

# OXYDATION DES PROTEINES

- cause de nombreuses modifications physico-chimiques:
  - Perte de solubilité des protéines
  - Perte d'activité enzymatique
  - Impacte sur la digestibilité
  - 4 Modes d'action de l'oxydation des protéines

## Mode d'action de l'oxydation des protéines

- 1) Oxydation directe de la chaîne latérale des acides aminés.
- 2) Fragmentation du squelette peptidique.
- 3) Réaction avec les sucres réducteurs
- 4) Fixation avec des composées carbonylés non protéiques.

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



- Substances réactives à l'oxygène: **ROS**
- Exple:  $\cdot\text{OH}$ ;  $\text{O}\cdot_2$ ;  $\text{RS}\cdot$ ;  $\text{ROO}\cdot$ ;  $\text{RS}\cdot$ ;  $\text{ROO}\cdot$ .
- **Cations de métaux:** ( fer, cuivre)
- → catalysent la capture d'un atome d'hydrogène (résidu d'AA)
- → **Formation de radical protéique:**
- **P .**

- Converti en radical péroxyle (**POO**) en présence d'oxygène et
- en alkyle peroxyde (**POOH**) par capture d'un atome d'hydrogène à partir d'une autre molécule.
- Les réactions avec  $H_2O$ .  
provoquent la formation d'un radical alcoxyle ( $PO\cdot$ ) et son dérivé hydroxyle ( $POH$ )

- Les substances réactives à l'oxygène (**ROS**) habituellement présentes dans les produits carnés sous forme de **·OH**, **O<sub>2</sub>·**, **RS·**, **ROO·**, des cations de métaux (fer, cuivre) peuvent également catalyser la capture d'un atome d'hydrogène à partir de résidu d'un AA et provoque la formation d'un radical protéique (P·).

- I/ Acides aminés ciblés
- L'oxydation des protéines par les radicaux libres concerne 3 classes d'acides aminés :
  - les acides aminés basiques,
  - les acides aminés soufrés
  - les acides aminés aromatiques.



- **1-1 Les acides aminés (AA) basiques (lysine, histidine, arginine)**
- **Particularité:** présence des fonctions **amines libres** (NH ou NH<sub>2</sub>) sur leurs chaînes latérales → sensibles à l'oxydation.
- En présence des métaux tels que le fer ou le cuivre. Ces AA subissent une **désamination oxydative** conduisant **à la formation des groupements carbonyles**.
- Les aldéhydes spécifiques de l'oxydation de la lysine et de l'arginine ont été identifiés par des méthodes basées sur la spectrométrie de masse.

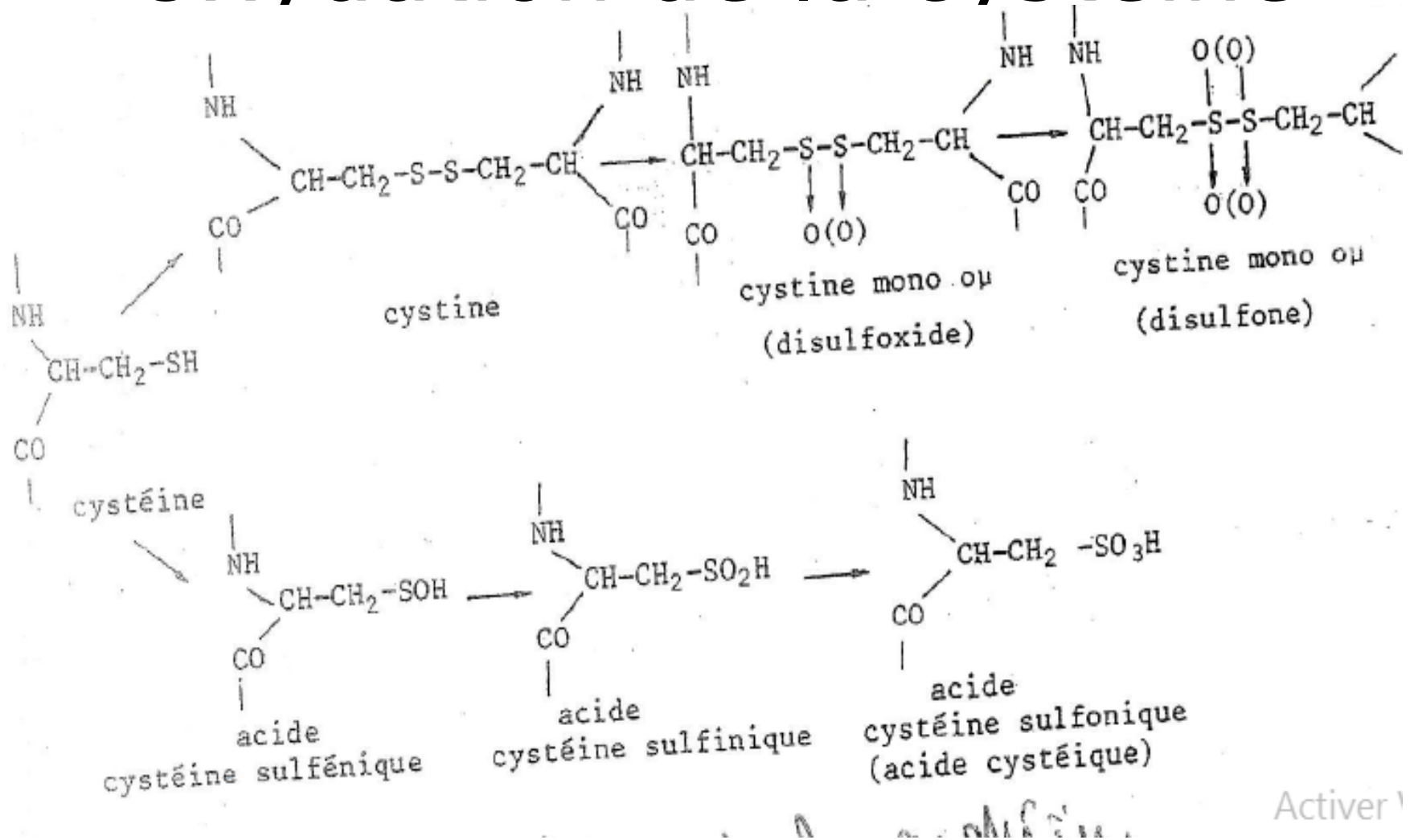
- Il s'agit de semialdéhydes :  $\alpha$ -aminoadipique et  $\gamma$ -glutamique (AAS et GGS, respectivement).
- L'AAS est obtenu suite à l'oxydation de la lysine et le GGS issu de l'oxydation de l'arginine.
- Ce sont des composés actifs qui peuvent être impliqués dans plusieurs réactions chimiques, avec des conséquences sur la qualité de la viande.
- Ces semialdéhydes représentent près de **70% des aldéhydes formés**.

- Les groupements carbonyles ainsi formés peuvent réagir avec les fonctions amines libres (**non oxydées**) de la lysine pour former des liaisons amides (-CO -NH-).
- Ces liaisons amides sont impliquées dans les phénomènes de pontage des chaînes peptidiques pouvant conduire à la polymérisation et à l'agrégation des protéines. Ces acides aminés sont des acides aminés indispensables.
- **Leur oxydation va donc conduire à une perte de la qualité nutritionnelle des produits.**
-

## 1- 2 acides aminés soufrés (la cystéine)

- **Sensibles aux attaques radicalaires** : l'oxydation de la cystéine entraîne la formation des ponts disulfure (**Cys -S-S-Cys**) entre les chaînes peptidiques.
- Ces ponts disulfure intra- ou inter chaînes peuvent conduire à l'agrégation des protéines, s'ils sont formés entre deux protéines différentes.
- L'oxydation de la méthionine va donner de la méthionine sulfone et de la méthionine sulfoxyde.
-

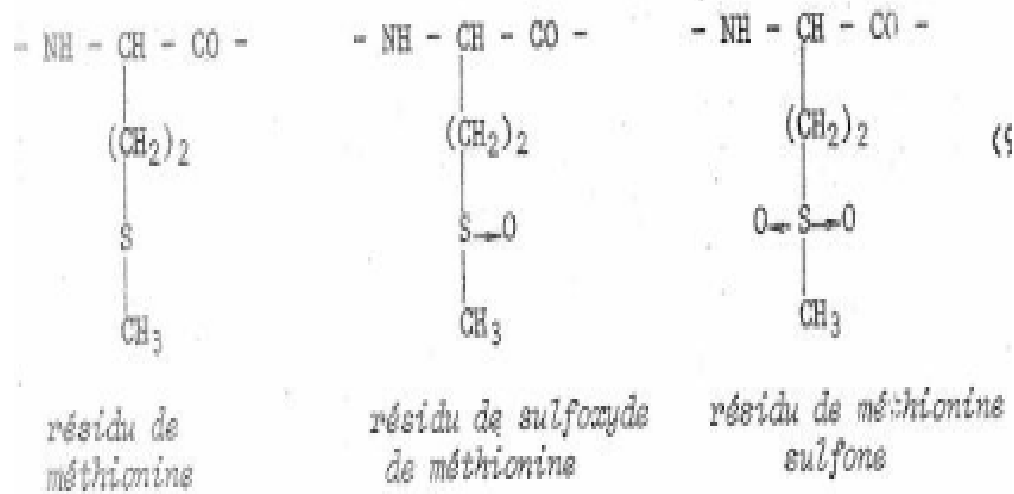
# Oxydation de la cysteine



Activat

- Les dérivés de l'oxydation de la cystéine et de la cystine sont nombreux.
- Leur identification est difficile car instables.
- L'oxydation de la cystéine nous conduit à la cystine (**pont S-S**), réaction réversible.
- **Du point de vue nutritionnel:**
- Mono et disulfoxyde de la L cystine, acide cystéine sulfénique peuvent remplacer la **L cystéine**

# Résidu de Méthionine



# Résidu de Méthionine(suite)

- Les agents oxydants puissants comme l'acide performique ( $\text{HCOOOH}$ ) sont capables d'oxyder la Méthionine en Méthionine sulfone.
- Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 0,5M à 50°C durant 30min peut oxyder la Méthionine libre ou liée aux protéines en Méthionine sulfoxyde et parfois en Méthionine Sulfone

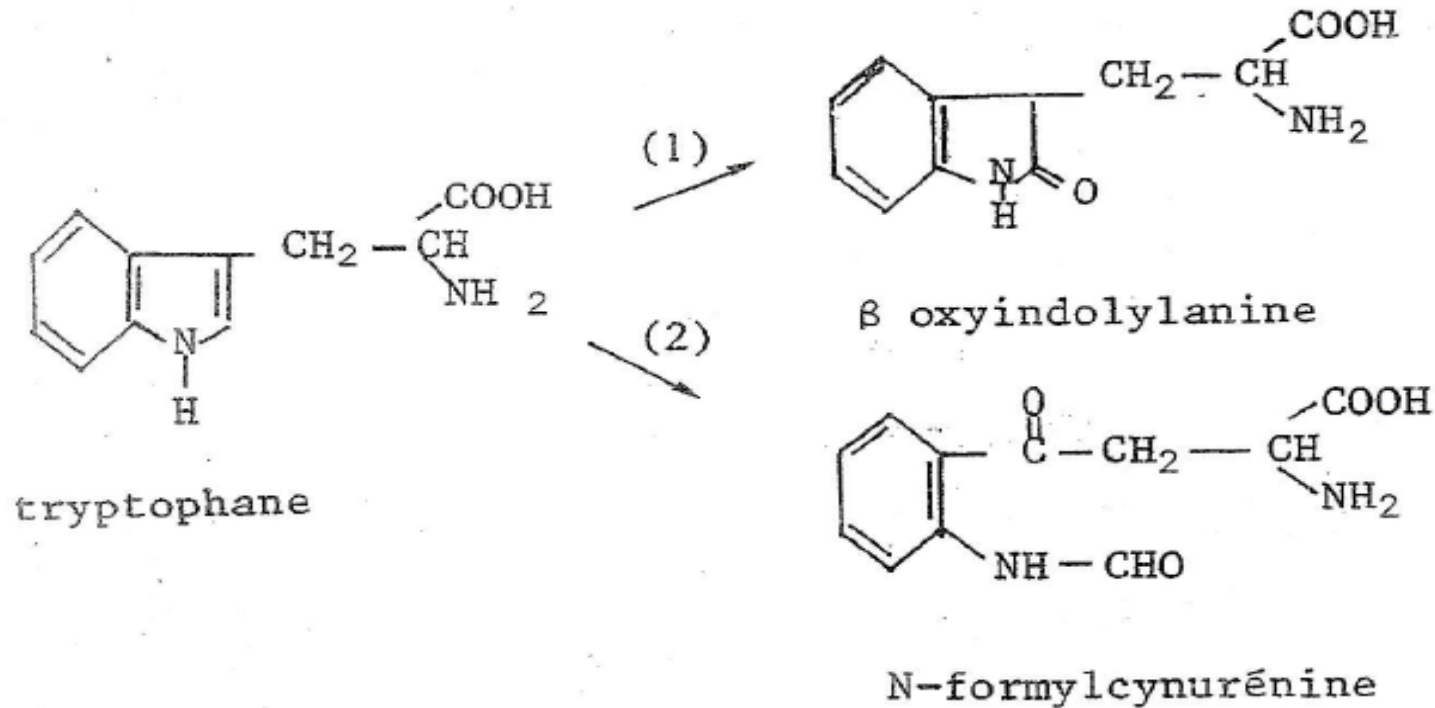


# 1-3 Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et le tryptophane)

- Les AA aromatiques sont très sensibles à l'oxydation en subissant des réactions d'hydroxylation sur les noyaux aromatiques.
- La phénylalanine et la tyrosine s'oxydent en
- L-dihydrophénylalanine (L-DOPA) ou en
- L-trihydrophénylalanine (L-TOPA).

- Le tryptophane est oxydé en **hydroxytryptophane**.
- La phénylalanine peut aussi s'oxyder en tyrosine. L'oxydation de deux tyrosines voisines conduit à la formation de dityrosine:
- **(Tyr-O-O-Tyr)**.
- La formation de molécules de dityrosine se révèle être un marqueur discriminant de l'oxydation des myofibrilles et de l'agrégation des protéines quand elle est formée à partir de deux chaînes peptidiques différentes .

# Oxydation du tryptophane



- ) en présence de R COOH,  $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ , Br (ou Cl)
- ) en présence de R COOH,  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{O}_2 + h\nu$

Ac  
Ac  
l'oi

## II/ Localisation de l'oxydation protéique

- La lipoperoxydation et l'oxydation protéique sont des phénomènes fortement imbriqués et inter-dépendants, notamment au cours du chauffage où les vitesses de réaction sont décuplées

# Agrégation protéique

- Au cours des traitements technologiques (thermiques),
  - ❖ les protéines sont modifiées
    - niveau structural (dénaturation)
    - niveau biochimique (oxydation).
    - Modifications →
    - Nvelles interactions de **types protéines-protéines, protéines-lipides** ou encore **protéines-sucres** menant ainsi à des **phénomènes d'agrégation**

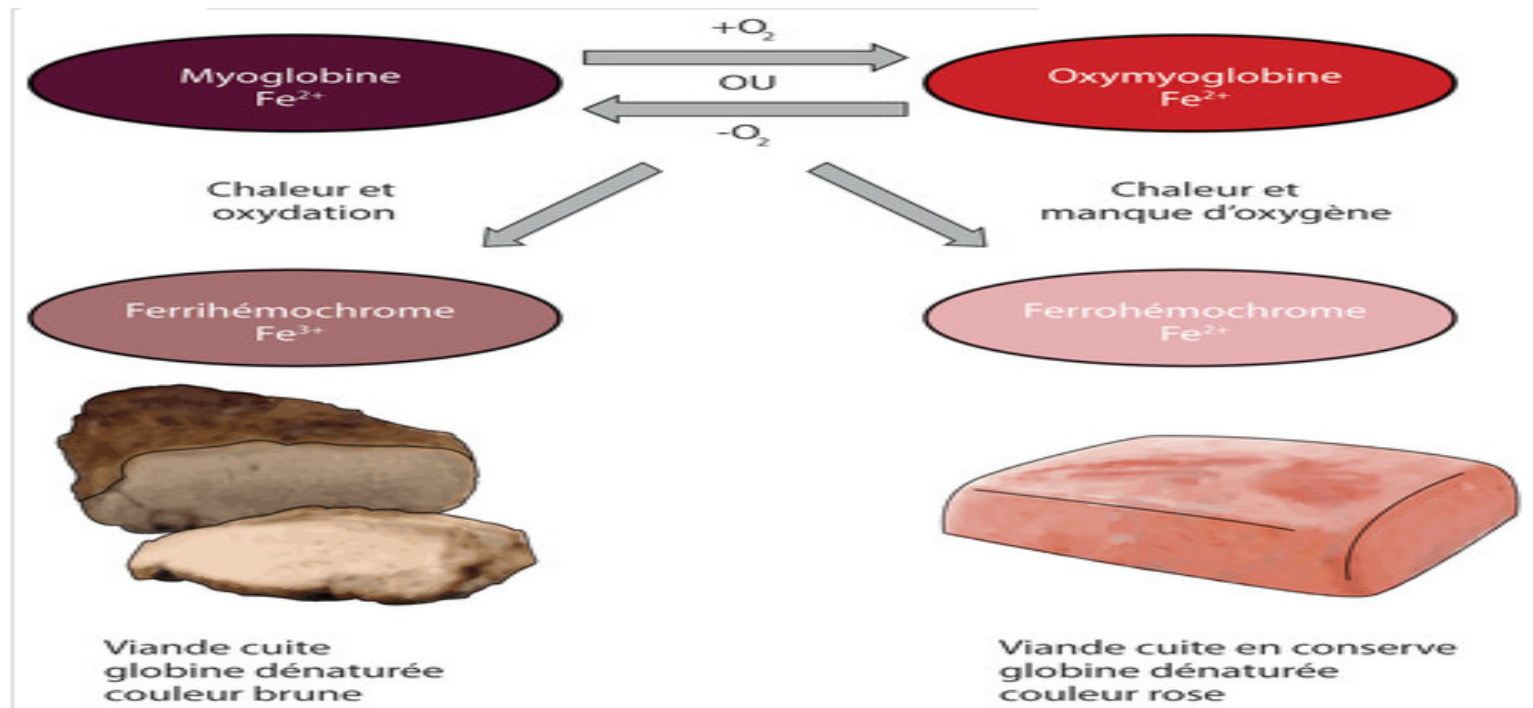
### III/ Modifications chimiques - Oxydation

- chauffage, hachage et ajout de solutés favorisent la formation de **radicaux libres** oxygénés :oxygène singulet  $^1O_2$ , radical superoxyde  $O_2^{\circ-}$ , radical hydroxyle  $HO^{\circ}$ .
- Ces radicaux comportent un ou plusieurs électrons non appariés qui leur confèrent une **forte réactivité chimique** sur les constituants cellulaires avec lesquels ils vont échanger un électron.
- ils sont à l'origine d'une cascade de phénomènes radicalaires.

### III/ Modifications chimiques – Oxydation (suite)

- La présence de fer, de myoglobine, de lipides et de composés phénoliques peut aussi **augmenter l'oxydation des protéines.**
- L'oxydation de la myoglobine (protéine héminique prooxydante ( **fer héminique**))
- Fer héminique: un bon initiateur de l'oxydation des protéines ,de plus, responsable de la couleur de la viande.
- Durant l'auto-oxydation du pigment, il y a formation de **metmyoglobine**, du radical  $O_2^{\cdot -}$  et de  $H_2O_2$

Le schéma illustre la transformation de la myoglobine ou de l'oxymyoglobine durant la cuisson. La partie protéique de ces deux molécules, la globine, se dénature à 65 °C. Deux nouvelles molécules – le ferrihémochrome  $\text{Fe}^{3+}$  de couleur beige rosé et le ferrohémochrome  $\text{Fe}^{2+}$  de couleur rose – se forment.





# III/ Modifications chimiques – Oxydation (suite)

- Des procédés technologiques amplifient les phénomènes d'oxydation à savoir:
- la réfrigération, la congélation, le broyage, la restructuration, l'irradiation, le chauffage, l'emploi de sel,...
-

#### IV/ Principales methodes d'évaluation de l'oxydation des proteines

- IV-1-Taux de thiols libres (SH)
- L'oxydation des groupements thiols donne lieu à une série de réactions complexes aboutissant à la formation de produits oxydés en fonction de la substance réactive à l'oxygène (**ROS**) impliquée
-

# IV-1-Taux de thiols libres (SH)

## (suite)

- En présence de peroxyde d'hydrogène, la cystéine peut être oxydée en acide sulfénique (**Cys-SOH**).
- Cet acide sulfénique peut réagir avec une autre cystéine pour former une cystine (**Cys-SS-Cys**) à partir d'un pont disulfure.
- $\text{Cys-SH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cys-SOH}$
- $\text{Cys-SOH} + \text{Cys-SH} \rightarrow \text{Cys-SS-Cys} + \text{H}_2\text{O}$
- Deux cystéines peuvent également former une cystine en présence d'oxygène

## IV-1-Taux de thiols libres (SH) (suite)

- Le soufre de la **méthionine** est sensible à l'**oxydation** qui donne lieu à deux dérivés :
- la **méthionine sulfone** et la **méthionine sulfoxyde**
- La perte des groupements **SH** libre dans les protéines musculaires est souvent utilisée comme un indicateur de l'oxydation des protéines

## IV-2-Teneur en carbonyles totaux

- **\*Méthode à la DNPH**

- La méthode à la DNPH ( dinitro-phényl hydrazine) est une procédure de routine qui permet de quantifier la teneur totale en carbonyles d'un échantillon protéique.
- **Teneur totale en carbonyles =** index général de l'oxydation des produits carnés.
- Principe de la méthode: il est basé sur la réaction entre la 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH) et les composés carbonylés **pour former de la 2,4 dinitrophényl (DNP) hydrazone.**
- C'est un **complexe de couleur jaune** qui présente un pic d'absorbance maximum à environ 370 nm.

## IV-2-Teneur en carbonyles totaux (suite)

- La concentration en protéines est mesurée dans un échantillon de contrôle sans ajout de DNPH, à 280 nm par rapport à un standard de sérum albumine bovine (BSA).
- Les résultats sont exprimés en nmol de DNP hydrazone par mg de protéine
- Figure suivante

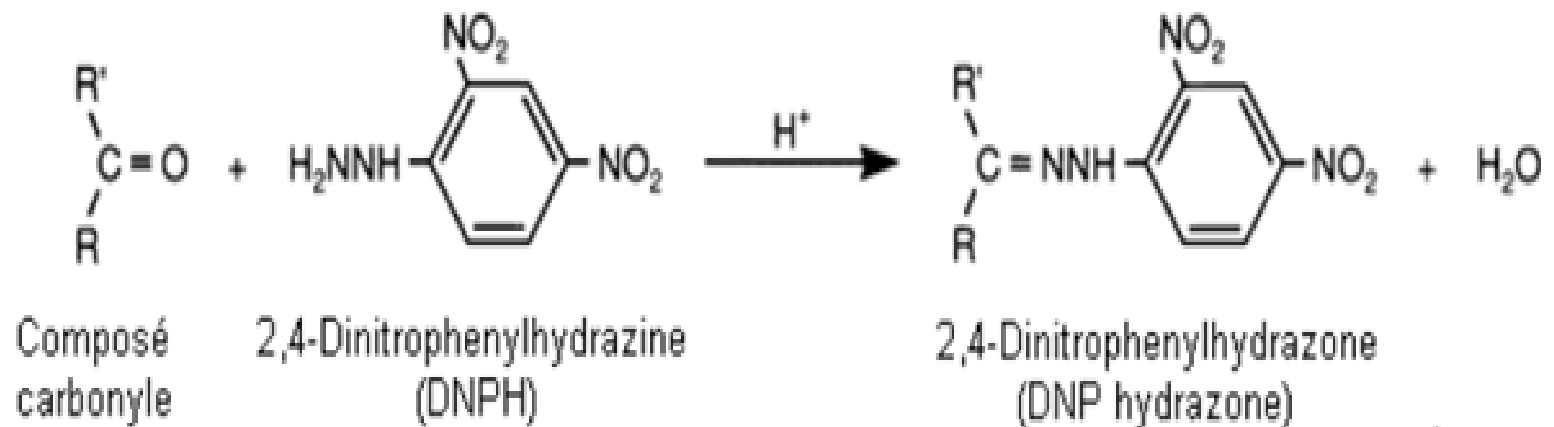


Schéma du dosage des carbonyles totaux par la Dinitrophenylhydrazone (DNP hydrazone)

Activ

**\*Methode par chromatographie liquide - spectrometrie de masse.**

le dosage de l'acide glutamique  $\gamma$ -semialdehyde (GGS,  $\text{HOOC}-\text{HC}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}$ ) et l'acide  $\alpha$ -aminoadipique semialdehyde (AAS,  $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ ):

dérivés respectivement de l'oxydation de l'arginine et de la lysine comme l'illustre la figure suivante

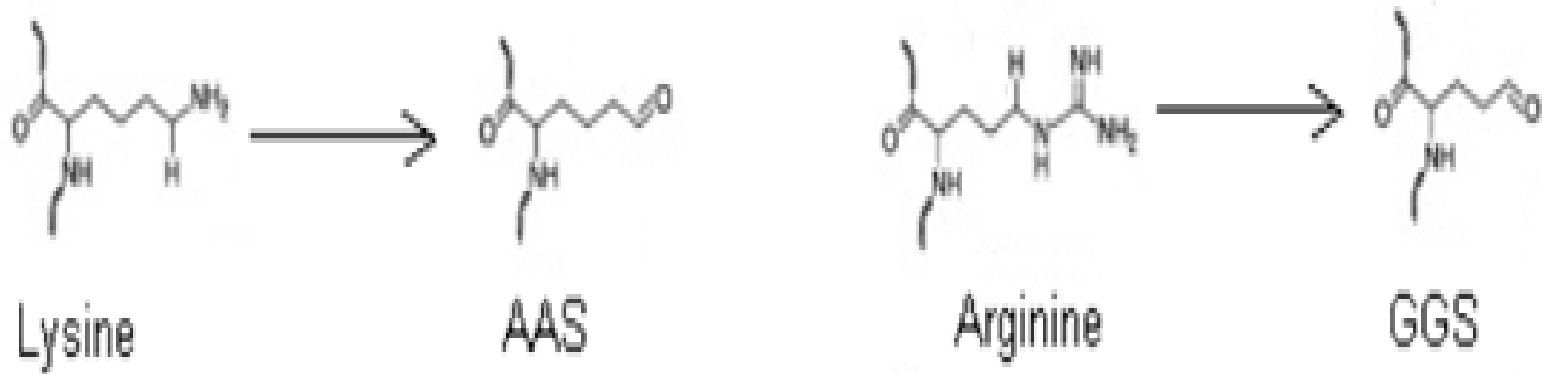


Figure1: Oxydation de la lysine et l'arginine.

e GGS peut être utilisé comme indicateur de l'oxydation des protéines.



# Methode par chromatographie liquide - spectrometrie de masse.

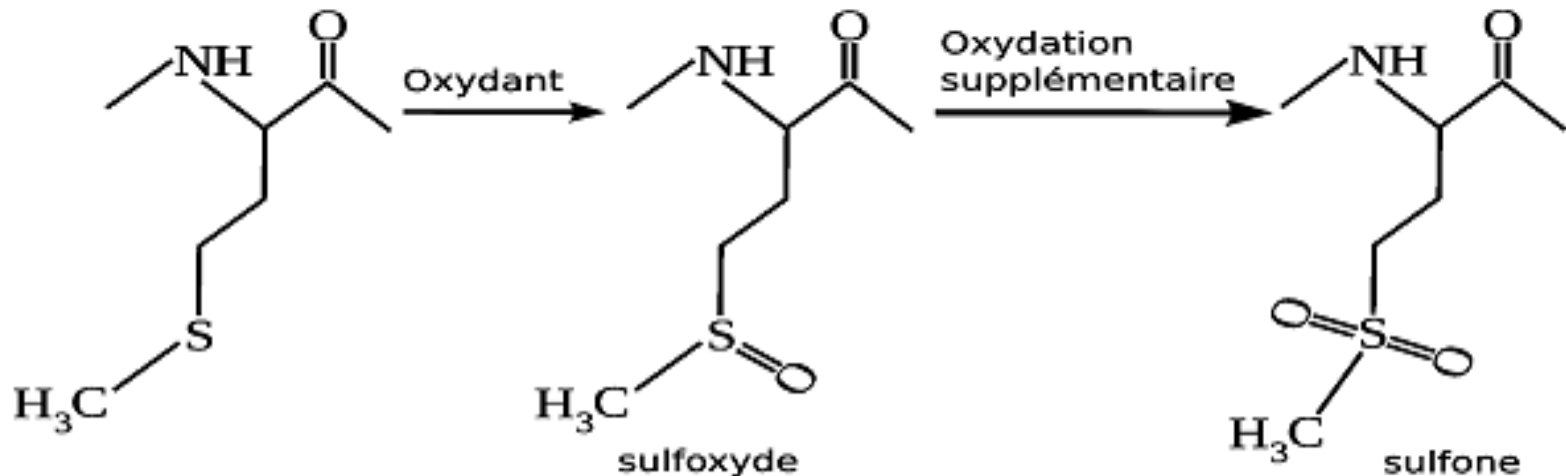


Figure2 : Oxydation du résidu méthionine

Activer  
A / 1

## V/ Détermination de liaisons intermoléculaires covalentes

### • **V-1-Détermination des ponts disulfures**

- La méthode est basée sur la quantification de:
  - 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB) formé par la réaction de
  - 2-nitro-5-thiosulfobenzoate (NTSB) avec des disulfures en présence d'un excès de sulfite de sodium.
- La solution de NTSB est préparée en traitant le réactif d'Ellman (DTNB) avec un excès de sulfite de sodium. La quantité de chromogène formé est déterminée par une mesure d'absorbance à 412 nm en utilisant un coefficient d'extinction de  $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

•

## V-1-Détermination des ponts disulfures (suite)

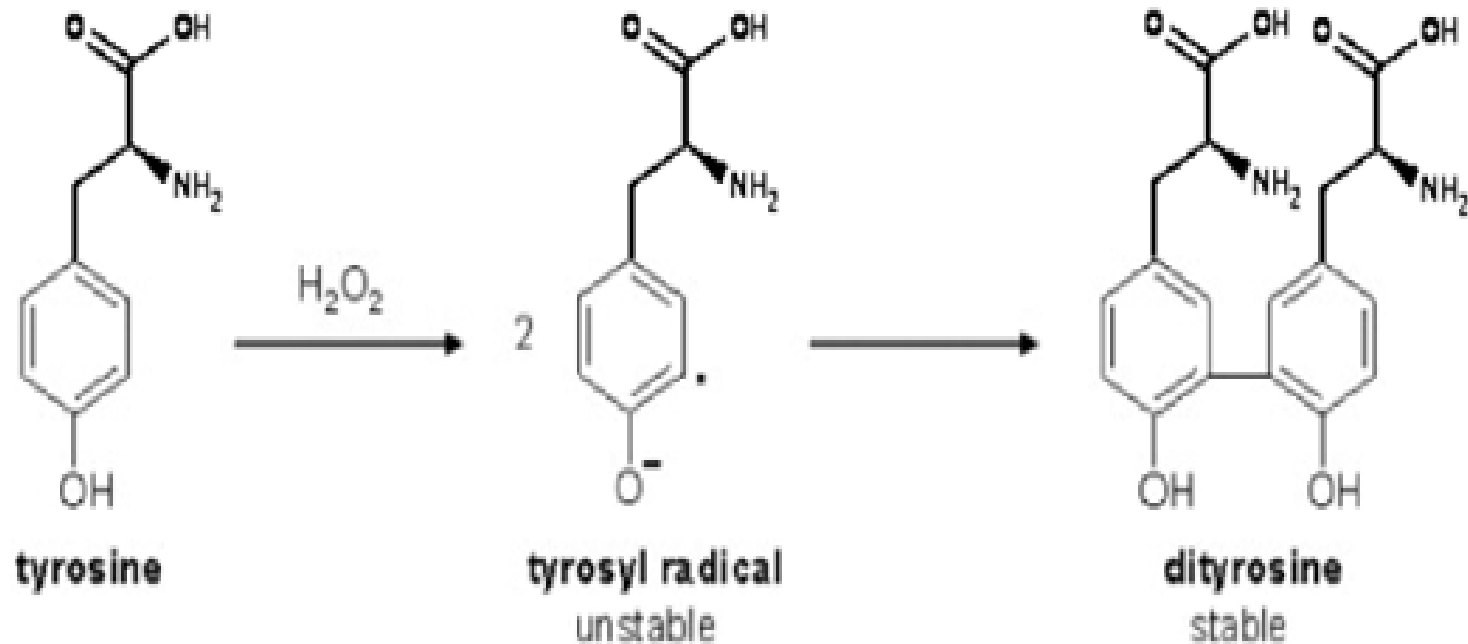
- Méthode qui surestime les ponts disulfures car le NTSB réagit également avec les groupements thiols libres.
- Pour améliorer la précision, le taux de thiols libres est déterminé (réactif d'Ellman) et le résultat obtenu est soustrait au précédent.
- Afin d'accéder aux ponts dissulfures, une dénaturation préalable des protéines musculaires à l'aide de sel de guanidine est nécessaire

- Méthode sensible, quantitative et facilement réalisable.
- **Limites** : le NTB réagit à la lumière d'où une rapide disparition de l'absorbance à 412 nm, par conséquent le développement à l'obscurité est conseillé

## V-2- Estimation de la formation de bityrosine

- L'oxydation de deux tyrosines proches conduit à la formation de **dityrosine** (Tyr-o-o-Tyr).
- Sa détection est un marqueur approprié de l'estimation de l'oxydation des protéines de produits carnés.
- L'identification et la quantification de dityrosine se fait par HPLC

## Formation de la dityrosine



### V-3 Evaluation de la formation de cross-links protéiques par électrophorèse SDS-PAGE

- La formation de cross-links entre protéines par la détection des chaînes lourdes de myosine avec cross-link (CL-MHC) par électrophorèse.
- Par électrophorèse SDS-PAGE:
- les protéines oxydées apparaissent sur une bande correspondant à un poids moléculaire supérieur à 500 kDa.
- Bande identifiée par spectroscopie de masse et attribuée à la **formation de ponts dissulfures**.

## VI synthèse

- L'oxydation des protéines du muscle peut intervenir pendant le stockage ou bien dans les étapes de fabrication des produits à base de viande.
- Elle résulte de l'action de différents facteurs pro oxydants tels que:
- les produits d'oxydation des lipides, les espèces réactives à l'oxygène, les cations métalliques, la chaleur.
- Les acides aminés ciblés sont en particulier contenant un noyau hétérocyclique ou un groupement OH-, S- ou N-, notamment la cystéine ou la méthionine
- Les méthodes d'estimation de l'oxydation des protéines sont applicables sur la viande, les préparations de viande ainsi que les produits à base de viande.



# Principaux Documents Consultés

- 1-Cheftel JC et Cheftel H., 1980, Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Edition Technique et Documentation , Volume1 . Pp76-82
- 2-Béatrice Sjöberg. Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène : l'importance de l'environnement protéique. Chimie organique. Université de Franche-Comté, 2013. Français.  
[\(NNT : 2013BESA2020\)](#). [\(tel-01024104\)](#)
- 3-OCL - Oilseeds and Fats, Crops and Lipids 11(2):133-141
- 4- É. VIERLING, *Aliments et boissons : Filières et produits*, 3<sup>e</sup> éd., série « Sciences des aliments », Aquitaine, Doin éditeurs, 2008, p. 71.