ceci montre que l'espace intermyofibrillaire augmente avec la durée de la période de stockage et pourrait être le résultat d'un réticulum sarcoplasmique perturbé et gonflé. Certaines zones (*) ont montré une perte de myofibrilles dans les zones de la bande I à J15.

Après abattage à J0, les filaments épais intacts et les filaments fins vus comme des bandes sombres et claires, respectivement, ont été clairement observés, et les myofibrilles sont ordonnées et parallèles. Les doubles flèches indiquent que la densité de la ligne Z est continue à J0 et semble légèrement discontinue à J7, tandis que l'effet est encore plus prononcé à J15 signe d'une protéolyse évolutive avec le temps post mortem.

Les sarcomères à J0 ont montré les caractéristiques typiques du muscle strié (c'est-à-dire les filaments d'actine et de myosine disposés de manière ordonnée). La fragmentation de la ligne Z a été régulièrement rapportée comme un phénomène post mortem chez les poissons (Ofstad *et al.* 1996 ; Hallett et Bremner, 1988) et a été généralement liée à l'activité des calpaïnes (Taylor *et al.* 1995). La ligne Z est le premier composant myofibrillaire à montrer des signes de destruction au cours de la dégradation post mortem du muscle squelettique (Hegarty *et al.* 1978).

Le composant le plus faible de la myofibrille, ou le plus sensible à la dégradation post mortem, pourrait être la jonction de la ligne Z et de la bande I (Wrogemann et Pena, 1976). En général, les myofibrilles sont plus stables chez les poissons que chez les mammifères, et on trouve donc une plus grande intégrité de la bande I chez les poissons (Taylor *et al.* 2002).

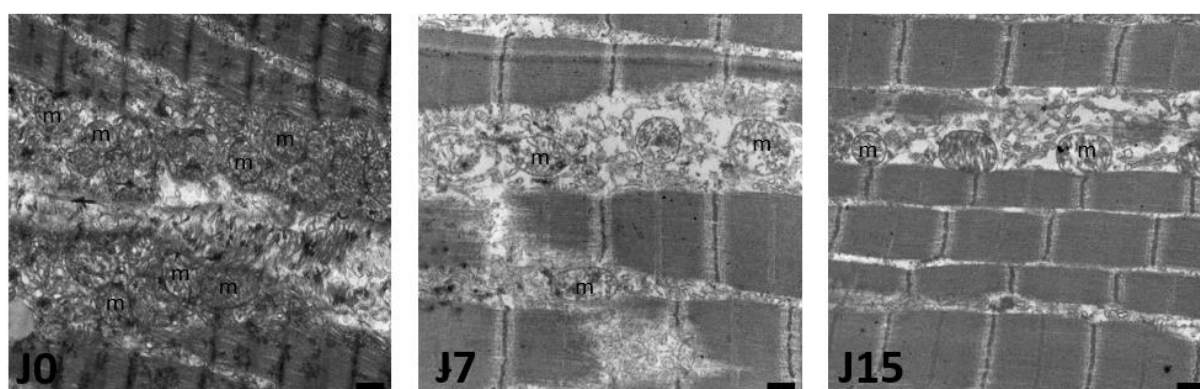


Figure 18. Mitochondries (m) des échantillons non salés à J0, à J7 et à J15. Barre d'échelle = 500 nm

Selon la **Figure 18**, à J0, les crêtes des mitochondries semblent visiblement gonflées avec des membranes externes et internes en grande partie coagulées, tandis qu'à J7 et J15, ces crêtes ont pour la plupart disparu et les mitochondries sont encore plus dégradées.

Nous pouvons voir que la dégradation des mitochondries s'est produite en même temps que la perturbation des structures des myofibrilles telles que les lignes Z, les bandes I et les lignes M en accord avec la littérature scientifique (Pornrat *et al.* 2007). De plus, la perturbation des mitochondries entraîne la libération d'enzymes dans le sarcoplasme, ce qui déclenche la dégradation des protéines sarcoplasmiques (Hamet Cormack, 1979).

Il est possible qu'aucune dégradation majeure des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique ne soit observée, car l'altération du pH au cours de temps post-mortem a été minimum (Annexe 5). Or, Hegarty *et al.* (1978) ont montré que le gonflement des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique peut s'expliquer par des changements de la perméabilité du sarcolemme aux liquides résultant d'une diminution rapide du pH musculaire. De plus, une augmentation de l'espace intermyofibrillaire peut être associée au rétrécissement des myofibrilles, causé par l'accumulation de protons, et le déplacement du pH de 7 à environ 5,6-5,8. Cette accumulation d'acide lactique rapproche le pH du point isoélectrique (5,3) des protéines myofibrillaires, diminuant ainsi les interactions protéine-eau et provoquant une plus grande interaction protéine-protéine et donc un rétrécissement des myofilaments.

5.3 - Effet du salage sur la composition et la structure du muscle de truite

Le deuxième objectif de ce stage était de pouvoir mesurer ou prédire l'effet direct ou indirect du chlorure de sodium (NaCl) sur la composition et la structure du muscle. En amont de ce stage, des études biochimiques ont été réalisées par l'équipe pour quantifier la concentration en sel dans les échantillons de muscle de truite salées au cours des temps étudiés. Ces prélèvements ont été faits sur les mêmes poissons (n=6). Les résultats sont présentés en Annexe. Ces résultats (Annexe 3) ont montré que la quantité de sel augmente au cours du temps post-mortem. Cela signifie que la prise en sel est fonction de l'état de fraîcheur du muscle.

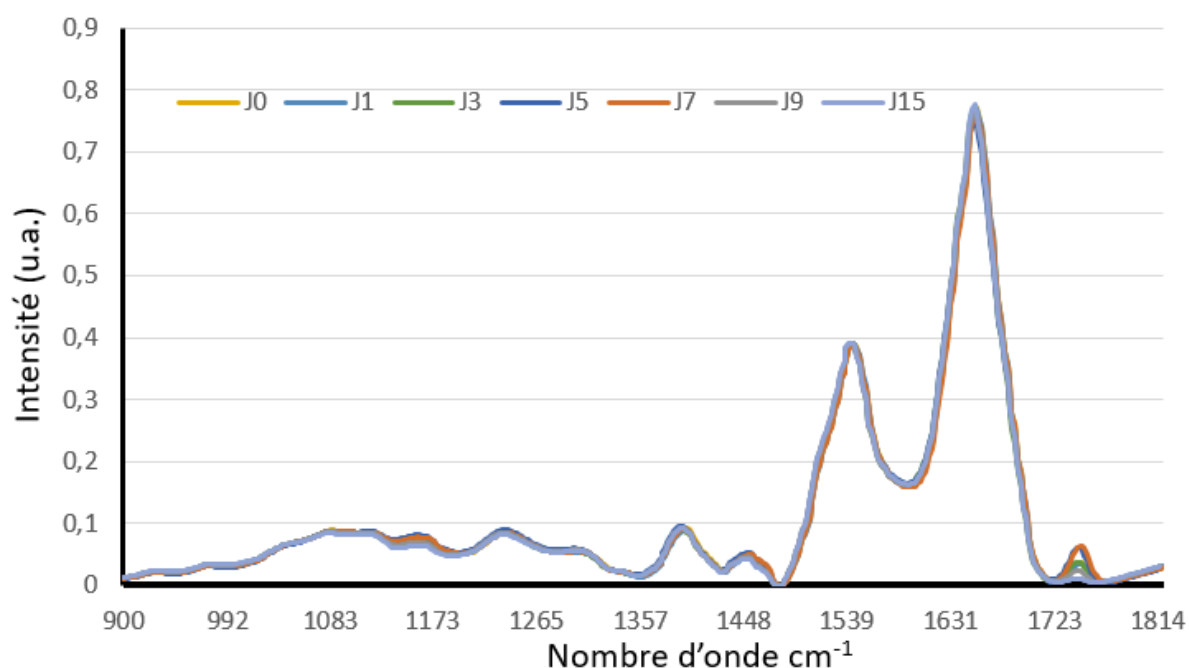


Figure 19. Moyenne des spectres de cellules musculaires mesurées sur les échantillons salés aux temps J0 à J15 après abattage.

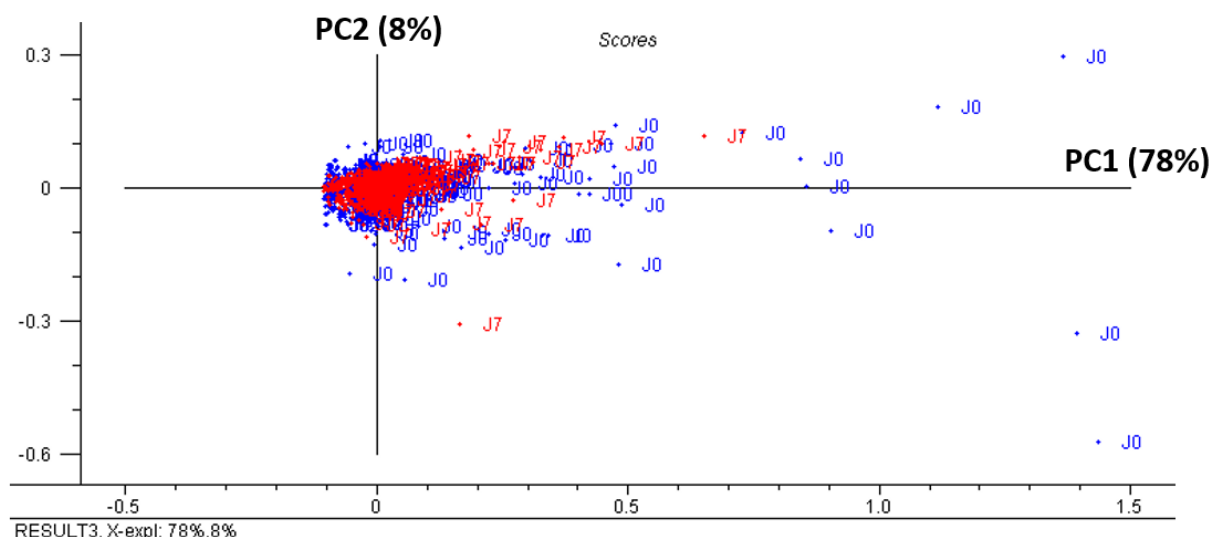


Figure 20. ACP des échantillons de muscles de truites salées à J0 (en bleu) et à J7 (en rouge)

Tout d'abord, une comparaison des moyennes des spectres pour chacun des temps considérés (la moyenne à travers les cellules uniques du muscle est présentée dans la **Figure 19**). Bien que la bande vers 1750 cm^{-1} montre une différence, cette différence est non-significative (ANOVA, post-hoc Tukey HSD). De plus, les bandes à 1654 , 1635 , 1247 , 1078 , 1552 cm^{-1} n'ont pas montré de différences significatives (ANOVA, post-hoc Tukey HSD).

De la même manière que dans la partie précédente de l'étude, nous comparons en particulier J0 et J7. La **Figure 20** montre une ACP des spectres de cellules musculaires entre les temps J0 et J7 dans les échantillons salés (3 truites par temps). Les résultats d'ACP n'ont pas montré de différence marquée entre les échantillons. Ce résultat suggère que les signatures spectrales sont assez similaires, donc que la composition chimique des échantillons est relativement proche.

La **Figure 21** montre les scores associés à la PC1 qui explique 78% de la variation. Ce vecteur montre en particulier des variations au niveau des bandes à 1650 cm^{-1} (région Amide I) et 1747 cm^{-1} (région C=O acides gras).

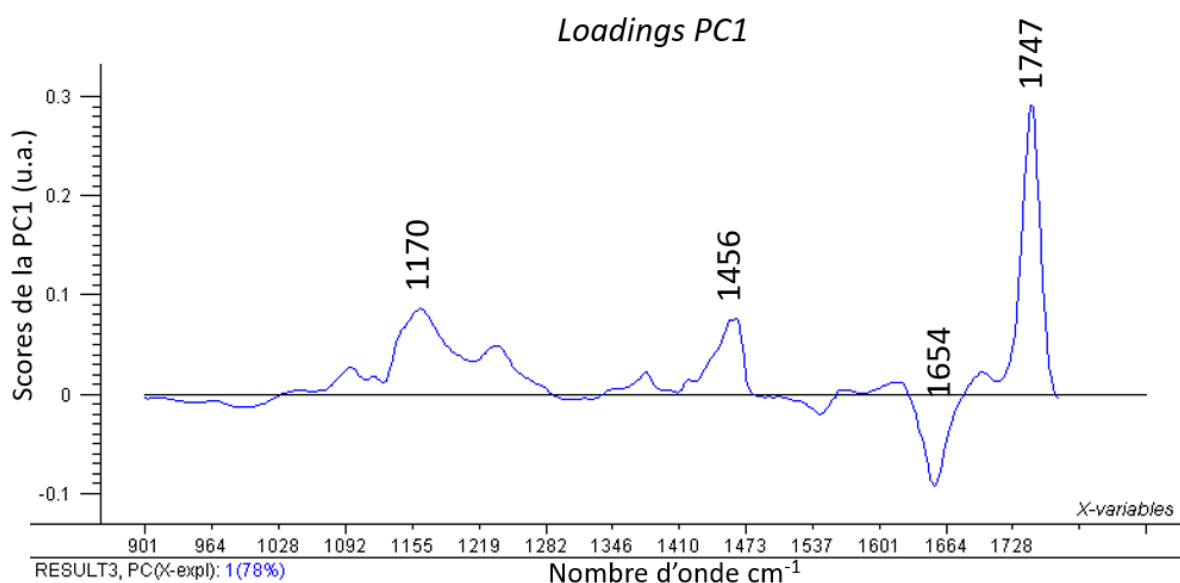


Figure 21. Loadings associés à la PC1 des échantillons salés. Ces loadings nous permettent d'identifier un certain nombre de bandes qui permettent d'identifier les différences de l'effet du salage entre J0 et J7.

Des publications montrent d'une part que le salage de la viande est associé à des changements de la capacité de liaison à l'eau des protéines de la viande. D'autre part, une augmentation de la concentration en sel peut entraîner, une dénaturation des protéines. (Böcker *et al.* 2006). Böcker *et al.* (2007) nous montrent que l'augmentation de la concentration en sel induit une diminution de la bande à 1654 cm^{-1} , en raison d'un épaulement survenant à des nombres d'ondes plus faibles. Ceci être attribué à des vibrations d'étirement C=O provenant de structures hélicoïdales alpha dans les protéines myofibrillaires. Perisic *et al.* (2011) révèlent une diminution de la bande à 1654 cm^{-1} , concomitante avec une augmentation de la concentration en sel. Ainsi, dans la **Figure 21**, la bande à 1654 cm^{-1} à J7 et J0 apparaît de plus faible intensité ; ce qui suggère que le salage est responsable de la diminution d'intensité observée.

Dans leur étude de muscles de poisson salés et fumés, Guillén et Cabo (2004) ont suivis l'évolution de l'intensité de la bande à 1747 cm^{-1} au cours du temps. Ils ont observé une intensité constante jusqu'à 6 jours, puis une diminution. Dans notre étude, cette bande ne varie pas jusqu'à J7, ce qui suggère un processus d'oxydation lent dû à l'effet de conservation du salage.

5.3.1 - Effet de la structure et de la composition sur la diffusion du sel

L'un des objectifs de cette étude était d'investiguer le rôle de la composition et de la structure du muscle sur la diffusion du sel. Pour ce faire, nous avons salé le côté peau et pris trois sections différentes à analyser, en commençant par l'extrémité de la peau jusqu'au côté en contact avec l'os. L'une des hypothèses était que la peau du poisson puisse agir comme une barrière contre la diffusion du sel. Des études chimiques ont été réalisées pour mesurer la quantité de sel (% des ions Na et Cl) par chromatographie, sur les différentes parties des muscles prélevés.

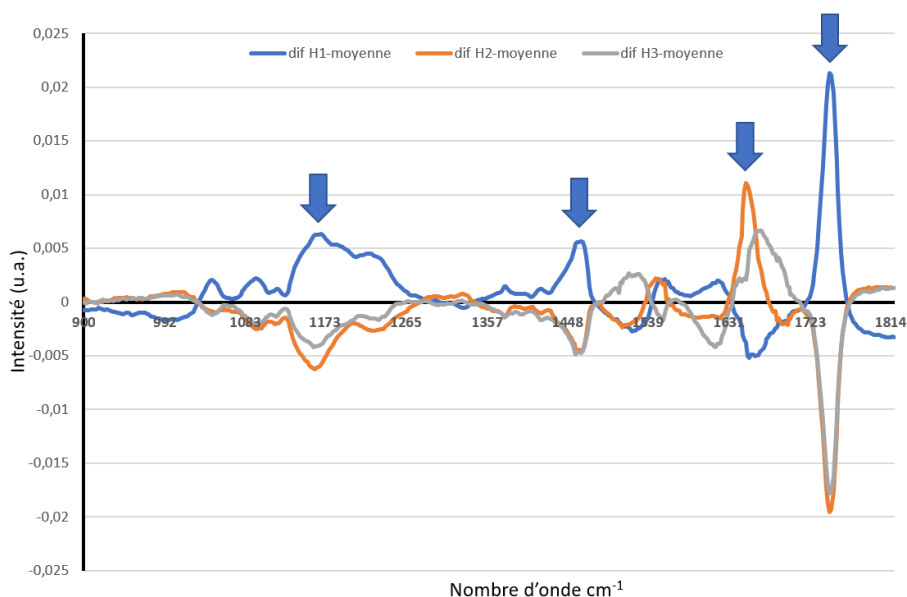


Figure 22. Graphique montrant les différences entre chaque zone H1, H2, H3 contre la moyenne des spectres.

La **Figure 22** montre une intensité dans la région des acides gras (1747 cm^{-1}) prédominante dans la zone H1. Ceci peut s'expliquer par la présence d'une quantité de lipides plus importante dans cette zone, par rapport à H1 et H2. De même, pour la zone H1, les bandes de plus grande intensité sont observées à 1164 cm^{-1} provenant principalement du mode d'étirement C-O. La bande à 1463 cm^{-1} est quant à elle représentée par les lipides saturés en CH_2 . Ceci est conforme avec l'anatomie de la truite, puisque l'on sait qu'il y a une grande quantité de tissu adipeux sous la peau du poisson. A l'inverse, pour les zones H2 et H3, notre analyse révèle un signal plus fort associé aux protéines (1635 cm^{-1} , 1654 cm^{-1} , 1670 cm^{-1}).

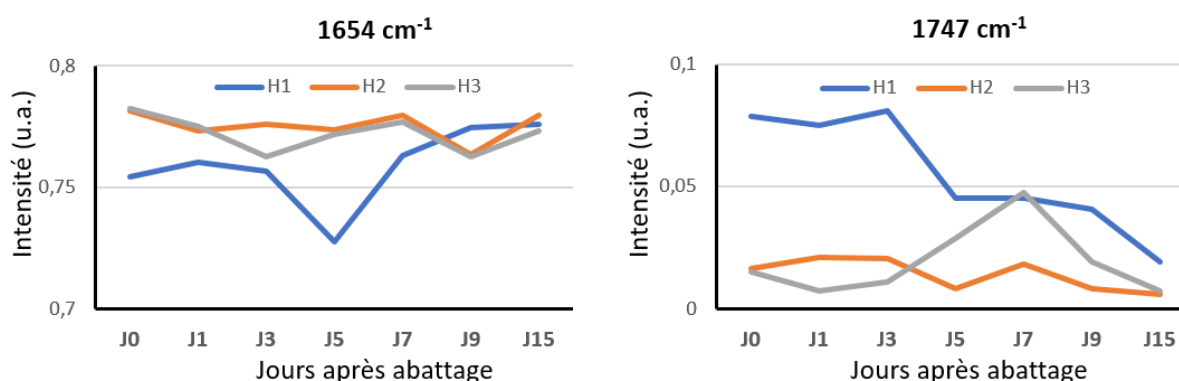


Figure 23. Graphique montrant les variations d'intensité spectrale à 1654 cm⁻¹ (Amide I) et 1747 cm⁻¹ (Étirement C=O des esters : acides gras libres) en fonction du temps post-mortem.

Les évolutions décrites ci-dessus peuvent être représentées graphiquement au cours du temps post-mortem (**Figure 23**). Ces différences de composition chimique, au-delà de la dépendance aux irrégularités de la forme du filet, pourraient en partie être attribuées à l'effet dit de « salting in » et « salting out ». Cet effet se produit dans des solutions à forte force ionique et se traduit par une réduction de la solubilité moléculaire, entraînant une déstabilisation de certaines protéines (Hyde *et al.* 2017). Dans le muscle de viande, l'ajout de NaCl augmente la force ionique du tissu, entraînant une solubilisation partielle des protéines myofibrillaires, en particulier la myosine, qui dépolymérise les filaments épais (Astruc *et al.* 2018, Offer et Knight, 1988).

5.3.2 - Effet du salage sur la structure du muscle

Dans cette partie, l'effet du salage a été étudié et comparé à celui obtenu sur des échantillons qui n'ont pas été salés afin d'observer les changements qui peuvent être attribués à l'ajout de NaCl dans le muscle, tant au niveau de la structure cellulaire que de l'ultrastructure. Pour cette étude, le salage a été effectué sur chaque darne, à chaque temps. La structure du muscle a tout d'abord été étudiée par une approche histologique. La **Figure 24** montre des coupes histologiques colorées au bleu de toluidine afin de visualiser de possibles variations à différents temps post-mortem. Nous observons que l'espace extracellulaire dans les échantillons J7 et J15 est assez faible, ce qui pourrait être attribué au gonflement des cellules musculaires induit par le salage. D'ailleurs, un effet opposé peut être observé dans J0 où cette diminution est moins marquée car le salage a été effectué avant que l'échantillon n'entre en *rigor mortis*.

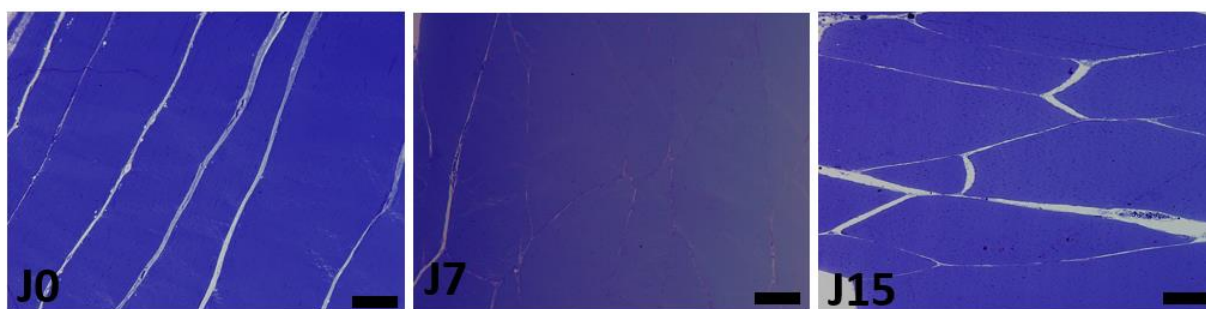


Figure 24. Coupes semi-fines longitudinales des échantillons salés colorées au bleu de toluidine à J0, J7 et J15. Barre d'échelle = 50 μ m

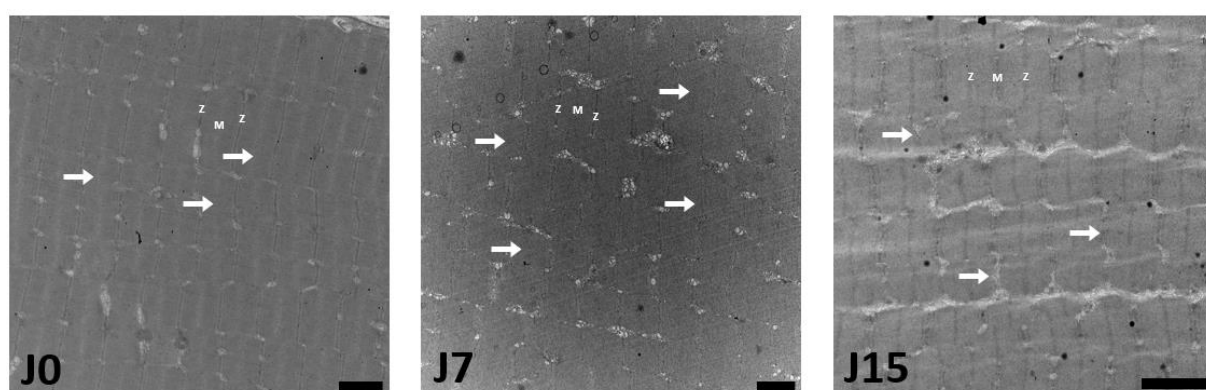


Figure 25. Coupes longitudinales des échantillons salés à J0, à J7 et à J15. Z : ligne Z, M : ligne M. Barre d'échelle = 2 μ m

Nous avons ensuite étudié les variations de l'ultrastructure, par microscopie électronique.

La **Figure 25** montre la disparition de la ligne M (flèches) aux trois temps (J0, J7, J15). Il semble que les protéines composant la ligne M, principalement composées de la protéine M et de la myomesine, ont été extraites et dénaturées à cause du salage. Nos observations ont montré que la solubilisation de ces protéines myofibrillaires a été associée aux modifications de leur structure moléculaire (Böcker *et al.* 2006 ; Pinotti *et al.* 2006 ; Wu *et al.* 2006) qui affectent l'organisation structurale des composants des fibres musculaires.

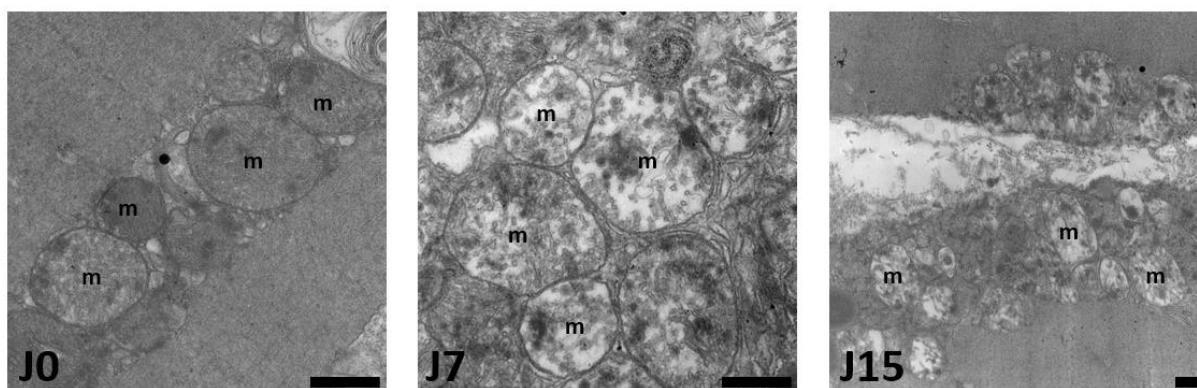


Figure 26. Mitochondries (m) des échantillons salés à J0, J7 et à J15. Barre d'échelle = 500 nm

Nous observons sur la **Figure 26** que les mitochondries apparaissent plus compactes et les crêtes bien visibles. En revanche, à J7 et J15, les crêtes ont pour la plupart disparu tandis que les mitochondries présentent une dégradation encore plus importante, observant ainsi une déformation légère de leur structure.

5.4 - Comparaison des structures sur les échantillons salés et non salés.

Des espaces entre les myofibrilles ont été observés sur les échantillons non salés à J7 et J15. De plus, des ruptures myofibrillaires ont été observées sur l'échantillon J15. Ces phénomènes n'ont pas été observés dans les échantillons salés. Ces résultats sont en accord avec Roy *et al.* (2012). L'addition du sel entraîne une absorption des ions Cl^- par la myosine qui limite la formation d'espaces intermyofibrillaires et de ruptures myofibrillaires (Böcker *et al.* 2008).

L'état amorphe des sarcomères observé sur les échantillons salés, pourrait être attribué à l'extraction/solubilisation des protéines myofibrillaires (Offer et Trinick, 1983). De plus, les lignes Z délimitant les sarcomères semblent absentes à cause du salage. Par conséquent, les sarcomères sont difficilement distinguables les uns des autres. Ces phénomènes ont été observés instantanément après l'ajout de sel. Ces résultats suggèrent que le sel dénature les protéines entraînant la destructuration des sarcomères.

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'imagerie par microscopie électronique a permis d'observer des variations de structure au cours du temps sur la truite. La dénaturation des protéines peut ainsi être visible à la fois l'effet post-mortem et l'effet de l'ajout de sel au muscle. Les mesures de protéolyse réalisées auparavant ne montraient pas d'évolution significative au cours du temps.

La microscopie électronique a également permis d'observer réellement les phénomènes de protéolyse, qui s'avère limitée dans ce type de tissu (truite). Nous pouvons cependant imaginer que ces résultats obtenus en phase expérimentale au laboratoire sont une situation « idéale » pour les tissus et que des poissons prélevés en industries présenteraient davantage de dénaturation protéique, due aux chocs et contraintes du stockage et du transport.

L'accumulation de métabolites est si importante qu'un seul indicateur n'est pas suffisant pour évaluer la qualité des produits de la mer. Cependant, dans ce travail plusieurs biomarqueurs d'intérêt (ex. nucléotides, lipides, ...) ont été identifiés. Ces biomarqueurs présentent de très bonnes corrélations. Le fait de savoir que les effets post-mortem chez les poissons dépendent de divers facteurs *antemortem* et post-mortem peut compliquer la recherche de mécanismes spécifiques pour déterminer la fraîcheur chez les poissons.

Un des enjeux pour les industriels est de développer des spectromètres de terrain, avec des marqueurs spécifiques identifiés, afin de caractériser la fraîcheur des produits *in situ*.

D'autres méthodes pourraient être appliquées en plus des biomarqueurs, comme la caractérisation de la contribution des protéases aux changements autolytiques post-mortem. Cette méthode nécessiterait de démontrer que chaque enzyme est active dans le muscle.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Al-Jowder O., Defernez, M., Kemsley, E. K., et Wilson, R. H., 1999. Mid-infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3210–3218.
2. Astruc T., Desfrétières A., Vénien A., 2018. Histological Study of Ultrastructural Changes in Muscle Exposed to Various Concentrations of NaCl Brine. *Journal of Food Science*, 83(5), 1221–1228.
3. Azam K., Mackie I. M., Smith J., 1990. The effect of slaughter method on the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during storage on ice. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 24, 69-79.
4. Bendall J. R., 1973. Post mortem changes in muscle. *New York: Academic Press*. H. Bourne, pp. 243–309
5. Berthereau A., 1995. Les matériaux vitreux pour l'optique non linéaire : - étude des verres à base d'oxyde de tellure a fort effet Kerr optique- le phénomène de génération de seconde harmonique dans un verre. *Matériaux*. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 1995. Français. fftel-00148451f
6. Bessard L. (1996) Salage/séchage à sec du saumon : étude des phénomènes d'imbibition des cristaux de sel et de sucre. Optimisation du procédé sur filets de saumon. Mémoire Université Technique de Compagne, CIRAD-SAR, Montpellier. 59 p.
7. Böcker U., Kohler A., Aursand I., et Ofstad R., 2008. Effects of Brine Salting with Regard to Raw Material Variation of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Investigated by Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(13):5129-37. doi: 10.1021/jf703678z.
8. Böcker U., Ofstad R., Bertram H. C., Egelanddal B., Kohler A., 2006. Salt-Induced Changes in Pork Myofibrillar Tissue Investigated by FT-IR Microspectroscopy and Light Microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6733–6740.
9. Boggio S.M., Hardy R.W., Babbitt J. K., Brannon E.L., 1985. The Influence of dietary lipid source and alphanatocopherol acetate level on product quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 51, 13-24.
10. Bowlus R., et Somero G., 1979. Solute compatibility with enzyme function and structure. Rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism. *Journal of Experimental Zoology*, 208(2), 137–151.
11. Caballero M.J., Betancor M., Escrig J.C., Montero D., Espinos de los Monterosa A., Castro P., 2009. Post-mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 291:210–216.
12. Cachelou F., 1980. Technologies appropriées à la conservation du poisson dans les pays en voie de développement : application aux pays africains. Mémoire ENSAR, Centre International pour le Développement de la Pêche et de l'Aquaculture, Paris. 111 p.
13. Candogan K., Evrim G., et Naşit İ., 2021. Authentication and Quality Assessment of Meat Products by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Food Engineering Reviews* 13. doi: 10.1007/s12393-020-09251-y.
14. Carton I., Bocker U., Ofstad R., Sorheim O., Kohler A., 2009. Monitoring Secondary Structural Changes in Salted and Smoked Salmon Muscle Myofiber Proteins by FT-IR Microspectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3563-3570. doi:Doi 10.1021/Jf803668e
15. Delbarre-Ladrat C., Romuald C., Taylor R., et Verrez-Bagnis V., 2006. Trends in Postmortem Aging in Fish: Understanding of Proteolysis and Disorganization of the Myofibrillar Structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(5):409-21. doi: 10.1080/10408390591000929.

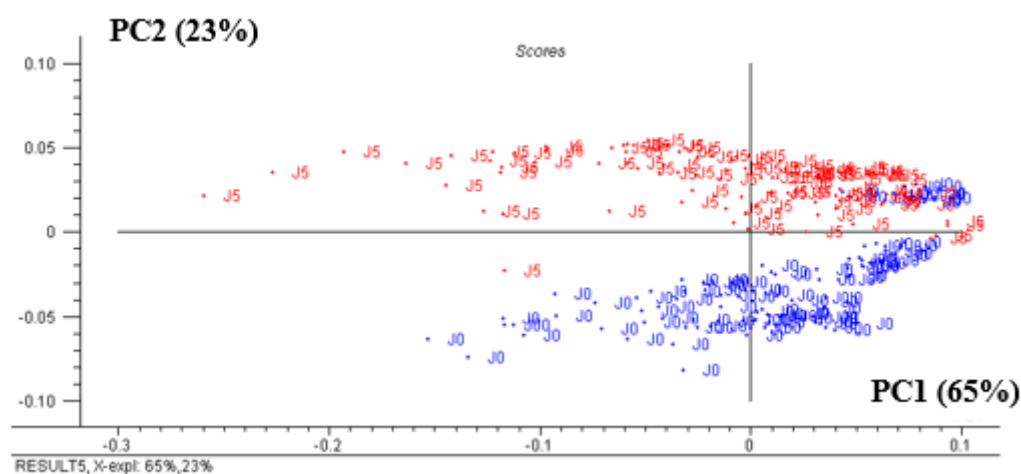
16. Dovbeshko G.I., Gridina N.Y., Kruglova E.B., Paschuk O.P., 2000. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta* 53: 233–246
17. Eckel R., Huo H., Guan H. W., Hu X., Che X., Huang W. D., 2001. Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue. *Vibrational Spectroscopy*, 27(2), 165-173.
18. Elias M., Laranjo M., Agulheiro-Santos A. C., Potes M. E., 2019. The role of salt on food and human health.
19. Etablissement National des Produits de l'agriculture et de la mer. France Agrimer, 2020. Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2019. https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/67093/document/STA_MER_CONSO_2020.pdf?version=3
20. Evans T. G. et Kültz D., 2020. The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*. 2020. 333 (6), pp. 421-435.
21. Fabian H., Thi N., Eiden M., Lasch P., Schmitt J., Naumann D., 2006. Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections using IR-microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1758: 874–882
22. FAO, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, 2009. *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792).
23. Fauconneau B., Chmaitilly J., André S., Cardinal M., Cornet J., Vallet J. L., Dumont J.P., Laroche M., 1993a. Caractéristiques de la chair de la truite arc en ciel : 1-composition chimique et cellularité du muscle et des tissus adipeux. *Sciences des Aliments*, 13, 173-187.
24. Fauconneau B., Chmaitilly J., André S., Cardinal M., Cornet J., Vallet J. L., Dumont J.P., Laroche M., 1993b. Caractéristiques de la chair de la truite arc en ciel : 2- Caractéristiques de la chair de truite arc en ciel. *Sciences des Aliments*, 13, 189-199.
25. Faure A., 1989. Effet des techniques d'élevage sur les caractéristiques du produit et l'aptitude de la truite arc en ciel à la transformation. *Pisciculture Fr.*, 102, 4-100.
26. Filgueras R., Peyrin F., Vénien A., Hénot J. M., Astruc T., 2016. Sodium Chloride Diffusion during Muscle Salting Evidenced by Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy Imaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(3), 699–705.
27. Gasteau A., 2015. Contribution à une approche intégrée pour la prévention de la flavobactériose dans les élevages de truites arc-en-ciel. Biodiversité et Ecologie. Université de Bordeaux. 261 p.
28. Guillén M. D., et Cabo N., 2004. Study of the Effects of Smoke Flavours on the Oxidative Stability of the Lipids of Pork Adipose Tissue by Means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Meat Science* 66(3):647-57. doi: 10.1016/S0309-1740(03)00185-2.
29. Hallett I. C., et Bremner H., 1988. Fine Structure of the Myocommata-Muscle Fibre Junction in Hoki (*Macruronus Novaezelandiae*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 44(3):245-61. doi: 10.1002/jsfa.2740440306.
30. Ham A.W., et Cormack D.H., 1979. *Histology* (8th edn). J.B. Lippincott, Philadelphia, PA, p. 118.
31. Hegarty D., et Benson E.S., 1978. Ultrastructural differences in mitochondria of skeletal muscle in the prerigor and rigor states. *Experientia* 34:1070–1071.
32. Hyde A. M., Zultanski S., Waldman J., Zhong Y., Shevlin M., et Peng F., 2017. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Organic Process Research & Development* 21(9):1355-70. doi: 10.1021/acs.oprd.7b00197.

33. Jiang Q., Jia R., Nakazawa N., Hu Y., Osako K., Okazaki E., 2019. Changes in protein properties and tissue histology of tuna meat as affected by salting and subsequent freezing. *Food Chemistry*. 15 janvier 2019. 271, pp. 550-560.
34. Karoui R., Downey G., et Blecker C., 2010. Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure–Quality Relationships – A Review. *Chemical Reviews* 110(10):6144-68. doi: 10.1021/cr100090k.
35. Kervinio A., 1997. Les techniques de transformation du poisson sur la côte Atlantique africaine : le développement du salage-séchage-fumage à destination locale. Montpellier : Synthèse bibliographique (Diplôme d'études supérieures spécialisées productions animales en régions chaudes).
36. Kiessling A., Storebakken T., Asgard T., Kiessling K. H., 1991. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 93, 335-356.
37. Knockaert C., 2002. Comparaison du salage par injection au mode par immersion sur du hareng fume de manière traditionnelle et électrostatique. *Rapports internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER*. Laboratoire de Génie Alimentaire DRV 02/ 06NP/Nantes
38. Konermann L., 2012. Protein Unfolding and Denaturants. In eLS, (Ed.).
39. Larrea-Wachtendorff D., Tabilo-Munizaga G., Moreno-Osorio L., Villalobos-Carvajal R., et Pérez-Won M., 2015. Protein Changes Caused by High Hydrostatic Pressure (HHP): A Study Using Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Food Engineering Reviews* 7(2):222-30. doi: 10.1007/s12393-015-9107-1.
40. Leblanc E. L., Leblanc R. J., 1989. Separation of cod (*Gadus morhua*) fillet proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. *Journal Food Science*, 54, 827-834.
41. Lecellier A., 2013. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Université de Reims Champagne-Ardenne. École Doctorale Sciences Technologie Santé. 194 p.
42. Lefevre F., Paboeuf G., Guitton N., Morzel M., 2007. Recherche de marqueurs protéiques associés à un défaut de fermeté de la chair de truite suite à un stress à l'abattage. *Premières journées recherche filière piscicole*. Paris. 2007. pp. 1.
43. Lieber C. A., et Mahadevan-Jansen A., 2003. Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra. *Appl. Spectrosc.* 57, 1363–1367
44. Listrat A., Lebreton B., Louvequin I., Astruc T., Bonnet M., Lefaucheur L., Bugeon J., 2015. Comment la structure et la composition du muscle déterminent la qualité des viandes ou chairs. *INRA Productions Animales*. 28 (2). 125-136.
45. Machado T. M., Tabata Y. A., Takahashi N. S., Casarini L. M., Neiva C. R. P., Henriques M. B., 2016. Caviar substitute produced from roes of rainbow trout. (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Scientiarum. Technology*, 38(2), 233–240.
46. Magnussen M.S., Rosjo C., 1989. Different fats in feed for salmon. Influence on sensory parameters, growth rate and fatty acids in muscle and heart. *Aquaculture*, 79, 129-135.
47. Nucciotti V., Stringari C., Sacconi L., Vanzi F., Fusi L., Linari M., Piazzesi G., Lombardi V., Pavone F. S., 2010. Probing myosin structural conformation in vivo by second-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 27 avril 2010. 107(17), 7763-7768.
48. Offer G., Knight P., Jeacocke R., Almond R., Cousins T., Elsey J., Parsons N., Sharp A., Starr R., et Purslow P., s. d. The Structural Basis of the Water-Holding, Appearance and Toughness of Meat and Meat Products. 22.

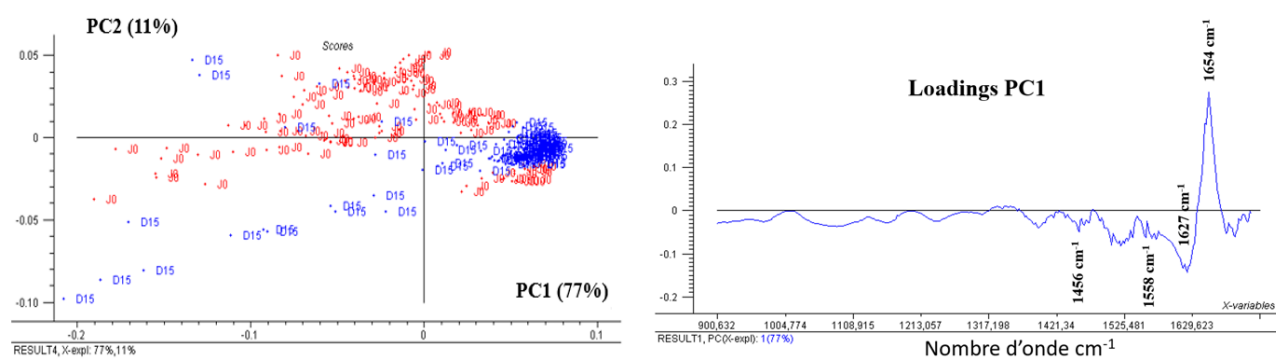
49. Offer G., Trinick J., 1983. On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Sci.*, 8, 245–281.
50. Ofstad R., Egelanddal B., Kidman S., Myklebust R., Olsen R., et Hermansson A. M., 1996. Liquid Loss as Effected by Post-Mortem Ultrastructural Changes in Fish Muscle: Cod (*Gadus Morhua*L) and Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71(3):301-12. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199607)71:3<301::AID-JSFA583>3.0.CO;2-0.
51. Ogawa M., Nakamura S., Horimoto Y., An H., Tsuchiya T., et Nakai S., 1999. Raman Spectroscopic Study of Changes in Fish Actomyosin during Setting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(8):3309-18. doi: 10.1021/jf9813079.
52. Paluszkiwicz C., Kwiatek W. M., 2001. Analysis of human cancer prostate tissues using FTIR microspectroscopy and SRIXE techniques. *Journal of Molecular Structure*, 565, 329-334.
53. Panina Y., Germond A., Shinji M., et Tomonobu M. W., 2018. Validation of Common Housekeeping Genes as Reference for QPCR Gene Expression Analysis During IPS Reprogramming Process. *Scientific Reports* 8(1):8716. doi: 10.1038/s41598-018-26707-8.
54. Pena A. M., 2006. Génération de seconde harmonique par le collagène et application à l'étude de fibroses par microscopie multiphoton. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole Polytechnique X, 2006. Français. ffpastel-00002033f
55. Perisic N., Afseth N.C., Ofstad R., et Kohler A., 2011. Monitoring Protein Structural Changes and Hydration in Bovine Meat Tissue Due to Salt Substitutes by Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(18):10052-61. doi: 10.1021/jf201578b.
56. Petit G., Jury V., de Lamballerie M., Duranton F., Pottier L., Martin J. L., 2019. Salt intake from processed meat products: Benefits, risks and evolving practices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1453–1473.
57. Pinotti A., Graiver N., Califano A., et Zaritzky N., 2002. Diffusion of Nitrite and Nitrate Salts in Pork Tissue in the Presence of Sodium Chloride. *Journal of Food Science* 67(6):2165-71. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09521.x.
58. Poissonnerie et produits de la mer : utilisation du sel, 2019. Sels de France - Acteurs et producteurs [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.selsdefrance.org/sel-et-savoir-faire/sel-et-alimentation/poissonnerie-et-produits-de-la-mer/>
59. Pornrat S., Rommanee S., et Kerr W.L., 2007. Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachium rosenbergii*) during cold storage. *LWT – Food Sci Technol* 40:1747–1754.
60. Proctor M. R. M., Ryan J. A., Mc Loughlin J.V., 1992. Effets des méthodes d'abattage sur le muscle squelettique et la qualité des poissons d'élevage. In : International Conference Upgrading and Utilisation of Fishery Products [en ligne]. 1992. Disponible à l'adresse : <http://www.ifremer.fr/consult.php?ID=1992-0052>
61. Røra A. M. B., Furuhaug R., Fjæra S.O., Skjervold P.O., 2004. Salt diffusion in pre-rigor filleted Atlantic salmon. *Aquaculture*, (232), 255–263.
62. Roy B. C., Ando M., Itoh T., et Tsukamasa Y., 2012. Structural and Ultrastructural Changes of Full-Cycle Cultured Pacific Bluefin Tuna (*Thunnus Orientalis*) Muscle Slices during Chilled Storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(8):1755-64. doi: 10.1002/jsfa.5542.
63. Ruste J., 2015. Microscopie électronique à balayage - Principe et équipement. Techniques d'analyse [en ligne]. Août 2015. DOI 10.51257/a-v3-p865. Disponible à l'adresse : <https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v3/p865>

64. Sánchez-Alonso I., Martínez I., Sánchez-Valencia J., et Careche M., 2012. Estimation of Freezing Storage Time and Quality Changes in Hake (*Merluccius Merluccius*, L.) by Low Field NMR. Food Chemistry 135(3):1626-34. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.038.
65. Sun X. D., et Holley R. A., 2011. Factors influencing gel formation by myofibrillar proteins in muscle foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10 (1), 33–51.
66. Taylor R. G., Geesink G., Thompson V., Koohmaraie M., et Goll D., 1995. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? Journal of Animal Science 73(5):1351-67. doi: 10.2527/1995.7351351x.
67. Taylor R., F. S., and Skjervold P., 2002. Salmon fillet texture is determined by myofibre–myofibre and myofibre–myocommata attachment. J Food Sci 67:2067–2071.
68. Toldra F., Flores M., 1998. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38(4), 331–352.
69. Université de Montpellier, 1965. MET. Microscopie électronique et analytique [en ligne]. 1965. Disponible à l'adresse : <https://mea.edu.umontpellier.fr/met/>
70. Wang D, Tang J, Correia LR. 2000. Salt diffusivities and salt diffusion in farmed Atlantic salmon muscle as influenced by rigor mortis. J Food Eng, (43), 115–123.
71. Wang D., Tang J, Correia LR, Gill TA. 1998. Postmortem changes of cultivated Atlantic salmon and their effects on salt uptake. J Food Sci, (63), 634–637.
72. Wei W., Hu W., Zhang X., Zhang F., Sun S., Liu Y., et Xu C., 2018. Analysis of Protein Structure Changes and Quality Regulation of Surimi during Gelation Based on Infrared Spectroscopy and Microscopic Imaging. Scientific Reports 8(1):5566. doi: 10.1038/s41598-018-23645-3.
73. Wood B.R., Chiriboga L., Yee H., Quinn M.A., McNaughton D., Diem M., 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. Gynaecol Oncol 93: 59–68
74. Wrogemann K., et Pena S. D., 1976. Mitochondrial Calcium Overload: A General Mechanism for Cell-Necrosis in Muscle Diseases. Lancet (London, England) 1(7961):672-74. doi: 10.1016/s0140-6736(76)92781-1.
75. Wu J. G., Xu Y. Z., Sun C. W., Soloway R. D., Xu D. F., Wu Q. G., Xu G. X., 2001. Distinguishing malignant from normal oral tissues using FTIR fiber-optic techniques. Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 62(4), 185-192.
76. Wu Z. Y., Bertram H. C., Kohler A., Böcker U., Ofstad R., Andersen H. J., 2006. Influence of aging and salting on protein secondary structures and water distribution in uncooked and cooked pork. A combined FT-IR microspectroscopy and H-1 NMR relaxometry study. J. Agric. Food Chem., 54, 8589–8597.
77. Yadav B. S., Ali I., Kumar P., Yadav P., 2007. FTIR and laserraman spectra of 2-hydroxy-5-methyl-3-nitro pyridine. IndianJournal of Pure and Applied Physics, 45,979–983.
78. Yu P., 2005. Protein secondary structures (α -helix and β -sheet) at a cellular level and protein fractions in relation to rumen degradation behaviors of protein: A new approach. Br. J. Nutr, 94, 655–665.
79. Zhang C., Xiang-ao L., Wang H., Xia X., et Kong B., 2020. Ultrasound-Assisted Immersion Freezing Reduces the Structure and Gel Property Deterioration of Myofibrillar Protein from Chicken Breast. Ultrasonics Sonochemistry 67:105137. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105137.

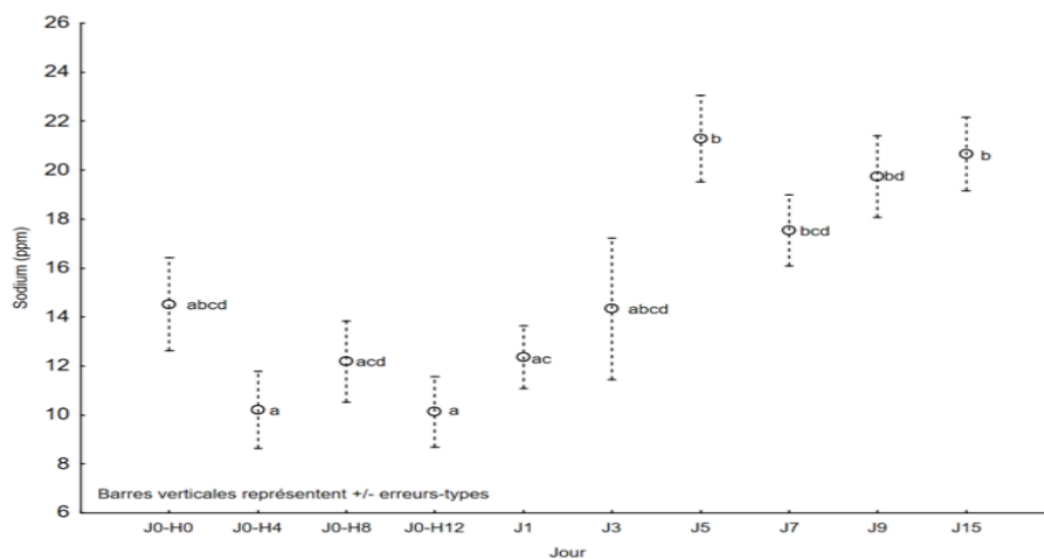
8. ANNEXES



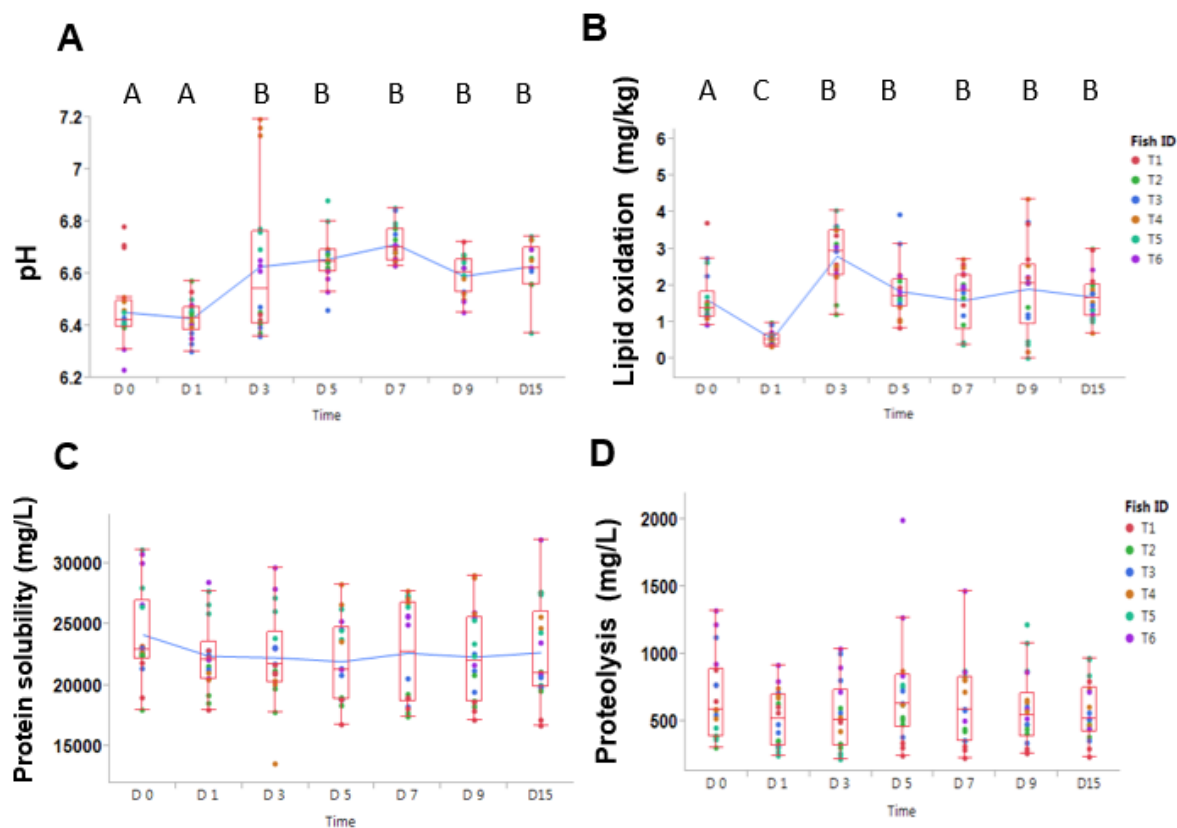
Annexe 1. ACP des cellules de muscles de truites prélevées à J0 (en bleu) et J5 (en rouge) après abattage.



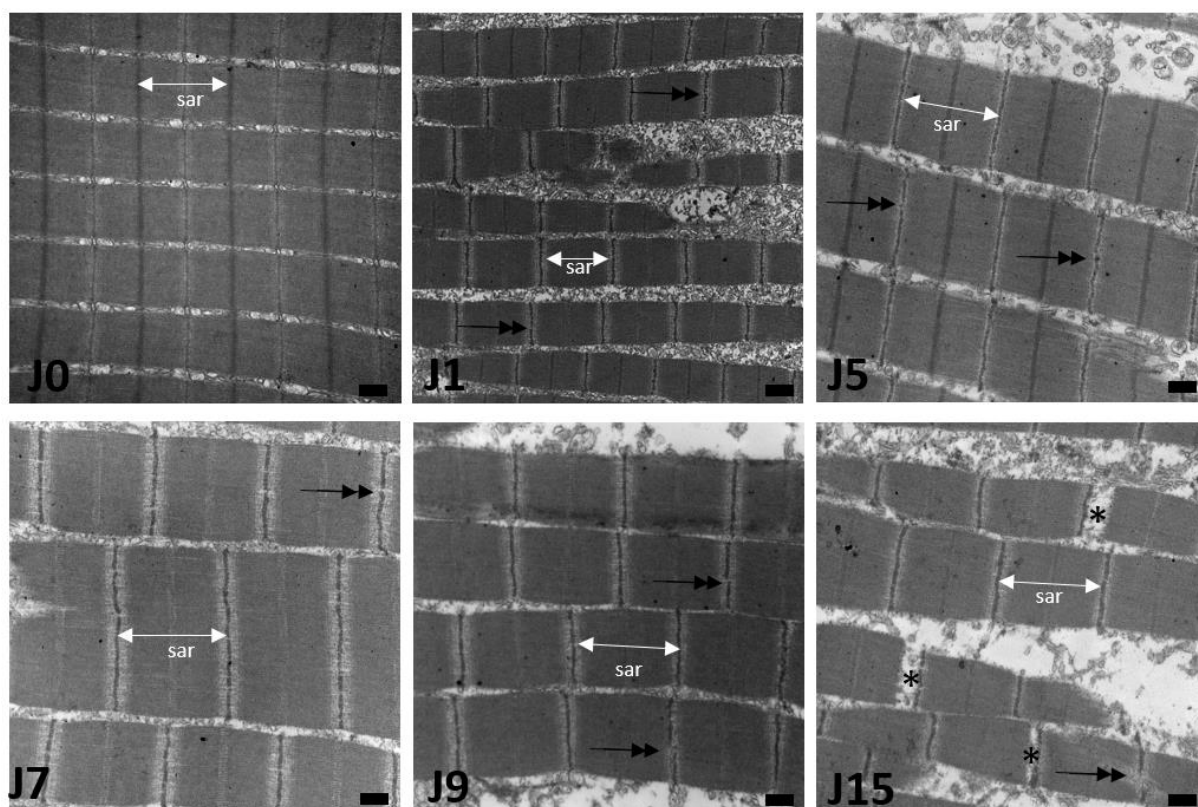
Annexe 2. ACP et PC1 des cellules de muscles de truites prélevées à J0 (en rouge) et J15 (en blue) après abattage.



Annexe 3. Effet du stade post-mortem de salage sur la concentration en sodium.



Annexe 4. Résultats des études de pH, oxydation de lipides, solubilité des protéines et protéolyses dans la truite.



Annexe 5. Coupes longitudinales des échantillons non salés au cours de temps post-mortem (sar, sarcomère. Barre d'échelle = 500 nm. Les flèches indiquent des espaces intermyofibrillaires réguliers (J0) et larges (J7, J9, J15). Ceci montre que l'espace intermyofibrillaire augmente avec la durée de la période de stockage et pourrait être le résultat d'un réticulum sarcoplasmique perturbé et gonflé. Certaines zones (*) ont montré une perte de myofibrilles dans les zones de la bande I à J15.

 	Diplôme : Master 2 NSA
Auteur/e : Brayan Castulovich	Structure d'accueil : Institut National de la Recherche Agronomique et de l'environnement
Nombre de pages : 55 Annexes : 3	Unité Qualité des Produits Animaux - QuaPA
Année de soutenance : 2022	Adresse : 63122 Saint-Genès-Chamapnelle Maître de stage : Arnaud Germond/Thierry Astruc
Titre : Impact de l'état de fraîcheur et du salage sur l'ultrastructure et la composition du muscle de truite (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Title: Impact of freshness and salting on the ultrastructure and composition of trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) muscle	
Résumé : Les industriels de la transformation des produits marins font face à une variabilité de leur matière première importante qui dépend des dates et lieu d'approvisionnement et qui ne peut pas être réduite. Cette variabilité est susceptible d'impacter les procédés de transformation ou la qualité des produits finis. Ce dans ce contexte que le projet INNOSALT a été créé en visant la compréhension de l'impact du mode de salage en optimisant les teneurs en sel et améliorant la qualité des effluents salins. Ce travail a été réalisé pour étudier l'évolution post-mortem (biochimique et structurale) de la chair de truite causée par l'abattage et le salage dans le but d'investiguer le rôle de l'état de fraîcheur sur la diffusion du sel par des méthodes de pointe tels que la microscopie électronique en transmission et la microspectroscopie infrarouge. Les résultats obtenus montrent des variations de structure au cours du temps. La dénaturation des protéines peut ainsi être visible à la fois l'effet post-mortem et l'effet de l'ajout de sel au muscle. L'identification de plusieurs biomarqueurs d'intérêt (nucléotides, lipides) ont été constatés. La microscopie électronique a permis d'observer réellement de phénomènes de protéolyse, mais qui s'avèrent limités dans ce type de tissu (truite).	
Abstract: The seafood industry is facing a significant variability of their raw material which depends on the dates and place of supply and cannot be reduced. This variability is likely to impact the transformation processes or the quality of the finished products. It is in this context that the INNOSALT project was created to understand the impact of the salting process by optimizing the salt content and improving the quality of the saline effluents. This work was carried out to study the post-mortem evolution (biochemical and structural) of trout flesh caused by slaughtering and salting in order to investigate the role of freshness state on salt diffusion through state-of-the-art methods such as transmission electron microscopy and infrared microspectroscopy. The results obtained show structural variations over time. The denaturation of proteins can thus be seen both the post-mortem effect and the effect of salt addition to the muscle. Several biomarkers of interest (nucleotides, lipids) were identified. Electron microscopy allowed to observe real proteolysis phenomena, but which are limited in this type of tissue (trout).	
Mots-clés : post-mortem, structure, truite, salage, MET, FTIR Key Words: postmortem, structure, trout, salting, TEM, FTIR	