

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ BATNA 1 -BATNA-  
INSTITUT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES  
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



## THÈSE

*Pour l'obtention du diplôme de*

DOCTORAT EN SCIENCES

### *Filière*

Sciences vétérinaires

### *Option*

*Histologie et Histopathologie des animaux domestiques*

### *Présentée Par*

MEGAACHE Mounia

## THEME

**INFLUENCE DES CYCLES DE CONGÉLATION  
DÉCONGÉLATION SUR LA STRUCTURE DU POISSON**

### **Jury :**

Président : AYACHI Ammar

Prof. - U. Batna 1

Examineur : ADILI Nezar

MCA - U. Batna 1

Examineur : BELKHIRI Yamina

MCA - U. Batna 2

Examineur : HELEILI Nouzha

Prof. - U. Batna 1

Examineur : KHENENOU Tarek

Prof. - U. Souk Ahras

Rapporteur : BENNOUNE Omar

Prof. - U. Batna 1

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2023-2024

## DÉDICACE

Le présent travail est dédié à :

À mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible et leurs sacrifices sans fin.

À mon mari, pour sa patience, son soutien et son amour sans bornes.

À mes enfants, Siradj, Yahia et Baraa, qui ont été ma source d'inspiration constante et ma raison de persévérer.

Mes frères et sœurs pour leur soutien inestimable et leur présence toujours réconfortante.

Mounia Megaache

## REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide, que ce soit de manière directe ou indirecte, tout au long de la réalisation de ce travail. En particulier, je tiens à adresser mes sincères remerciements au Professeur Omar BENNOUNE pour avoir accepté de superviser cette thèse et pour son soutien inestimable ainsi que ses conseils avisés qui ont grandement contribué à son achèvement.

Je tiens à présenter mes vifs remerciements aux membres du jury, en particulier au Professeur AYACHI Ammar pour accepter la présidence de notre jury de thèse, ainsi que l'ensemble des examinateurs Pr HELEILI Nouzha, Pr KHENENOU Tarek et Dr BELKHIRI Yamina et Dr ADILI Nezar pour leur précieuse présence et leur aimable participation à la lecture et à l'évaluation de ma thèse.

Je tiens à remercier vivement le Dr. NOUICER Ferhat. Merci pour l'aide qu'il m'a procurée.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers chacun des membres de ma famille pour leur soutien inestimable et leur précieux réconfort tout au long de mon parcours académique.

Mounia Megaache

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABVT: Azote Basique Volatil Total  
ADP : Adénosine diphosphate  
AMP : Adénosine monophosphate  
ATP : Adénosine triphosphate  
AW : Activité de l'eau  
DM : Déchirure d'une fibre musculaire  
DMA : Diméthylamines  
FAO : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture  
FM : Fibre musculaire  
GC-MS : Chromatographie-spectrométrie de masse  
H&E : Coloration à l'Hématoxyline et à l'Éosine  
HCl : Acide chlorhydrique  
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance  
IMP : Inosine 5'-monophosphate  
NIR : Spectroscopie proche infrarouge  
OTMA : Oxyde de triméthylamine  
PC : Dénombrement sur plaque  
pH : Potentiel hydrogène  
QIM : Méthode de l'indice de qualité  
RSW : Eau de mer réfrigérée  
SA : *Sardinella aurita*  
SAC : *Sardinella aurita congelé*  
SAF : *Sardinella aurita frais*  
SP : *Sardina pilchardus*  
SPC : *Sardina pilchardus congelé*  
SPF : *Sardina pilchardus frais*  
T : Cycle  
TBA : Acide thiobarbiturique  
TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique  
TE : Teneur en eau  
TMA: Triméthylamine  
TVBN : Azote Basique Volatil Total  
TVC : Dénombrement total des organismes viables

UV : Ultraviolet

X : Grossissement

# SOMMAIRE

DÉDICACE.....	I
REMERCIEMENTS .....	II
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	III
SOMMAIRE .....	V
TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES TABLEAUX .....	XI
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	5
<b>1 STRUCTURE ET COMPOSITION.....</b>	<b>5</b>
1.1 DEFINITION.....	5
1.2 IMPORTANCE DU POISSON DANS L'ALIMENTATION .....	5
1.3 COMPOSITION .....	6
1.3.1 <i>Fibres musculaires</i> .....	6
1.3.2 <i>Tissu conjonctif intramusculaire</i> .....	8
1.3.3 <i>Tissus adipeux et lipides intramusculaires</i> .....	9
1.4 STRUCTURE D'UN MUSCLE SQUELETTIQUE .....	9
1.4.1 <i>Structure macroscopique</i> .....	10
1.4.2 <i>Structure microscopique</i> .....	13
<b>2 POISSON FRAIS : DÉFINITION ET MÉTHODES DE CONSERVATION .....</b>	<b>16</b>
2.1 DEFINITION DU POISSON FRAIS.....	16
2.2 METHODES DE CONSERVATION.....	16
2.2.1 <i>Refroidissement</i> .....	16
2.2.2 <i>Réfrigération</i> .....	17
2.2.3 <i>Congélation</i> .....	17
2.3 DEGRADATION DE LA FRAICHEUR DU POISSON .....	18
2.3.1 <i>Altérations post mortem</i> .....	19
2.3.2 <i>Rigor mortis</i> .....	20
2.4 DETERIORATION DES POISSONS CONSERVES SUR GLACE.....	21
2.5 DETERIORATION DU POISSON CONGELE .....	24
2.6 METHODES DE DETERMINATION DE LA FRAICHEUR ET DE DIFFERENCIATION	
FRAIS/DECONGELÉ DEJÀ EXISTANTES.....	29
2.6.1 <i>Analyses sensorielles</i> .....	29

2.6.2	<i>Mesure de la fraîcheur par mesure des amines</i> .....	30
2.6.3	<i>Mesure de l'oxydation des lipides</i> .....	31
2.6.4	<i>Mesure des dérivés nucléotidiques</i> .....	31
2.6.5	<i>Mesure du pH</i> .....	32
2.6.6	<i>Mesure de la flore microbienne</i> .....	32
2.6.7	<i>Méthodes spectroscopiques</i> .....	33
2.6.8	<i>Méthodes histologiques</i> .....	33
<b>3</b>	<b>PRÉSENTATION DES ESPÈCES CIBLES</b> .....	<b>34</b>
3.1	LA SARDINE COMMUNE ( <i>SARDINA PILCHARDUS</i> ).....	35
3.1.1	<i>Position systématique</i> .....	35
3.1.2	<i>Appellations de Sardina pilchardus</i> .....	36
3.1.3	<i>Caractéristiques de Sardina pilchardus</i> .....	36
3.2	LA SARDINELLE COMMUNE ( <i>SARDINELLA AURITA</i> ).....	36
3.2.1	<i>Position systématique</i> .....	37
3.2.2	<i>Appellations de Sardinella aurita</i> .....	38
3.2.3	<i>Caractéristiques de Sardinella aurita</i> .....	38
	<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>MATÉRIEL</b> .....	<b>40</b>
1.1	ÉVALUATION DE LA MODIFICATION DES TISSUS EN FONCTION DE LA REFRIGERATION ...	40
1.2	ÉVALUATION DE LA MODIFICATION DES TISSUS EN FONCTION DE LA CONGELATION.....	41
1.3	ÉVALUATION DE LA MODIFICATION DES TISSUS EN FONCTION DE CYCLE DE CONGELATION-DECONGELATION .....	41
<b>2</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES UTILISÉES</b> .....	<b>43</b>
2.1	ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES .....	43
2.1.1	<i>Mesure du pH</i> .....	43
2.1.2	<i>Mesure de l'activité de l'eau (Aw)</i> .....	43
2.1.3	<i>Mesure de la teneur en eau</i> .....	44
2.1.4	<i>Couleur</i> .....	44
2.1.5	<i>Taux des protéines totaux</i> .....	44
2.1.6	<i>Capacité de rétention d'eau</i> .....	46
2.2	ANALYSE HISTOLOGIQUE.....	47
2.2.1	<i>Préparation des coupes histologiques</i> .....	47
2.2.2	<i>Échantillonnage</i> .....	47
2.3	ANALYSE HISTOLOGIQUE ET MORPHOMETRIQUE .....	51

2.4	ANALYSE STATISTIQUE.....	52
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>54</b>
<b>1</b>	<b>ÉVALUATION DE LA MODIFICATION DES TISSUS A DIFFERENTES DUREES DE CONSERVATION AU REFRIGERATEUR.....</b>	<b>54</b>
1.1	PROPRIETES CHIMIQUES.....	54
1.1.1	<i>pH</i> .....	54
1.1.2	<i>Activité de l'eau</i> .....	55
1.1.3	<i>La teneur en eau</i> .....	57
1.2	ANALYSE HISTOLOGIQUE.....	58
<b>2</b>	<b>ÉVALUATION DE LA MODIFICATION DES TISSUS EN FONCTION DE LA CONGELATION.....</b>	<b>62</b>
2.1	PROPRIETES CHIMIQUES.....	62
2.1.1	<i>pH</i> .....	62
2.1.2	<i>Activité de l'eau</i> .....	63
2.1.3	<i>La teneur en eau</i> .....	64
2.2	ANALYSE HISTOLOGIQUE.....	65
<b>3</b>	<b>ÉVALUATION DE LA MODIFICATION DES TISSUS EN FONCTION DE CYCLE DE CONGELATION-DECONGELATION.....</b>	<b>67</b>
3.1	PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES .....	67
3.1.1	<i>pH</i> .....	67
3.1.2	<i>Activité de l'eau</i> .....	68
3.1.3	<i>Couleur</i> .....	70
3.1.4	<i>Taux de concentrations des protéines totaux</i> .....	74
3.1.5	<i>Capacité de rétention d'eau</i> .....	76
3.2	ANALYSE HISTOLOGIQUE.....	81
3.3	ANALYSE HISTOMORPHOMETRIQUE.....	85
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>89</b>
<b>RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>93</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		
<b>PUBLICATION</b>		
<b>RESUME</b>		
المخلص		
<b>SUMMARY</b>		

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Sections histologiques représentatives d'un poisson zèbre adulte (Currie et <i>al.</i> , 2020).....	7
<b>Figure 2 :</b> Organisation générale du muscle (Listrat et <i>al.</i> , 2016).....	10
<b>Figure 3:</b> Représentation d'un filet de poisson en coupe longitudinale (Listrat et <i>al.</i> , 2016)..	10
<b>Figure 4:</b> Schéma de l'organisation et la répartition de la musculature sur une darne (coupe transversale) de truite (Listrat et <i>al.</i> , 2016). ....	12
<b>Figure 5:</b> Coupe transversale de muscle blanc de Bar ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) colorée au rouge sirius et au vert rapide (Listrat et <i>al.</i> , 2016).....	13
<b>Figure 6:</b> Les rhabdomyocytes de <i>Gnathonemus petersi</i> (MT / HM) (Genten et <i>al.</i> , 2009)..	14
<b>Figure 7:</b> Structure d'un sarcomère observé en microscopie électronique (en haut) et schématisé (en bas) (Listrat et <i>al.</i> , 2015).....	15
<b>Figure 8:</b> Les processus biologiques qui sont initiés à la mort du poisson conduisant à sa dégradation (Duarte et <i>al.</i> , 2020).....	21
<b>Figure 9 :</b> La sardine, <i>Sardina pilchardus</i> ( <i>photo personnelle</i> ). ....	36
<b>Figure 10:</b> La sardinella, <i>Sardinella aurita</i> ( <i>photo personnelle</i> ). ....	37
<b>Figure 11:</b> Courbe d'étalonnage de la concentration des protéines.....	46
<b>Figure 12:</b> Principaux stades du processus de préparation des coupes histologiques .....	50
<b>Figure 13:</b> Interface du logiciel ImageJ .....	51
<b>Figure 14:</b> pH de la <i>Sardina pilchardus</i> pendant la réfrigération ( $p < 0,05$ ).....	55
<b>Figure 15:</b> pH de la <i>Sardinella aurita</i> pendant la réfrigération ( $p < 0,05$ ) .....	55
<b>Figure 16:</b> Activité de l'eau de <i>Sardina pilchardus</i> pendant la réfrigération ( $p < 0,05$ ).....	56
<b>Figure 17:</b> Activité de l'eau de <i>Sardina aurita</i> pendant la réfrigération ( $p < 0,05$ ) .....	57
<b>Figure 18:</b> Teneur en eau de <i>Sardina pilchardus</i> pendant la réfrigération( $p < 0,05$ ).....	58
<b>Figure 19:</b> Teneur en eau de <i>Sardinella aurita</i> pendant réfrigération( $p < 0,05$ ) .....	58
<b>Figure 20:</b> Histologie de <i>Sardina pilchardus</i> et <i>Sardinella aurita</i> frais (moins de 24 heures) (H&E). ....	59
<b>Figure 21:</b> Histologie de <i>Sardina pilchardus</i> et <i>Sardinella aurita</i> sous réfrigération (48 heures) (H&E). ....	59
<b>Figure 22:</b> Histologie de <i>Sardina pilchardus</i> et <i>Sardinella aurita</i> sous réfrigération (72 heures) (H&E). ....	60

<b>Figure 23:</b> Histologie de <i>Sardina pilchardus</i> et <i>Sardinella aurita</i> sous réfrigération (144heures) (H&E).	61
<b>Figure 24:</b> Histologie de <i>Sardina pilchardus</i> et <i>Sardinella aurita</i> sous réfrigération (192 heures) (H&E).	61
<b>Figure 25:</b> L'activité de l'eau, le pH et la teneur en eau de <i>Sardina pilchardus</i> frais et congelé (p<0,05)	64
<b>Figure 26:</b> L'activité de l'eau, le pH et la teneur en eau de <i>Sardinella aurita</i> frais et congelé (p<0,05)	65
<b>Figure 27:</b> Caractéristiques microscopiques de la <i>Sardina pilchardus</i> fraîche et congelée. (H&E).	66
<b>Figure 28:</b> Caractéristiques microscopiques de la <i>Sardinella aurita</i> fraîche et congelée. (H&E).	66
<b>Figure 29:</b> pH de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	68
<b>Figure 30:</b> pH de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	68
<b>Figure 31:</b> Activité de l'eau de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	69
<b>Figure 32:</b> Activité de l'eau de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	70
<b>Figure 33:</b> L* de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation (p<0,05)	71
<b>Figure 34:</b> L* de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation- décongélation.	71
<b>Figure 35 :</b> a* de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	72
<b>Figure 36:</b> a* de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	72
<b>Figure 37:</b> b* de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	73
<b>Figure 38:</b> b* de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	74
<b>Figure 39:</b> Solubilité de protéine de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)	75

<b>Figure 40:</b> Solubilité de protéine de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	75
<b>Figure 41:</b> Teneur en eau de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	76
<b>Figure 42:</b> Teneur en eau de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	77
<b>Figure 43:</b> Perte à la décongélation de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	77
<b>Figure 44:</b> Perte à la décongélation de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	78
<b>Figure 45:</b> Perte de la centrifugation de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	78
<b>Figure 46:</b> Perte de la centrifugation de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	79
<b>Figure 47:</b> Perte à la cuisson de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	79
<b>Figure 48:</b> Perte à la cuisson de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ ).....	80
<b>Figure 49:</b> Histologie musculaire de <i>Sardina pilchardus</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (H&E).....	83
<b>Figure 50:</b> Histologie musculaire de <i>Sardinella aurita</i> soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (H&E).....	84
<b>Figure 51:</b> La surface moyenne des cristaux de glace observées lors de divers cycles de congélation-décongélation de <i>Sardina pilchardus</i> . Différentes lettres indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ). .....	86
<b>Figure 52:</b> La relation entre la surface des cristaux de glace et la surface des cellules de <i>Sardina pilchardus</i> . Différentes lettres indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ). .....	86
<b>Figure 53:</b> La surface moyenne des cristaux de glace observée lors de divers cycles de congélation-décongélation de <i>Sardinella aurita</i> . Différentes lettres indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ). .....	87
<b>Figure 54:</b> La relation entre la surface des cristaux de glace et la surface des cellules de <i>Sardinella aurita</i> . Différentes lettres indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ). .....	87

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Caractéristiques principales de fibres musculaires des poissons (Currie et <i>al.</i> , 2020).....	8
<b>Tableau 2:</b> Valeur seuil déterminant l'état de fraîcheur des poissons (IFREMER, 2008) .....	30
<b>Tableau 3:</b> Position systématique de la <i>Sardina pilchardus</i> (Walbaum, 1792).....	35
<b>Tableau 4:</b> Position systématique de la <i>Sardinella aurita</i> (Valenciennes, 1847).....	37
<b>Tableau 5:</b> Conditions Expérimentales pour l'Évaluation des Modifications Tissulaires des poissons .....	42
<b>Tableau 6:</b> Concentration protéique .....	45

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Les fruits de mer et le poisson sont considérés comme des éléments nécessaires d'un régime alimentaire sain en raison de leurs acides gras essentiels, de leurs acides aminés et de leur cholestérol. Domingo et *al.*, (2007) ont constaté que les acides gras présents dans les fruits de mer sont particulièrement importants pour la santé. Les sardines se distinguent parmi les poissons les plus abondants en oméga-3. L'American Heart Association a classé ce poisson parmi les 11 aliments recommandés pour leur haute valeur nutritionnelle et leur meilleur profil protéique. Les petits poissons pélagiques d'Algérie, la *Sardina pilchardus*, l'*Engraulis encrasicolus* et la sardinelle, revêtent une grande importance économique et sociale. Cependant, leur chair est très sensible aux problèmes de conservation.

La qualité du poisson se dégrade rapidement après sa capture à température ambiante, c'est pourquoi la congélation et la réfrigération sont les procédures les plus fréquemment utilisées dans le secteur alimentaire pour maintenir la qualité alimentaire au fil du temps. De plus, le poisson est une denrée périssable, surtout dans les régions tropicales ou méditerranéennes où il y a une insuffisance d'installations de réfrigération. Par conséquent, la qualité du poisson diminue rapidement dans les 12 heures suivant sa capture (Mazorra-Manzano et *al.*, 2000).

La congélation d'un aliment ralentit les processus chimiques et réduit l'activité de l'eau, ce qui entraîne des modifications dans sa composition. Elle inhibe également la croissance microbienne en raison des changements dans la structure musculaire alimentaire et de la qualité organoleptique (Zhu et *al.*, 2004; Venugopal, 2006; Kiani et Sun, 2011; Gökoğlu et yerlikaya, 2015).

Cependant, le phénomène de congélation-décongélation est presque inévitable dans la pratique courante et dans les zones éloignées en raison des contraintes liées aux moyens de transport et les fluctuations de température lors du stockage. En effet, l'accumulation de cristaux de glace provoque des changements physico-chimiques qui réduisent la qualité des produits carnés. Les réactions biochimiques et la croissance microbienne sont influencées par le niveau d'eau disponible dans les aliments, souvent mesuré par l'activité de l'eau (*aw*).

Des études ont montré que les processus de congélation et de décongélation cycliques répétés avaient tendance à accélérer le processus de recristallisation de la glace. Hu et *al.* (2021) ont montré que la structure secondaire des protéines myofibrillaires dans le muscle de *Trachurus murphyi* était modifiée par les traitements de congélation-décongélation. Pendant ce temps, la dégradation des protéines myofibrillaires a rendu les filets plus tendres et a réduit la

capacité de rétention d'eau. L'intégrité de la structure tissulaire musculaire est essentielle pour maintenir la qualité fine de la viande congelée; des cristaux de glace se forment pendant la congélation, exerçant une pression majeure sur les substances cellulaires dans la fraction non congelée, ce qui peut affecter la récupération microstructurale après décongélation. Au contraire, certaines recherches considèrent que les cristaux de glace ne déterminent pas inéluctablement la qualité de la viande congelée car le tissu de la viande peut réabsorber l'eau pendant le processus de décongélation, sauf s'il a été endommagé par une dénaturation protéique modifiée. Cao et *al.* (2022) et Li et *al.* (2023) ont indiqué que les cycles de congélation-décongélation provoquent une perturbation de la structure musculaire, accélèrent l'oxydation des protéines et des lipides et réduisent la capacité de rétention d'eau.

Les consommateurs ont du mal à distinguer visuellement un poisson frais d'un poisson ayant été décongelé. Il leur est difficile de déterminer les différences entre un poisson frais qui a été décongelé et recongelé sans remarquer de changements significatifs (Upton, 2015; Fasolato et *al.*, 2005; Uddin et *al.*, 2015). Cela est dû au fait que les fileteurs frauduleux remplacent souvent le poisson frais par du poisson congelé (décongelé) tout en dissimulant leurs altérations, surtout lorsque le poisson est vendu aux consommateurs.

La gestion des crises financières et des économies instables a engendré le développement de nouvelles méthodes d'analyse visant à restreindre les pratiques frauduleuses. Ces méthodes comprennent la mesure de paramètres physiques, chimiques, physiologiques et morphologiques pour déterminer si la viande est fraîche ou a été congelée (Fasolato et *al.*, 2005; Upton, 2015).

L'examen histologique est couramment utilisé pour surveiller la production alimentaire, vérifier la viande et contrôler ainsi la sécurité alimentaire. De nombreux chercheurs ont utilisé l'histologie pour examiner la viande de différentes espèces (Pavlov et *al.*, 2008 ; Richelmi et *al.*, 2013 ; Popelka et *al.*, 2014 ; Meistro et *al.*, 2016). Le processus histologique implique l'analyse des changements dans les structures histologiques pour déterminer la fraîcheur de la viande (Alizadeh et *al.*, 2007 ; Tinacci et *al.*, 2018; Strateva et *al.*, 2021).

Dans le contexte des pratiques de conservation du poisson dans les marchés de détail, où il est régulièrement exposé à des cycles de congélation et de décongélation, se pose la question suivante : quel est l'impact de ces fluctuations de température sur la qualité, la fraîcheur et la sécurité alimentaire du poisson ?

Avant d'explorer les effets des cycles de congélation-décongélation sur la structure du poisson (*Sardine pilchardus* et *Sardinella aurita*), il est essentiel de comprendre les conséquences de la réfrigération et de la congélation sur sa structure.

Dans cette perspective, notre étude vise à approfondir la compréhension des modifications observées dans les propriétés physicochimiques et histologiques des muscles de poisson (*Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita*) soumis à différents traitements, incluant le refroidissement, la congélation, et les cycles de congélation-décongélation. De plus, une analyse histomorphométrique sera employée pour quantifier les effets spécifiques des cycles de congélation-décongélation sur la structure des muscles de poisson.

# **CHAPITRE 1**

## **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 STRUCTURE ET COMPOSITION

### 1.1 Définition

Les poissons constituent près de 60 % de toutes les espèces de vertébrés et ont une importance économique majeure. Ces animaux habitent divers environnements aquatiques tels que les rivières d'eau douce, les lacs et les océans d'eau salée, où ils jouent des rôles cruciaux dans les réseaux alimentaires et les écosystèmes. Les poissons sont des vertébrés aquatiques à branchies, dotés de nageoires et d'un crâne dur, dépourvus de membres avec des doigts. Ils sont une source précieuse d'acides aminés essentiels et d'acides gras polyinsaturés, ce qui les rend très nutritifs. Les poissons fournissent des protéines de haute qualité, des acides gras oméga-3, des vitamines (vitamine D et vitamine B12) et des minéraux (comme le calcium, le fer, le zinc). Une consommation régulière de poissons est recommandée pour ses bienfaits nutritionnels, aidant à la réparation musculaire, au fonctionnement cérébral, à la santé cardiaque et au bien-être général (Maulu *et al.*, 2002 ; FAO, 2011).

Le muscle squelettique est le plus grand système d'organes chez le poisson et correspond à la partie comestible de l'animal. La principale fonction de ce tissu contractile est l'activité de nage. Gramme pour gramme, le poisson a plus de muscle que tout autre vertébré, représentant environ 40 à 60 % du poids corporel total (Bone *et al.*, 1978).

### 1.2 Importance du poisson dans l'alimentation

En tant qu'une source alimentaire, le poisson fournit une nutrition suffisante aux humains. Les divers nutriments présents dans le poisson en font une source importante de nutriments facilement accessible à travers le monde. La consommation de poisson au moins deux fois par semaine dans le cadre d'une alimentation saine est bénéfique pour un cœur en bonne santé. De plus grandes avancées dans le domaine de l'aquaculture et de la recherche sur les produits de la mer pourraient faire du poisson une source majeure de nutriments alimentaires (Chen *et al.*, 2022).

### 1.3 Composition

Le poisson est composé d'environ 20 % de protéines et de 80 % d'eau et de lipides. La teneur en lipides varie d'environ 0,2 à 25 % et est divisée en deux groupes principaux : les phospholipides et les triglycérides. La classification des poissons en espèces maigres et grasses est basée sur la manière dont les différentes espèces stockent leurs lipides. Les poissons ont une teneur élevée en acides gras polyinsaturés et sont donc sensibles à l'oxydation des lipides. Pendant le stockage au congélateur, l'oxydation des lipides se produit dans les espèces maigres aussi bien que dans les espèces grasses.

Les protéines dans le muscle de poisson sont divisées en trois groupes : les protéines myofibrillaires représentent 70 à 80 %, les protéines sarcoplasmiques représentent 25 à 30 % et les protéines stromales (collagène) représentent 3 % chez les poissons osseux et 10 % chez les poissons cartilagineux. La dénaturation et l'agrégation surtout des protéines myofibrillaires pendant le stockage au congélateur entraînent des changements de texture tels que la perte de jutosité et un produit dur et fibreux (Careche et *al.*, 1998 ; Sikorski et *al.*, 1976 ; Shenouda, 1980 ; Careche et *al.*, 1999).

#### 1.3.1 Fibres musculaires

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des muscles des poissons permettent des schémas d'activité adaptés. Les différents types de fibres musculaires chez les poissons ont été caractérisés comme rapides, intermédiaires et lents.

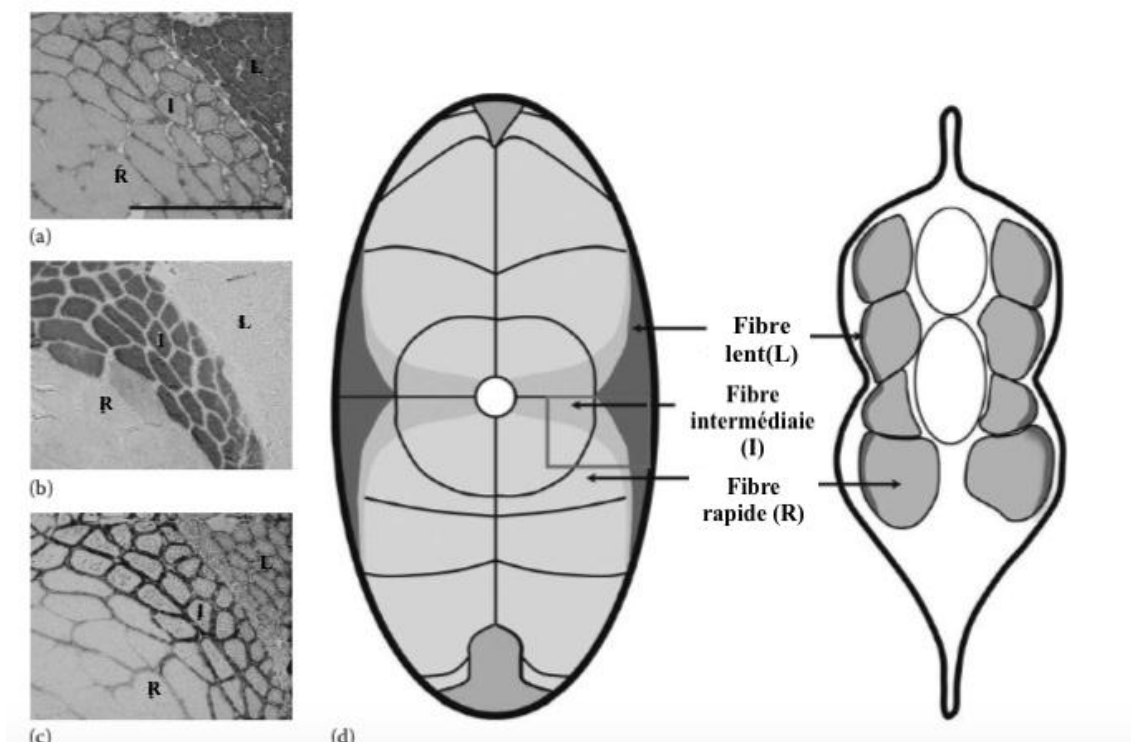
Contrairement aux muscles mosaïques chez les tétrapodes, ces types de fibres sont anatomiquement séparés, avec une orientation spatiale des fibres rapides complexe et distincte des autres vertébrés.

Le muscle blanc (rapide) des poissons est principalement composé de fibres rapides de type IIb, favorisant la locomotion explosive. Ces fibres sont disposées en hélices sous forme de blocs en forme de W imbriqués appelés myotomes, séparés par des feuilles de tissu conjonctif appelées myoseptes. Les myotomes s'étendent le long du tronc du corps et sont reliés aux régions postérieures par des tendons. Chez la plupart des poissons, le muscle rouge (lent) se trouve superficiellement et parallèlement à l'axe longitudinal du corps. Il est composé de fibres lentes de type I et soutient la locomotion ondulatoire axiale (Currie et *al.*, 2020).

Les structures uniques des fibres musculaires rapides et lentes garantissent des ajustements optimaux de la longueur des sarcomères et des vitesses de raccourcissement

relatives. Cela permet de générer les tensions et les puissances adéquates pour des vitesses de nage basses et élevées, respectivement (Rome, 1998).

La Figure 1 présente des coupes histologiques caractéristiques d'un poisson-zèbre :



**Figure 1:** Sections histologiques représentatives d'un poisson zèbre adulte (Currie et *al.*, 2020).

- (a) Les fibres lentes sont identifiées par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps S58 (l'échelle est de 50 µm).
- (b) Les fibres intermédiaires sont repérées en fonction de l'activité de l'ATPase myosinique résistante à l'alcalin.
- (c) Les fibres lentes et intermédiaires présentent toutes deux une forte densité de mitochondries, reflétée par l'activité de la succinate déshydrogénase.
- (d) Schéma d'une coupe transversale à travers un poisson adulte (à gauche) et un embryon en fin de segmentation (à droite), illustrant l'agencement des types de fibres.

Les trois principaux types de fibres musculaires dans le muscle de nage axiale des poissons sont spatialement séparés en régions distinctes. Les fibres lentes oxydatives (L) se trouvent à la périphérie latérale du muscle et, chez les poissons adultes, elles sont les plus abondantes près du septum horizontal. Les fibres rapides oxydatives (intermédiaires) (I) sont situées à côté des fibres lentes, tandis que les fibres glycolytiques rapides (R) constituent le reste de la musculature axiale.

Le muscle blanc est adapté à des taux de flux élevés grâce à la glycolyse. Les fibres de ce type de muscle sont plus grandes que celles du muscle rouge et fournissent une production de puissance plus élevée (Rome, 2006).

Les fibres musculaires rouges, plus petites, tirent leur nom des niveaux élevés de myoglobine qu'elles possèdent pour faciliter l'apport en O<sub>2</sub> aux mitochondries. Elles présentent une densité mitochondriale plus élevée, des réserves lipidiques accrues et une capacité plus grande d'oxydation des acides gras par rapport au muscle blanc (Bone, 1966; Johnston, 1977; Leary et al., 2003; Morash et al., 2008).

Dans la plupart des espèces de poissons, jusqu'à 85% de la musculature du tronc et 60% de la masse corporelle sont constitués de muscles blancs (Sänger et Stoiber, 2001).

Les proportions de muscle rouge varient considérablement entre les espèces, certaines présentant un troisième type de muscle de couleur rose avec des propriétés contractiles et métaboliques intermédiaires (Figure 1).

Les différents degrés de plasticité dans ces trois types de muscles surviennent car chacun détecte et répond à des stress de manière distincte. De plus, au sein d'un même type de muscle, la réponse à un stress particulier peut impliquer une augmentation de la taille des fibres (hypertrophie), tandis que le même muscle peut répondre à un autre stress en changeant de phénotype métabolique sans croissance hypertrophique (McClelland et al., 2006).

Les propriétés des différents types de fibres musculaires chez les poissons sont récapitulées dans le Tableau 01.

**Tableau 1:** Caractéristiques principales de fibres musculaires des poissons (Currie et al., 2020).

Type de fibre	Dominant MyATPase	Densité Mitochondriale	Capacité Anaérobie
Lent	Type I	Élevée	Basse
Intermédiaire	Type IIa	Intermédiaire	Intermédiaire
Rapide	Type IIb	Basse	Élevée

### 1.3.2 Tissu conjonctif intramusculaire

Le tissu conjonctif entourant les fibres musculaires est principalement constitué de collagène et de protéoglycanes. Les collagènes, des glycoprotéines fibreuses, forment des fibrilles stabilisées par des liaisons de réticulation. Dans les muscles des mammifères, les collagènes de type I et III sont majoritaires, tandis que chez les poissons, ce sont les collagènes de type I et V qui prédominent.

Les protéoglycanes sont des molécules complexes liées à plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes, régulant la composition et la structure de la matrice extracellulaire. La proportion et le degré de réticulation du collagène intramusculaire varient selon divers facteurs tels que le muscle, l'espèce, le type génétique, l'âge, le sexe et l'exercice physique (Listrat et *al.*, 2015).

Les niveaux de collagène chez les poissons varient considérablement selon les espèces, avec un facteur de variation de 1 à 10 entre des espèces telles que la sardine et le congre (Sato et *al.*, 1986).

De plus, au sein d'une même espèce, il existe des variations entre les différentes parties du poisson, par exemple entre l'avant et la partie caudale du filet, cette dernière étant souvent plus riche en collagène (Sikorski et *al.*, 1984).

### **1.3.3 Tissus adipeux et lipides intramusculaires**

La composition lipidique du muscle se compose principalement de lipides structurels, tels que les phospholipides, ainsi que de lipides de réserve, comme les triglycérides et le cholestérol. Les triglycérides sont stockés en quantité relativement faible (entre 5 et 20%) dans le cytoplasme des fibres musculaires sous forme de gouttelettes lipidiques (lipides intramyocellulaires), tandis que la majeure partie (environ 80%) est stockée dans les adipocytes (Essen-Gustavsson et *al.*, 1994).

La quantité de lipides intramyocellulaires chez les poissons varie considérablement d'une espèce à l'autre, passant de moins de 1% pour les poissons maigres à plus de 10% pour les poissons gras (Médale et *al.*, 2009).

## **1.4 Structure d'un muscle squelettique**

Le muscle squelettique des animaux terrestres est constitué de fibres musculaires regroupées en faisceaux parallèles. Chaque niveau de cette structure est enveloppé par du tissu conjonctif. On distingue ainsi, de la partie centrale du muscle vers sa périphérie, l'endomysium qui entoure chaque fibre musculaire, le pérимыsium qui délimite les faisceaux de fibres musculaires, et l'épимыsium, qui constitue l'enveloppe externe du muscle (Figure 2). Lorsque les morceaux de viande consommés proviennent d'un seul muscle, l'épимыsium est généralement retiré (Listrat et *al.*, 2016).

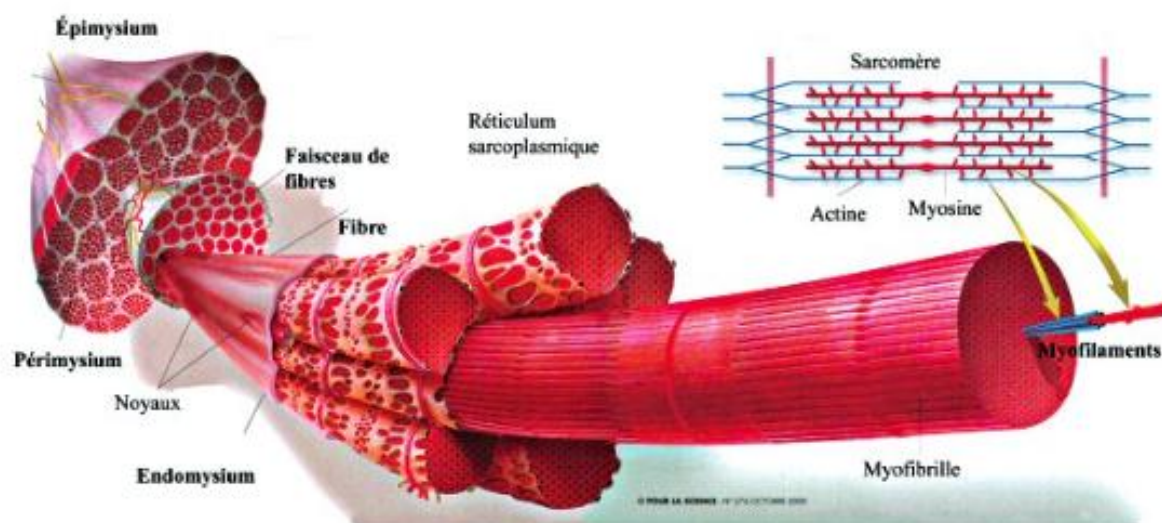


Figure 2 : Organisation générale du muscle (Listrat et *al.*, 2016).

### 1.4.1 Structure macroscopique

Le tissu musculaire des poissons est composé de muscle strié, similaire au muscle squelettique des vertébrés supérieurs (Kiessling et *al.*, 2006).

Listrat et ses collègues (2016) ont effectivement décrit le muscle squelettique comme un tissu hautement spécialisé et différencié, composé de divers éléments. Chez le poisson, la partie consommée est le filet. Ce filet correspond au muscle du poisson (Figure 3).

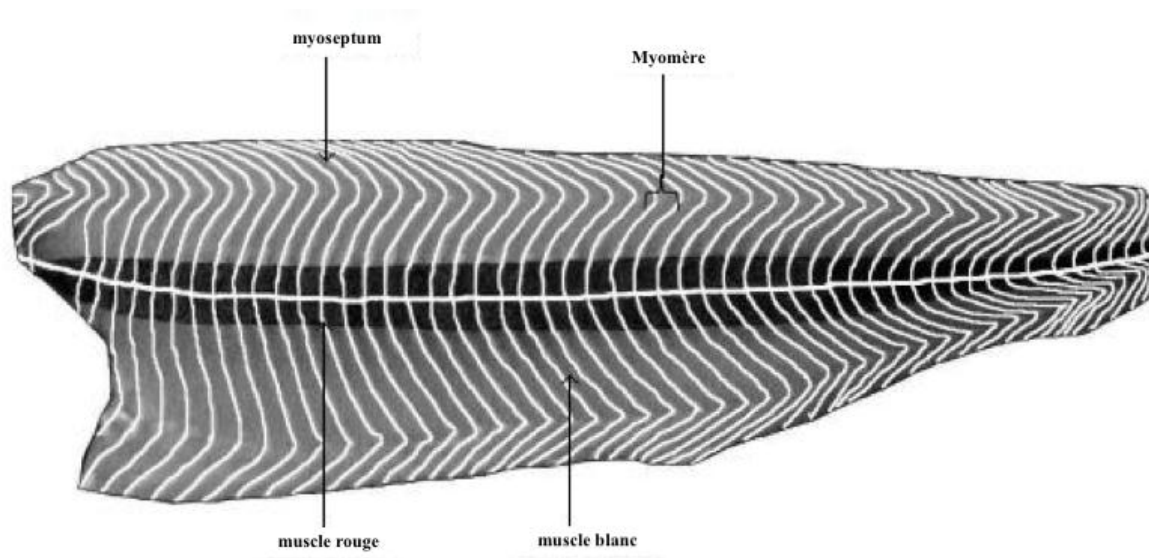


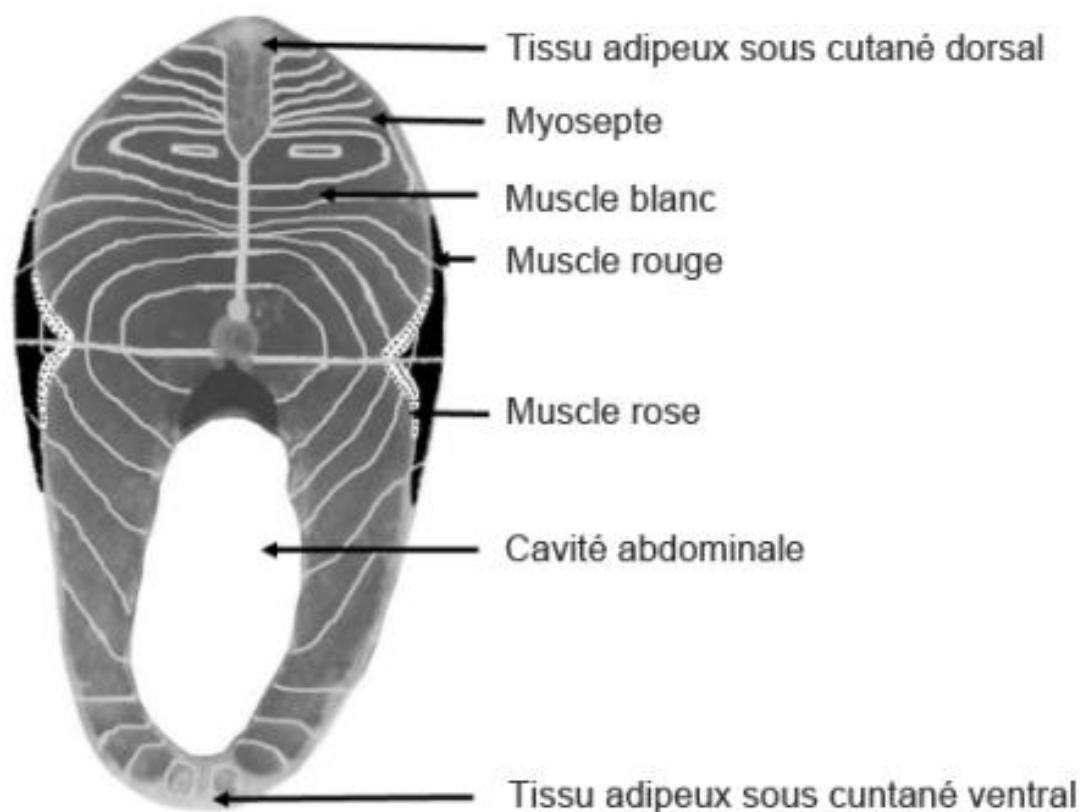
Figure 3: Représentation d'un filet de poisson en coupe longitudinale (Listrat et *al.*, 2016).

De plus, le muscle des poissons contient une proportion plus élevée d'eau et de collagène par rapport aux muscles des animaux terrestres, ce qui contribue à leur flexibilité et à leur flottabilité. Certains poissons ont une structure musculaire relativement simple et peuvent manquer du système de tendons développé que l'on trouve chez d'autres vertébrés. Au lieu de cela, les poissons ont des fibres musculaires s'étendant en parallèle le long de l'axe longitudinal et fermement attachées à des gaines de tissu conjonctif, qui sont ancrées au squelette et à la peau (Love, 1970).

Le filet de poisson est composé de plusieurs muscles, appelés myomères, qui s'emboîtent les uns dans les autres et sont séparés par des cloisons de tissu conjonctif, appelées myoseptes, d'une épaisseur de quelques millimètres. Ces myoseptes s'étendent de l'axe vertébral à la peau, traversant successivement les différents muscles. Leur rôle est de permettre la transmission des forces de contraction des fibres musculaires d'un myomère à l'autre, ainsi qu'au squelette et à la peau. Cette organisation particulière, caractérisée par l'alternance de feuillets musculaires et conjonctifs, forme une structure appelée «métamérique» (Listrat et *al.*, 2016).

Chez un poisson de forme ronde au stade commercial, les myomères présentent une configuration en forme de W sur le filet (Figure 3), mais cette organisation apparaît plus complexe en coupe transversale (darne) (Figure 4).

En plus du myosepte, qui peut être comparé à l'épimysium, le tissu conjonctif intramusculaire des poissons forme un réseau de soutien de la masse musculaire similaire à celui des animaux terrestres (Listrat et *al.*, 2016).



**Figure 4:** Schéma de l'organisation et la répartition de la musculature sur une darne (coupe transversale) de truite (Listrat et *al.*, 2016).

Une autre caractéristique singulière du muscle des poissons est la séparation anatomique, à une échelle macroscopique, des trois principaux types de muscles : un muscle blanc prédominant, un muscle rouge superficiel (proche de la peau) et un muscle rose intermédiaire. Ces muscles sont présents dans chaque myomère (Figure 4).

Les fibres musculaires blanches sont à contraction rapide, anaérobies et impliquées dans des rafales d'activité rapides. Les fibres musculaires rouges sont à contraction lente, aérobies et fournissent des contractions soutenues. Les fibres musculaires roses sont intermédiaires, combinant des aspects des fibres musculaires blanches et rouges (Kiessling et *al.*, 2006 ; Listrat et *al.*, 2016).

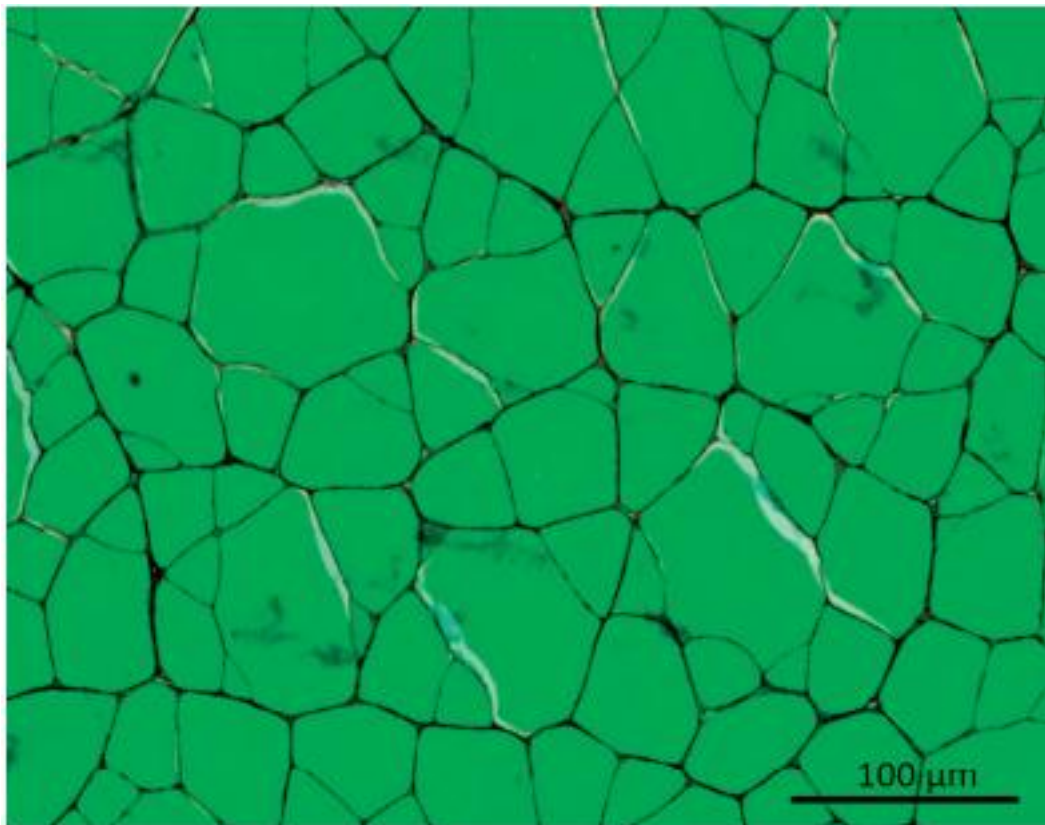
Le filet de poisson contient également du tissu adipeux intramusculaire, situé entre les fibres musculaires à l'intérieur d'un myomère et dans le périmysium, mais surtout dans les myoseptes qui séparent les myomères (Listrat et *al.*, 2016).

### 1.4.2 Structure microscopique

Le muscle squelettique ou strié présente une grande variété de formes morphologiques, mais tous ont la même structure de base, composée de longues cellules multinucléées appelées fibres musculaires. Chaque fibre musculaire individuelle comprend des ensembles de fines myofibrilles, chacune composée de séries discrètes d'unités contractiles appelées sarcomères qui s'étendent le long de la longueur de la myofibrille.

La répartition des tailles de fibres chez les poissons varie en fonction de l'importance relative des phases de croissance hypertrophique (augmentation de la taille cellulaire, réversible ou irréversible, associée à une augmentation du volume) et hyperplasique (augmentation du volume due à une multiplication des cellules) (Bonnet et *al.*, 2015).

Dans la figure 5, la masse musculaire présente une structure en "mosaïque", où l'on observe la coexistence de fibres de petite et de grande taille, d'environ 10  $\mu\text{m}$  à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre respectivement (Listrat et *al.*, 2016).



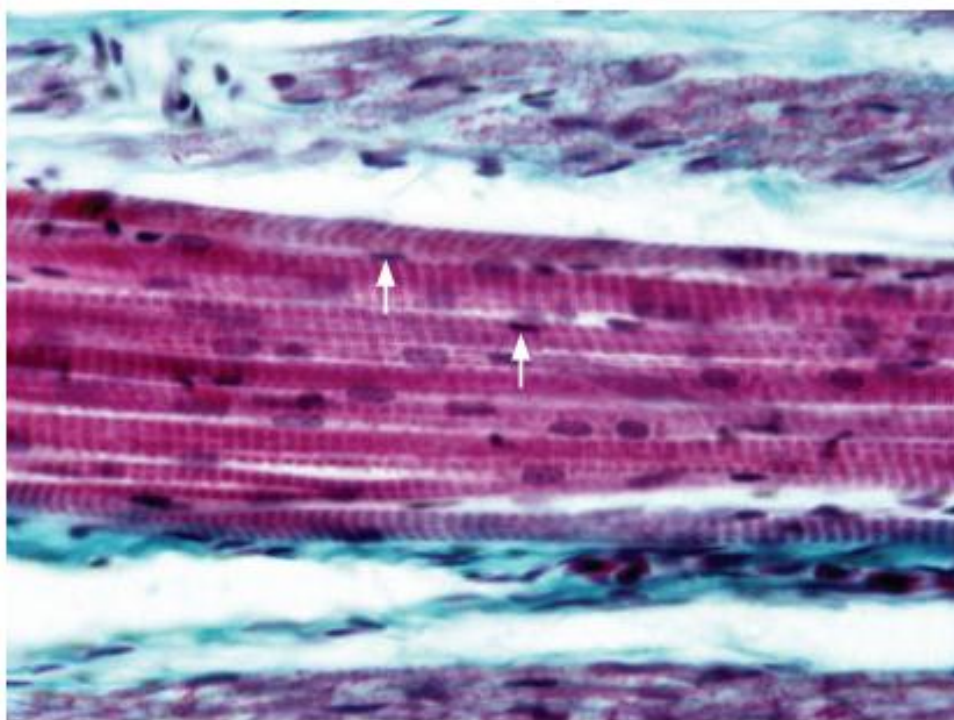
**Figure 5:** Coupe transversale de muscle blanc de Bar (*Dicentrarchus labrax*) colorée au rouge sirius et au vert rapide (Listrat et *al.*, 2016).

Les fibres musculaires squelettiques, également appelées rhabdomyocytes, sont des structures multinucléées qui s'étendent et se fixent aux os du squelette (Figure 6). Typiquement,

ces fibres se divisent en deux types chez les poissons, à savoir rouge et blanc, caractérisés par leurs niveaux respectifs de vascularisation et de myoglobine (Mokhtar, 2021).

Les rhabdomyocytes présentent des noyaux ovales (Figure 6), généralement disposés en périphérie sous la membrane plasmique, connue sous le nom de sarcolemme. Sous un fort grossissement microscopique, les myofibrilles longues et filiformes peuvent être observées, s'étendant parallèlement les unes aux autres sur toute la longueur de la fibre. Lorsqu'elles sont sectionnées transversalement, les rhabdomyocytes prennent une forme polyédrique, avec des noyaux situés en périphérie. Les espaces intercellulaires sont comblés par du tissu conjonctif lâche contenant des capillaires (Genten et *al.*, 2009).

Chaque fibre musculaire individuelle repose dans une fine couche de tissu conjonctif lâche - le périnysium - qui forme le cadre structurel des fibres nerveuses et du réseau capillaire (Kirschbaum et *al.*, 2020).



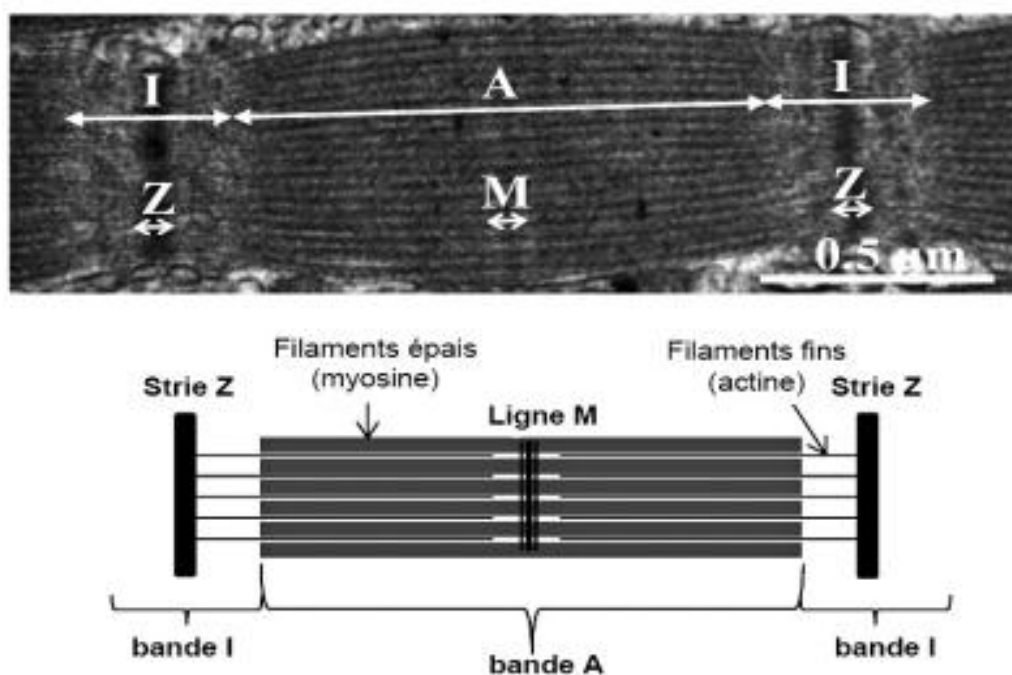
**Figure 6:** Les rhabdomyocytes de *Gnathonemus petersi* (MT / HM) (Genten et *al.*, 2009).

De plus, le muscle des poissons présente souvent un aspect strié en bandes en raison de l'alternance de bandes claires et sombres résultant de l'arrangement des myofibrilles et du réticulum sarcoplasmique (Breccia et *al.*, 2022).

Quelle que soit l'espèce considérée, les myofibrilles alignées en faisceaux occupent la presque totalité du volume intracellulaire des fibres musculaires. Elles ont un diamètre

d'environ 1  $\mu\text{m}$  et sont constituées de sous-unités encore plus petites, les myofilaments (Listrat et *al.*, 2015).

Les myofibrilles, observées en coupe longitudinale par microscopie électronique en transmission, présentent une alternance de bandes sombres (bandes A) et de bandes claires (bandes I). Chaque bande I est divisée en deux par la strie Z. Le sarcomère, qui est l'unité fonctionnelle contractile de la myofibrille (Figure 7), est délimité par deux stries Z consécutives. Les myofilaments fins sont principalement constitués d'actine, de protéines régulatrices de la contraction musculaire telles que les troponines T, I et C, ainsi que de la tropomyosine disposée le long des chaînes d'actine. Les myofilaments épais sont principalement composés de molécules de myosine, dont l'activité ATPasique catalyse la dégradation de l'ATP en ADP, fournissant ainsi l'énergie nécessaire à la contraction musculaire (Listrat et *al.*, 2015).



**Figure 7:** Structure d'un sarcomère observé en microscopie électronique (en haut) et schématisé (en bas) (Listrat et *al.*, 2015).

## 2 POISSON FRAIS : DÉFINITION ET MÉTHODES DE CONSERVATION

### 2.1 Définition du poisson frais

Le terme "poisson frais" désigne des fruits de mer qui ont été récemment capturés et traités, tout en conservant leur état naturel avant d'être vendus ou consommés. Cela contraste avec le poisson congelé, fumé ou autrement conservé, où le poisson peut avoir subi divers traitements après sa capture (Soto et *al.*, 2019).

### 2.2 Méthodes de conservation

Les méthodes de conservation du poisson visent à maintenir la fraîcheur et la qualité des poissons capturés jusqu'à ce qu'ils atteignent le marché. Diverses méthodes sont utilisées dans le monde entier pour conserver le poisson, chacune ayant un impact sur la qualité et la sécurité du produit. Certaines techniques courantes comprennent : le refroidissement, la réfrigération et la congélation.

#### 2.2.1 Refroidissement

Le refroidissement vise à réduire la température du poisson à 0°C dans le but principal de prévenir les activités physiques, chimiques et microbiologiques qui se produisent dans des conditions normales en réduisant la température. Bien que le refroidissement ne puisse pas complètement arrêter le gâchis du poisson, il le retarde efficacement. Plus la température est basse, plus la durée de conservation est longue, car les micro-organismes mésophiles et thermophiles sont retardés à la température de refroidissement (Nalan et Pınar, 2015).

Différentes méthodes de refroidissement sont utilisées pour le poisson et les produits de la pêche. La méthode la plus courante et efficace est le refroidissement avec de la glace. Cette méthode consiste à utiliser de la glace pour refroidir rapidement le poisson après la capture, garantissant ainsi sa fraîcheur et réduisant la croissance bactérienne. Le poisson est complètement entouré de glace car la capacité de refroidissement de la glace est très bonne (Nalan et Pınar, 2015).

Des recherches ont montré que le refroidissement rapide du poisson à l'aide de suspensions de glace peut entraîner des avantages tels qu'une durée de conservation accrue, une perte de poids réduite, une apparence améliorée et un temps de congélation amélioré (Pearson

et Blackhurst, 2001). De plus, le refroidissement du poisson avec des cristaux de glace de taille nano a également été étudié, montrant des résultats prometteurs en termes de taux de refroidissement et de maintien de basses températures pendant des périodes prolongées (Keys et *al.*, 2018).

### **2.2.2 Réfrigération**

La réfrigération est une méthode utilisée pour abaisser la température des produits de la mer en utilisant des systèmes de refroidissement mécaniques. Dans l'industrie du poisson, elle joue un rôle vital dans la préservation de la qualité et la prolongation de la durée de conservation des produits de la mer. Les méthodes traditionnelles consistent à refroidir le poisson avec de la glace ou à utiliser des systèmes de réfrigération mécanique pour maintenir des températures basses pendant le stockage et le transport (Magnussen et *al.*, 2001). Des techniques de réfrigération appropriées sont essentielles pour garantir que les produits de la mer parviennent aux consommateurs dans des conditions optimales, avec un minimum de détérioration et une durée de conservation prolongée.

L'air prend l'humidité de la surface du produit, et donc la surface du poisson devient sèche. Pour cette raison, la réfrigération est plus adaptée aux poissons glacés. Après le glaçage du poisson dans des boîtes ou des conteneurs, ils sont stockés sous réfrigération et un refroidissement efficace est ainsi obtenu. Différents systèmes de réfrigération et réfrigérants sont utilisés pour le poisson et les produits de la pêche. Des équipements de réfrigération peuvent être installés dans les navires de pêche, préservant ainsi la qualité du poisson juste après la capture. L'eau de mer réfrigérée (RSW) est une bonne méthode de refroidissement à bord, et l'équipement réfrigéré installé dans le navire produit de l'RSW (Nalan et Pinar, 2015).

### **2.2.3 Congélation**

D'autre part, la congélation est la méthode la plus efficace pour préserver la qualité originale du poisson pendant des périodes plus longues. Si la sensibilité du poisson à la détérioration est prise en compte, l'importance de ces méthodes de préservation sera comprise. Prolonger la durée de conservation du poisson et des produits de la mer, même de quelques heures, est très important (Nalan et Pinar, 2015).

La congélation est une méthode courante utilisée pour préserver le poisson en abaissant la température pour congeler les produits de la mer. Les avancées récentes dans les méthodes de congélation se sont concentrées sur la compréhension des effets des différentes techniques

de congélation sur la qualité du poisson et des fruits de mer. Ces méthodes ont évolué au cours des 30 dernières années, avec des recherches analysant les températures de congélation, les conditions de stockage des produits congelés et leur impact sur la formation des cristaux de glace, les protéines et les lipides dans le poisson (Jia et *al.*, 2022). Diverses méthodes de congélation, telles que la congélation sous haute pression ou la congélation par immersion, conservent la meilleure qualité des produits de la mer pendant le stockage sous congélation. De plus, la combinaison de méthodes de congélation avec des additifs ou des approches de prétraitement peut améliorer l'efficacité de la congélation et du stockage sous congélation (Jia et *al.*, 2022). Des méthodes expérimentales ou émergentes comme la congélation assistée par électrique, la congélation assistée par micro-ondes, la congélation assistée par magnétique et la congélation assistée par radiofréquence ont montré des effets positifs sur la qualité des produits, mais nécessitent des recherches supplémentaires et des investissements pour une application commerciale (Jia et *al.*, 2022).

L'optimisation des technologies de la congélation pour améliorer les processus de la ferme à la fourchette, y compris la congélation et le stockage sous congélation, est cruciale pour maintenir la qualité et la valeur nutritionnelle des produits de poisson congelés. Équilibrer la force de cisaillement initiale pendant la congélation et utiliser des additifs pour contrôler les dommages liés à la congélation sont des considérations importantes pour améliorer l'efficacité des méthodes de congélation. (Jia et *al.*, 2022).

### **2.3 Dégradation de la fraîcheur du poisson**

La fraîcheur est un attribut qui se réfère au poisson non congelé lorsqu'il conserve ses caractéristiques sensorielles, chimiques et nutritionnelles depuis sa capture. La perte de fraîcheur, en tant que conséquence du processus de dégradation du poisson, commence immédiatement après la capture (altérations *post mortem*), justifiant l'importance d'une manipulation soignée du poisson de la capture à la transformation/commercialisation pour maintenir la qualité de ce produit. Un tel soin déterminera l'activité enzymatique, bactérienne et oxydative dont la vitesse, et par conséquent, le processus de dégradation, dépend des méthodes de préservation appliquées, ainsi que de l'espèce de poisson, de sa taille, de la méthode de capture, de la température, du type de stockage et de l'état physique avant la mort (De Paiva et *al.*, 2012; Duarte et *al.*, 2020).

### 2.3.1 Altérations *post mortem*

Après la mort du poisson, des changements sensoriels, physico-chimiques et microbiologiques se produisent.

Les changements sensoriels sont liés à l'apparence, à la texture, à l'odeur et au goût perçus par les sens. Ces changements impliquent le brunissement ou l'obscurcissement des muscles par des réactions de Maillard (lorsqu'ils sont soumis à une élévation de température) ou par l'activité enzymatique, la libération de mucus constitué principalement de mucine (une glycoprotéine qui est un excellent substrat pour le développement bactérien) avec la libération d'une odeur désagréable (Gil et Barbosa, 2011; Duarte et *al.*, 2020).

De plus, les changements sensoriels incluent également la rétraction musculaire ou l'ouverture de la chair et l'éclatement des ventres (également appelé éclatement du ventre ou ventre brûlé), causé par l'action des enzymes digestives présentes dans l'intestin du poisson (Huss, 1995 ; Gil et Barbosa, 2011 ; Duarte et *al.*, 2020).

Les changements chimiques sont détectés par analyse chimique, pour identifier le niveau de dégradation et la formation de composés, afin d'inférer sur la qualité du poisson. D'autre part, les changements physiques permettent de déterminer d'autres paramètres de dégradation, tels que l'évaluation de la résistance électrique des tissus et la rigidité musculaire, qui diminuent progressivement jusqu'à l'état avancé de dégradation du poisson (Gil et Barbosa, 2011; Duarte et *al.*, 2020).

Les deux types de changements résultent de phénomènes qui interfèrent avec la valeur du pH, le catabolisme des nucléotides (*rigor mortis*), la dégradation des protéines, des acides aminés libres, des lipides, et la production de composés indésirables (amines biogènes et composés volatils azotés) (Gil et Barbosa, 2011; Duarte et *al.*, 2020).

Lorsque le poisson meurt et est stocké dans de la glace pendant 5 à 6 jours, les micro-organismes présents sont en phase de latence (également appelée phase de décalage ou de retard) pendant qu'ils s'adaptent au nouvel environnement (poisson mort), en ajustant les mécanismes de survie et de croissance en raison de l'absence d'oxygène. Après leur adaptation au nouvel environnement, les micro-organismes se développent de manière exponentielle, avec le début de la phase logarithmique (aussi appelée log), constituant la principale raison de la dégradation du poisson après le sixième jour dans la glace. En fait, l'action bactérienne est la principale responsable de la détérioration du poisson, comparée à l'action autolytique, responsable de la perte de qualité. Ce fait est soutenu par le début de l'autolyse dans le tube

digestif, qui peut être éliminée par l'éviscération (Gil et Barbosa, 2011). En effet, lorsque l'éviscération est effectuée dans des conditions d'hygiène appropriées, l'action des enzymes digestives et la migration des bactéries de la flore intestinale vers la chair du poisson sont prévenues (Jay *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2020).

### **2.3.2 Rigor mortis**

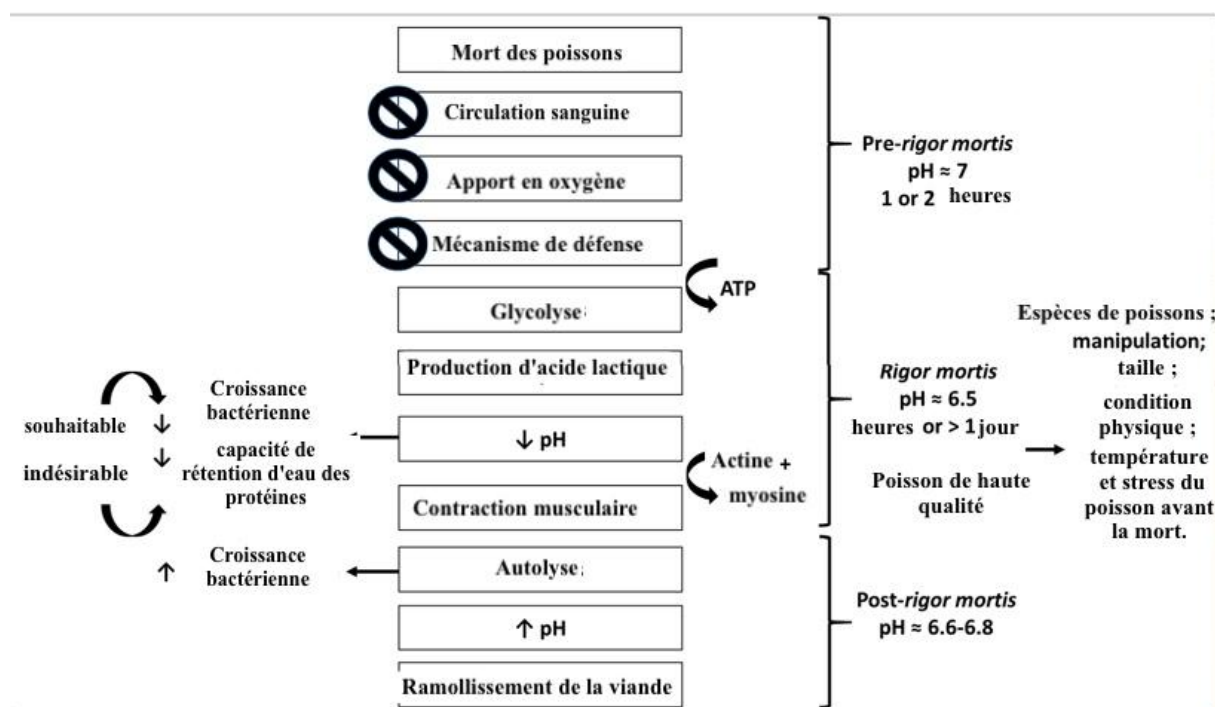
Au moment de la mort, appelée *pré-rigor mortis*, le muscle du poisson contient du glycogène, de la phosphocréatine et de l'ATP (adénosine triphosphate), lui permettant de conserver sa flexibilité et son élasticité pendant quelques heures. Une fois que le poisson est mort, la circulation sanguine et les mécanismes de défense s'arrêtent, ce qui interrompt l'apport en oxygène et déclenche le début de la dégradation anaérobie du glycogène, appelée glycolyse. La glycolyse se poursuivra sur une durée dépendant des réserves de glycogène de l'organisme vivant, qui sont plus élevées chez les poissons bien nourris et ceux ayant subi une mort peu agitée, ce qui permet d'augmenter la durée de conservation du poisson. Ce processus entraîne la dépense d'ATP jusqu'à des valeurs très faibles pour la production d'acide lactique, avec une diminution conséquente du pH. Cette diminution permet de réduire la croissance bactérienne (effet souhaitable) et la capacité de rétention d'eau des protéines (effet indésirable), marquant le début de la phase de rigor mortis (Gil et Barbosa, 2011 ; Duarte *et al.*, 2020).

Dans cette phase, des connexions entre les protéines contractiles (actine et myosine) sont établies, ce qui entraîne une contraction musculaire, le rendant rigide et inextensible (Huss, 1995; Duarte *et al.*, 2020).

La résolution du rigor mortis se produit après plusieurs heures voire plus d'une journée, selon l'espèce de poisson, sa manipulation, sa taille, sa condition physique et, surtout, la température et le stress avant la mort. Ainsi, avec un stress et une température plus faible, plus tard il commence, plus longtemps la raideur de la chair sera maintenue, ce qui signifie que le poisson avant ou pendant cette phase est synonyme de haute qualité. Avec la résolution du rigor mortis, les processus autolytiques sont initiés et, par conséquent, la détérioration du poisson commencera en raison de la création d'un environnement favorable à la croissance bactérienne. En conséquence de la production de composés azotés, les réactions autolytiques et bactériennes augmentent le pH à mesure que la période de conservation augmente (Gil et Barbosa, 2011 ; Duarte *et al.*, 2020).

Avec la mort du poisson, la circulation sanguine, l'approvisionnement en oxygène et les mécanismes de défense cessent, et le pré-rigor mortis commence, comme illustré dans la figure

8. Ce processus est caractérisé par la glycolyse, qui entraîne la consommation d'ATP (adénosine triphosphate) et la production d'acide lactique. Par conséquent, le pH baisse, ce qui déclenche le processus de rigor mortis, réduisant la croissance des microorganismes (effet souhaitable) tout en diminuant la capacité de rétention d'eau des protéines (effet indésirable). L'actine et la myosine se lient alors, provoquant la contraction musculaire et initiant le post-rigor mortis, accompagné du processus d'autolyse. Au fur et à mesure que la croissance des microorganismes augmente, le pH du milieu augmente également, conduisant à un adoucissement conséquent de la chair du poisson. Le post-rigor mortis débute après la fin du rigor mortis, et sa durée dépend de plusieurs facteurs tels que l'espèce de poisson, la manipulation, la taille, la condition physique, la température et le stress subi par le poisson avant sa mort (Duarte et *al.*, 2020).



**Figure 8:** Les processus biologiques qui sont initiés à la mort du poisson conduisant à sa dégradation (Duarte et *al.*, 2020)

## 2.4 Détérioration des poissons conservés sur glace

Lorsqu'il est conservé sur de la glace, le poisson présente un schéma typique de détérioration divisé en quatre étapes, où les deux premières phases correspondent à une perte de qualité par des processus autolytiques, tandis que les deux dernières sont associées à la

détérioration du poisson par l'action bactérienne. La première étape se caractérise par une grande fraîcheur du poisson, avec une odeur de mer (espèces sauvages) et un goût sucré. Dans la deuxième étape, le goût et l'odeur sont perdus, sans développement de goût désagréable et maintien d'une texture agréable (Huss, 1995; Duarte et *al.*, 2020)..

Des indices de détérioration tels que des odeurs désagréables, selon l'espèce de poisson et le type de métabolisme (aérobie/anaérobie), commencent généralement à apparaître dans la troisième étape, avec le développement d'une "odeur de poisson", d'ammoniac et de certains composés sulfuriques. Au début de la troisième étape, la saveur peut être légèrement vinaigrée, fruitée ou légèrement amère, surtout chez les poissons gras, devenant, avec le temps, une saveur ammoniacale et sulfureuse avec le développement d'une odeur rance (Huss, 1995; Duarte et *al.*, 2020)..

La texture peut être molle et aqueuse ou sèche et dure. Dans la quatrième phase, le poisson est classé comme détérioré et putride. Ainsi, les produits de la pêche frais, à l'exception de ceux conservés vivants, doivent être refroidis le plus rapidement possible, et le temps entre la capture et le refroidissement doit être limité à un maximum de trois heures et maintenu à une température proche de celle de la glace fondante, en tenant compte des conditions de survie des micro-organismes (Huss, 1995; Duarte et *al.*, 2020).

Des sardines (*Sardina pilchardus*) capturées sur la cote marocaine ont été soumises à une analyse sensorielle, à la détermination du pH, à la détermination de la teneur en histamine et au décompte bactérien pendant 18 jours, en étant conservées sur glace à 2-4 °C, après 6 h de leur capture. Les résultats ont montré qu'après 9 jours, selon l'analyse sensorielle et microbiologique, le produit manquait de qualité. Le pH du produit passe de 5,83 à 6,36, avec une augmentation supplémentaire après 18 jours de stockage. Par des méthodes colorimétriques et fluorométriques, il a été trouvé que la concentration en histamine a augmenté de 1,12 à 20 mg/100 g après 18 jours, ce qui peut être éventuellement corrélé avec l'augmentation du pH (El Marrakchi et *al.*, 1990).

Une autre étude visait à évaluer les changements sensoriels, la teneur en humidité et l'indice TBA des sardines capturées sur la côte atlantique galicienne. Les analyses ont commencé après 10 h de capture du poisson qui était maintenu dans de la glace en flocons. Il y a eu une perte de qualité des sardines après 8 jours, une différence de masse fraîche et déshydratée de 71 à 73,5% après 19 jours, ainsi qu'une augmentation de l'indice TBA de 0,65 à 2,66 (Losada et *al.*, 2004).

Les travaux de recherche menés par Aubourg (2001) et Panguila et *al.* (2017) sur le chinchard (*Trachurus trachurus*) confirment l'importance cruciale de la température de stockage pour préserver la qualité du poisson, où la première étude a atteint une durée de conservation du poisson de 14 jours lorsqu'il était conservé à 0 °C, tandis que la deuxième étude a signalé le maintien de la qualité pendant 7 jours lorsqu'il était conservé à 5°C, tous deux sur la glace.

Outre l'influence de la température de stockage, l'utilisation de glace ou de réfrigérateur est également importante, comme le note le travail de Chudasama et de ses collègues avec le maquereau indien (*Rastrelliger kanagurta*). Les auteurs évaluent les changements de qualité du poisson dans les deux conditions de stockage, basés sur des caractéristiques biochimiques (TVBN et TMA) et une analyse sensorielle.

Les résultats ont montré que le poisson stocké sur de la glace présentait une augmentation plus significative des valeurs de TVBN, de TMA et de pH par rapport au poisson réfrigéré (Chudasama et *al.*, 2018).

L'analyse sensorielle révèle qu'après 5 jours de stockage sur glace, le produit présente une qualité dégradée, contrairement au poisson réfrigéré qui conserve sa qualité après 7 jours, probablement en raison de la plus faible fluctuation de température à laquelle le poisson est soumis lorsqu'il est réfrigéré, comparé au poisson sur glace. De plus, les données sensorielles sont corroborées par les valeurs de TVBN et de TMA (30 à 35 mg de TVBN et 10 à 15 mg de TMA/100 g de muscle de poisson) qui indiquent la détérioration du poisson (Chudasama et *al.*, 2018)

Cette corrélation entre l'analyse sensorielle et les valeurs de TVBN n'a pas été rapportée dans le travail de Vásquez-Sánchez et de ses collègues, avec des valeurs inférieures à 30 mg/100 g pendant tout le stockage. Cependant, une forte corrélation a été rapportée entre la concentration en MDA et les odeurs de branchies, avec des odeurs et des saveurs légèrement désagréables, ainsi que des changements de texture (dureté, mâchabilité et adhérence) perçus par les évaluateurs dans des filets de tilapia (*Oreochromis niloticus*) cuits après 10 jours. Les auteurs supposent que ces corrélations peuvent résulter des produits générés pendant l'oxydation des lipides, où les changements de texture peuvent résulter de la dégradation des protéines myofibrillaires par la réaction du MDA avec les acides aminés. Les auteurs ont également signalé une corrélation positive entre le pH et les valeurs de TVBN, de TBARS, de TVC et de PC, ainsi qu'avec la dureté, la mâchabilité et l'adhérence (Vásquez-Sánchez et *al.*, 2020). Des résultats de texture similaires ont été rapportés par l'étude de Xu et de ses collègues

avec le turbot (*Psetta maxima*), où la dureté a diminué au fil du temps de stockage. Les auteurs ont signalé une diminution des niveaux de pH attribuée à la production d'acide lactique et à la libération de phosphate inorganique par la dégradation de l'ATP, suivie d'une augmentation du pH due à l'accumulation de composés alcalins (Xu et al., 2015).

Rong et ses collègues ont évalué l'effet de l'éviscération sur la durée de conservation du chinchard du Pacifique (*Cololabis saira*) pendant le stockage réfrigéré. Les auteurs ont rapporté que l'éviscération augmente légèrement la charge microbienne initiale en raison de l'exposition accrue de la chair du poisson à la surface et à l'environnement et aux procédures d'éviscération (tables de traitement et couteaux). Les Pseudomonadaceae étaient les bactéries dominantes dans les deux échantillons de poisson, avec des niveaux initiaux plus faibles rapportés chez les poissons éviscérés avec une augmentation rapide tout au long du temps d'analyse restant. Indépendamment des niveaux initiaux plus faibles rapportés chez les poissons éviscérés, les auteurs ont rapporté que ce processus accélère la croissance des Pseudomonadaceae et modifie le microbiote du poisson. Selon les auteurs, une valeur de 7 log<sub>10</sub> cfu/g, considérée comme le niveau d'acceptabilité normal, a presque été atteinte après 10 et 6 jours pour les poissons entiers et éviscérés, respectivement, ainsi que des valeurs de TVBN proches de 30 mg/100 g. De plus, une valeur de TBARS de 5 mg/kg, considérée comme le niveau de détérioration des poissons gras, a presque été atteinte au jour 10 pour les poissons éviscérés et dépassée après 14 jours pour les poissons entiers (Cao et al., 2020).

## 2.5 Détérioration du poisson congelé

La détérioration du poisson congelé dépend du taux de congélation, de la température de stockage et d'oxygène, des fluctuations de température et des étapes de transport. La congélation est basée sur la formation de cristaux de glace, qui sont plus grands dans un processus lent, causant la dénaturation des protéines, la rupture des membranes cellulaires avec perte de fluides à la décongélation, ce qui résulte en un produit de qualité inférieure. Lorsque le processus de congélation est effectué rapidement, les cristaux sont plus petits, minimisant les pertes de fluides à la décongélation, ce qui donne un produit de haute qualité.

Cependant, les fluctuations de température induisent la recristallisation, réduisant la qualité du produit qui devient équivalent à un produit de congélation lente (Huss, 1995 ; Dawson et al., 2018).

Par conséquent, les changements dans la qualité du poisson congelé impliquent un changement de couleur (dû à la détérioration à la surface alimentaire, des actions chimiques et

biologiques), une perte de poids (induite par la croissance des cristaux de glace), une augmentation de l'activité enzymatique et de l'oxydation des lipides (Dawson *et al.*, 2018).

Les changements texturaux dans le poisson congelé n'ont pas un mécanisme entièrement connu, mais on croit qu'ils sont essentiellement dus à la transformation de la capacité de rétention d'eau des myofibrilles, avec formation de formaldéhyde et de DMA. Une telle capacité est modifiée par l'espacement/compression entre les fibres par la glace formée entre les myofibrilles ou par certaines transformations qui rendent les fibres musculaires incapables d'absorber l'eau perdue dans leur congélation, les empêchant de récupérer leur volume (Huss, 1995 ; Dawson *et al.*, 2018)

Aubourg et ses collègues ont mené une étude avec des chinchards capturés en Espagne qui ont été conservés dans un congélateur à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  et  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , après 10 h de capture, et des analyses sensorielles ont été effectuées après 12 et 5 mois de conservation, respectivement. Pour les deux températures, la teneur en humidité a varié entre 74 et 78%. La teneur en TBA a augmenté jusqu'à 5 mois de stockage pour les deux températures testées, suivie d'une réduction après un an (Aubourg *et al.*, 2004)

Dans une étude précédente des mêmes auteurs, une durée de conservation de 5 mois est obtenue lorsque le chinchard est d'abord conservé sur de la glace ( $0-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pendant 5 jours, suivi de la congélation à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La même étude a confirmé que lorsque la réfrigération initiale est effectuée pendant 1 à 3 jours, la durée de conservation augmente à 7 mois. De plus, contrairement à ce qui a été rapporté dans la dernière étude d'Aubourg et de ses collègues, les valeurs de TBA étaient plus élevées dans les derniers mois de l'étude (Aubourg *et al.*, 2002).

Cette augmentation des valeurs de TBA a également été rapportée par Calanche et ses collègues, qui ont étudié la daurade entière, éviscérée et filetée (Calanche *et al.*, 2019). Les auteurs ont conclu que le poisson fileté a une durée de conservation plus courte, une charge microbienne plus élevée et une teneur plus élevée en acides aminés libres que le poisson éviscéré et entier. La présence d'hydroxyproline a été associée au poisson entier, à l'arginine et à la glutamine au poisson éviscéré et à la glycine, à la taurine et à l'acide glutamique aux filets (Calanche *et al.*, 2019)

Cependant, des charges microbiennes plus élevées sont rapportées sur la peau du poisson par rapport aux filets et surtout par rapport au muscle du poisson, selon Popelka et ses collègues chez la truite arc-en-ciel (Popelka *et al.*, 2014). Les auteurs ont effectué l'analyse microbiologique sur des échantillons de poisson frais à leur arrivée au laboratoire et après 7 jours, et 1, 3 et 6 mois de congélation. Ces analyses microbiologiques comprennent la détection

de la TVC, du PC et des *Pseudomonas*. La TVC et le PC ont révélé une légère diminution du nombre de colonies entre le poisson frais (muscle et filet) et le poisson congelé (après 1 mois), alors qu'aucun changement de compte n'a été observé sur la peau. Dans l'expérience de TVC, une augmentation plus importante entre le troisième mois de congélation et le sixième mois a été rapportée pour tous les échantillons. En revanche, l'expérience du PC révèle que la plus forte teneur en *Pseudomonas* a été rapportée pour les échantillons de peau et de filet, étant absente pendant le stockage des échantillons de muscle congelé. De plus, les valeurs de pH n'ont pas présenté de différences statistiques dans les échantillons congelés, tandis que les valeurs de TVBN des échantillons frais étaient significativement différentes de celles des échantillons congelés (Popelka *et al.*, 2014).

Malgré les différences entre les espèces, l'augmentation de la durée de conservation des filets peut être obtenue en retirant le muscle foncé par décapage profond, selon une étude sur le hareng menée par Dang et ses collègues (Dang *et al.*, 2017). Les auteurs ont révélé que le muscle foncé est plus sensible à l'oxydation des lipides que le muscle clair, après avoir analysé des filets de hareng pendant 14 mois à une température stable (entre  $-12^{\circ}\text{C}$  et  $-10^{\circ}\text{C}$ ) et dans des conditions de stress (Dang *et al.*, 2017). La stabilité du poisson soumis à des abus de température a également été étudiée dans le travail de Romotowska et ses collègues avec le maquereau (Romotowska *et al.* 2017). Dans leur enquête, deux types d'échantillons ont été analysés : l'un soumis à un abus de température ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) pendant un mois suivi d'un stockage à température constante ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) pendant 9 mois et l'autre avec un stockage stable ( $-25^{\circ}\text{C}$ ), dans les deux cas avec des échantillons prélevés en juillet et en septembre. Les résultats n'ont révélé aucune différence statistique entre les conditions en ce qui concerne la teneur en eau et en lipides, ainsi qu'une augmentation de l'oxydation des lipides et de la teneur en acides gras libres, avec un effet conséquent sur la qualité et la stabilité du produit. De plus, selon les auteurs, la teneur en acides gras libres a montré une augmentation possible de l'activité enzymatique due aux fluctuations de température, car la détérioration des lipides ne peut pas être inhibée dans des conditions appropriées après que des dommages ont été causés (Romotowska *et al.*, 2017).

La qualité des produits congelés est étroitement liée aux paramètres de congélation, mais aussi aux conditions de décongélation en raison de leur influence sur les réactions chimiques et la dégradation musculaire. Pour tester l'influence de la température de décongélation sur la qualité des filets de morue de l'Atlantique, deux températures différentes ont été appliquées dans un système de circulation d'air (Roiha *et al.*, 2018). Un lot a été décongelé à  $10^{\circ}\text{C}$  pendant 4 h, l'autre a été décongelé à la même température pendant 2 h puis

abaissé à  $-0,5\text{ °C}$  pendant 26 à 27 h et les deux lots ont été filetés et conservés à  $2,9 \pm 0,6\text{ °C}$  pendant 6 jours. Les résultats n'ont montré aucune différence statistique dans l'évaluation sensorielle au fil du temps, avec une faible prévalence de rougeur musculaire et de taches de sang. C'était une indication de la bonne qualité des filets des deux lots, ainsi qu'une capture douce avec peu de contusions ainsi qu'un saignement suffisant après la capture. De plus, aucune différence statistique n'a été rapportée dans la texture des filets, la TVC, les bactéries productrices de  $\text{H}_2\text{S}$  et la TVBN. Cette absence de différences entre les méthodes de décongélation et la détection de la limite de durée de conservation peut être expliquée, selon les auteurs, par la courte durée de l'analyse (Roiha et al., 2018).

L'effet de la décongélation lente a été étudié dans une autre enquête, où l'évolution du pH, de l'azote amino et de l'azote provenant des acides aminés a été évaluée chez la carpe (*C. carpio*), le silure (*S. glanis*), le maquereau (*S. japonicus*) et le merlu (*M. merluccius*) pendant 48 heures avec des échantillonnages à l'instant 0 et après 3, 9, 15, 21, 30, 36, 42 et 48 heures de décongélation (47). À l'instant 0, des différences faibles ou non significatives ont été observées entre les espèces. Après 9 et 30 heures, toutes les espèces ont révélé une augmentation du pH, la période de 30 heures étant également marquée par le niveau maximal d'azote provenant des acides aminés (NAA). Entre 9 et 15 heures, la plus forte augmentation des valeurs de TMA a été rapportée pour toutes les espèces, à l'exception de la carpe (42 à 48 heures), les valeurs les plus élevées ayant été rapportées chez le silure et les plus basses chez le maquereau. Selon les auteurs, une teneur de 0-1 mg/100 g de TMA indique un poisson frais, 1-5 mg/100 g un poisson relativement frais et 5 mg/100 g un poisson altéré, ce qui n'est pas concordant avec ce qui a été rapporté précédemment par Chudasama et ses collègues où 10-15 mg/100 g indique un poisson altéré (Chudasama et al., 2018 ; Avramiuc, 2017).

De telles différences affecteront le jugement sur la fraîcheur du poisson et, par conséquent, sa durée de conservation. Cependant, il convient de noter qu'il existe des limites légales différentes dans chaque pays (par exemple, 25-35 mg/100 g selon la réglementation européenne), et différentes limites sont établies pour chaque expérience, ce qui peut influencer la plage de valeurs adoptée par chaque auteur. Ainsi, selon Avramiuc, après 9 heures de décongélation, seul le maquereau est resté relativement frais et après 15 heures, tous les échantillons étaient altérés (Avramiuc, 2017). Selon l'auteur, le silure et le merlu avaient la vitesse de détérioration la plus élevée et le maquereau la plus faible.

Cependant, dans l'étude de Hematyar et de ses collègues avec la carpe, une durée de conservation de 24 semaines a été atteinte grâce à un stockage des filets de carpe à  $-20\text{ °C}$  (Hematyar et al., 2018). Cependant, dans leur étude, le processus de décongélation n'a pas été

étudié. Dans leur enquête, il a été constaté que la fermeté des filets de carpe congelés diminuait en raison du processus de congélation mais pas en raison du temps de stockage. De plus, les auteurs ont également signalé une corrélation entre l'oxydation des lipides et les aspects sensoriels (Hematyar et *al.*, 2018).

Outre les fluctuations de température, le sang et les composants sanguins, comme la myoglobine et l'hémoglobine, dans le muscle du poisson contribuent également à l'oxydation des lipides, ce qui varie selon les espèces et dépend des conditions de saignement (par exemple, temps, support et température de saignement). Les phospholipides sont les principaux composants des lipides sanguins et sont très susceptibles à l'oxydation, suggérant que les lipides sanguins contribuent à l'oxydation des lipides (Van Nguyen, 2018). Par conséquent, Nguyen et Phan ont étudié l'effet des conditions de saignement sur la qualité et la dégradation des lipides des filets de cobia d'élevage (*Rachycentron canadum*) pendant le stockage. À cette fin, les auteurs ont étudié trois groupes de test : (1) filets non saignés ; (2) coupés dans la gorge et saignés à l'air pendant 15 minutes ; (3) coupés dans la gorge et saignés dans de l'eau glacée ( $4 \pm 1$  °C) pendant 15 minutes, suivis d'un emballage à l'air dans des sacs en polyéthylène, d'une congélation rapide par soufflage d'air ( $-35$  °C) pendant 3 heures et d'un stockage dans des boîtes en carton ( $-20 \pm 2$  °C) pendant 24 semaines. Les résultats ont montré que le saignement à l'eau glacée favorisait une teneur plus faible en fer héminique et non héminique dans le muscle du poisson. De plus, il a été confirmé que la dégradation des lipides présentait des corrélations élevées avec la teneur en fer héminique et non héminique, et que l'oxydation des lipides et les pigments héminiques sont la principale cause de décoloration de la chair pendant le stockage par congélation (Van Nguyen, 2018).

En raison de l'importance de maintenir le binôme temps-température dans la qualité des produits congelés et réfrigérés, la théorie de la tolérance temps-température a été développée. Cette théorie stipule que : pour chaque produit congelé, il existe une relation entre la température de stockage et le temps nécessaire pour changer la qualité du produit ; les changements pendant le stockage et la distribution à différentes températures sont cumulatifs et irréversibles sur toute la période de stockage (Johnston, 1994).

Comme la température en dessous de 0°C est la zone critique de détérioration par dénaturation des protéines, lors de la congélation rapide, il est recommandé que la température de tous les poissons soit réduite de 0°C à -5°C en 2 heures ou moins. La température doit ensuite être réduite à nouveau jusqu'à ce qu'une température de stockage moyenne de -30°C soit obtenue à la fin du processus de congélation. La dernière exigence est que la partie la plus chaude du poisson (épine) soit réduite à -20°C à la fin du processus. Lorsque cette température

est atteinte, les parties les plus froides du poisson seront à la température de l'équipement de congélation ou proches de  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tandis que la température moyenne sera proche de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Johnston, 1994).

C'est l'une des définitions de congélation rapide qui garantit un produit de bonne qualité.

## **2.6 Méthodes de détermination de la fraîcheur et de différenciation frais/décongelé déjà existantes**

### **2.6.1 Analyses sensorielles**

La fraîcheur du poisson est initialement évaluée par des analyses sensorielles, qui se basent sur le goût, l'odeur et l'aspect du produit. Ces méthodes sont qualitatives, et l'une d'entre elles est la méthode de l'Indice Qualité (QIM). Les évaluateurs attribuent des notes pour différents caractères, adaptées à chaque espèce. Certains critères sont notés 0 ou 1 pour absence ou présence d'altération, sans niveau intermédiaire. Pour d'autres caractéristiques comme l'odeur, les notes vont de 0 à 3, permettant de suivre les étapes d'altération du produit. Un index qualité plus élevé indique un produit plus altéré (Alim et *al.*, 2020).

La grille d'évaluation pour déterminer la fraîcheur de la sardine prend en compte quatre caractéristiques principales : la peau, les yeux, les branchies et l'abdomen. Chacune de ces caractéristiques est décomposée en critères spécifiques. Par exemple, pour la peau, la couleur, le mucus, l'odeur et la texture sont évalués. Pour les yeux, la couleur de la pupille et sa forme sont prises en considération. Les branchies sont évaluées en fonction de la couleur, du mucus et de l'odeur émise. Enfin, la couleur et l'odeur de l'abdomen sont également évaluées pour déterminer la fraîcheur de la sardine (Nunes et *al.*, 1992 ; Valls et *al.*, 2004).

La méthode sensorielle peut également être utilisée pour différencier les poissons entiers frais des poissons entiers décongelés, juste par l'observation de certains critères. Ainsi un poisson décongelé présente un œil opaque contrairement à un poisson frais, de même une décoloration des branchies peut être observée sur le poisson décongelé. Il est également possible de regarder la capacité de rétention de l'eau du poisson, le poisson décongelé ayant une capacité amoindrie.

## 2.6.2 Mesure de la fraîcheur par mesure des amines

### 2.6.2.1 Mesure de l'azote basique volatil total (ABVT)

L'Azote basique volatil total est un mélange d'amines biogènes volatiles complexes libérées lors du processus de détérioration du poisson, dû à la décomposition enzymatique catalysée par les microorganismes responsables de la détérioration. La libération de ABVT sert d'indicateur analytique potentiel de la détérioration du poisson, avec des niveaux plus élevés indiquant une dégradation accrue et une fraîcheur réduite.

Sous l'appellation ABVT, on retrouve les triméthylamines ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N), les diméthylamines ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NH) et l'ammoniac (NH<sub>3</sub>). Les DMA et les TMA sont les produits de dégradation de l'oxyde de triméthylamine (OTMA). Pour détecter ces composés, une extraction est réalisée à l'aide d'une solution d'acide perchlorique. Cette étape est suivie d'une distillation de l'extrait qui est ensuite collecté dans de l'acide borique. L'extrait est ensuite titré à l'aide de l'acide chlorhydrique (Pacquit et *al.*, 2006). Des seuils ont été déterminés pour évaluer l'altération de la fraîcheur. Cependant, la mesure seule de l'ABVT n'est pas fiable. Il est également impératif de quantifier le taux de triméthylamines, comme illustré dans le Tableau 2 ci-dessous.

**Tableau 2:** Valeur seuil déterminant l'état de fraîcheur des poissons (IFREMER, 2008)

ABVT (mgN/100g)	TMA/ABVT(%)	État de fraîcheur
<20	<17%	Satisfaisant
20-25	17-40%	Acceptable
>25	>40%	Non satisfaisant

La mise en œuvre de la méthode de mesure de l'ABVT n'est pas utilisable non plus pour les poissons ou filets congelés/décongelés et conservés sur glace (Estupiñan et *al.*, 2000 ; Moosavi-Nasab et *al.*, 2021).

### 2.6.2.2 Mesure des amines biogènes

Les amines biogènes présentes dans le poisson comprennent l'histamine, l'agmatine, la putrescine, la cadavérine, la spermidine et la spermine. Ces amines sont produites lors de la détérioration du poisson par la décomposition bactérienne et peuvent entraîner des symptômes allergiques lorsqu'elles sont consommées (Hirofumi et *al.*, 2012). Les bactéries présentes dans le poisson catalysent la dégradation des protéines et d'autres composés azotés, ce qui entraîne

la formation de ces amines, qui servent d'indicateurs de la détérioration et de la fraîcheur (Hirofumi et *al.*, 2012 ; Boruah et *al.*, 2018).

Les amines biogènes sont quantifiées par des méthodes chromatographiques (HPLC, GC-MS ...), par des méthodes spectroscopiques (VIS, NIR) ou par des méthodes colorimétriques (Sørensen et *al.*, 2018). Un indice de qualité peut être calculé par la formule suivante :

$$\text{Indice chimique} = \frac{\text{Putrescine} + \text{Cadaverine} + \text{Histamine}}{1 + \text{Spermidine} + \text{Spermine}}$$

Cet index est utilisé pour le thon en conserve, les filets de saumon et les sébastes.

Pour les autres espèces, cet index n'est pas représentatif de la qualité du produit, c'est pour cela qu'un autre index a été mis en place :

$$\text{Indice amine} = \frac{\text{Putrescine} + \text{Cadavérine} + \text{Histamine}}{\text{Trypamine} + \text{Méthylamine} + \text{Spermidine} + \text{Spermine}}$$

Les stades précoces de détérioration ne sont pas détectables (Prabhakar et *al.*, 2020).

### 2.6.3 Mesure de l'oxydation des lipides

Les sources examinées apportent des éclaircissements significatifs sur le lien entre l'oxydation des lipides et les altérations de l'odeur et de la saveur chez le poisson, soulignant ainsi l'importance de surveiller et de gérer ce processus pour maintenir la qualité des produits de poisson et garantir une expérience gustative optimale aux consommateurs (Koizumi et *al.*, 2007 ; Cai et *al.*, 2014).

La détection de l'oxydation des lipides dans le poisson peut se faire grâce à une méthode simple et couramment utilisée appelée dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Cette méthode consiste à faire réagir le malondialdéhyde, un sous-produit de la peroxydation lipidique, avec l'acide thiobarbiturique pour former un complexe coloré. L'intensité de la teinte générée varie en fonction de la concentration de malondialdéhyde détectée, fournissant une mesure quantitative des niveaux d'oxydation des lipides (FAO, 2023). La mesure spectrophotométrique de l'absorbance de ce complexe coloré permet une évaluation simple et fiable de l'oxydation des lipides dans les échantillons de poisson.

### 2.6.4 Mesure des dérivés nucléotidiques

La valeur K est utilisée comme indicateur de fraîcheur, se basant sur la dégradation de l'ATP (adénosine triphosphate). L'ATP se décompose en ADP (adénosine diphosphate), qui à

son tour se dégrade en AMP (adénosine monophosphate). C'est l'AMP qui se transforme en IMP (inosine 5'-monophosphate). Les niveaux d'IMP sont liés à la saveur du poisson. La diminution des niveaux d'IMP est associée à une perte de goût dans le poisson. L'IMP est ensuite converti en inosine, puis en hypoxanthine. Les niveaux d'ATP, d'ADP, d'AMP, d'IMP, d'inosine et d'hypoxanthine peuvent être déterminés par chromatographie liquide à haute performance (Saito et *al.*, 2007).

$$K(\%) = \frac{\text{Inosine} + \text{Hypoxanthine}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{Inosine} + \text{Hypoxanthine}} \times 100$$

### 2.6.5 Mesure du pH

Les valeurs de pH des poissons peuvent être utilisées pour différencier entre les poissons congelés/décongelés et les poissons frais (Chiesa et *al.*, 2020) Dans l'étude menée par Avramiuc, les valeurs de pH des échantillons de poissons congelés ont augmenté de manière significative pendant le processus de décongélation, indiquant une altération (Avramiuc, 2017). Cette augmentation du pH a été observée dans les quatre espèces de poissons testées : la carpe, le poisson-chat, le maquereau et le merlu (Uddin, 2009). En revanche, les échantillons de poissons frais ont montré des valeurs de pH constantes (Hiroshi et *al.*, 1987). Par conséquent, surveiller les valeurs de pH des échantillons de poissons peut être un outil utile pour déterminer si le poisson a été congelé/décongelé ou s'il est frais (Sayed et *al.*, 2013).

### 2.6.6 Mesure de la flore microbienne

L'analyse microbiologique des produits de la mer est cruciale pour garantir leur qualité et leur sécurité pour la consommation. Les produits de la mer sont hautement périssables et vulnérables à la contamination microbienne, ce qui peut entraîner un gâchis et des maladies d'origine alimentaire.

La qualité microbiologique des produits de la mer peut être évaluée à l'aide de diverses méthodes, notamment l'évaluation de la charge microbienne et la détection des agents pathogènes. Les indicateurs courants de la qualité des produits de la mer comprennent le dénombrement total en plaques, *Escherichia coli*, les coliformes totaux, les *Vibrio spp*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella sp* (Wei et *al.*, 2020 ; Topić Popović et *al.*, 2018 ; Kim et *al.*, 2017 ).

Le contenu du microbiote psychrotrophe, qui peut causer des altérations et affecter la sécurité et la qualité du poisson, peut être utilisé comme critère microbiologique pour l'hygiène du poisson congelé (Topić Popovic et *al.*, 2018).

### **2.6.7 Méthodes spectroscopiques**

Les méthodes spectroscopiques, notamment la spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie Raman, ont été étudiées pour contrôler la qualité du poisson et distinguer entre le poisson frais et congelé. La spectroscopie Raman a été appliquée pour identifier les traitements de conservation illicites dans le poisson frais, fournissant des résultats rapides et précis (Robotti et *al.*, 2023). La spectroscopie de fluorescence a montré un potentiel dans la différenciation entre le poisson véritablement frais et les produits décongelés, grâce à l'excitation des fluorophores dans les gammes spectrales UV et visible (Hassoun, 2021). Les méthodes spectroscopiques de diffusion de surface améliorée ont été utilisées pour l'évaluation de la qualité du poisson et l'inspection de la sécurité, détectant les substances dangereuses et les comportements illégaux dans les périodes pré- et post-récolte (Hassoun et *al.*, 2020). Les techniques spectroscopiques, combinées à des outils chimiométriques, ont également été explorées comme des méthodes rapides et non destructives pour détecter le poisson décongelé, offrant une alternative aux méthodes de détection traditionnelles (Hassoun, 2021). La spectroscopie de réflectance dans le proche infrarouge (NIRS) a été utilisée pour prédire les valeurs nutritionnelles et discriminer entre le poisson d'élevage et sauvage, ainsi que le poisson frais et décongelé (Gonçalves et *al.*, 2021).

### **2.6.8 Méthodes histologiques**

L'histologie est considérée comme une méthode de contrôle de la qualité du poisson. L'analyse histologique des tissus de poisson, tels que les branchies et le foie, peut fournir des informations précieuses sur les effets des xénobiotiques et des polluants sur les organismes piscicoles (Sulekha et Mercy, 2022 ; Žák et *al.*, 2022). Les données de surveillance histologique peuvent être utilisées pour évaluer l'état morpho-fonctionnel des poissons et déterminer le statut physiologique des populations piscicoles dans les écosystèmes aquatiques dégradés (Liebel et *al.*, 2013). L'examen histologique des tissus de poisson peut également être utilisé pour l'évaluation qualitative et quantitative de la viande et des produits à base de viande, permettant ainsi le contrôle de la qualité et la vérification de l'étiquetage. Par conséquent, les techniques

histologiques sont considérées comme un outil simple, rapide et décisif pour le contrôle de la qualité du poisson et d'autres denrées alimentaires.

L'examen histologique peut distinguer entre le poisson frais et congelé (Popelka et *al.*, 2014 ; Strateva et Penchev, 2020 ; Strateva et *al.*, 2021 ; Kagan et Viner, 2022 ). Des changements histologiques dans le tissu musculaire du poisson congelé peuvent être observés, notamment des espaces extracellulaires, une destruction cellulaire, un rétrécissement, une fragmentation et des déformations des fibres musculaires. Ces changements ne sont pas présents dans le poisson frais. L'analyse microscopique des tissus musculaires squelettiques, des yeux et du cerveau peut être utilisée pour identifier les cycles de congélation-décongélation dans le poisson. Ces changements microscopiques, tels que la cavitation des myocytes squelettiques, la liquéfaction du cristallin et les fractures des tissus cérébraux, sont des résultats constants dans les tissus congelés-décongelés. Par conséquent, l'examen histologique est une méthode fiable pour distinguer entre le poisson frais et congelé.

### **3 PRÉSENTATION DES ESPÈCES CIBLES**

La définition d'un poisson est complexe, car elle englobe une grande diversité d'espèces appartenant à des groupes très différents, chacun présentant une extraordinaire diversité biologique, morphologique et d'habitat. En général, un poisson est un vertébré aquatique qui possède des nageoires et est généralement recouvert d'écaillés. Une caractéristique distinctive des poissons est la présence d'une vessie natatoire, bien que tous les poissons ne la possèdent pas, comme les requins qui doivent se déplacer constamment pour maintenir leur flottabilité. La plupart des poissons ont une ligne latérale sensible et une forme hydrodynamique, présentant une grande variété d'aspects et de couleurs. Ils respirent par des branchies et sont généralement ovipares. Les poissons sont des animaux ectothermes, ce qui signifie qu'ils dépendent de la température de leur environnement pour réguler leur température corporelle. Il existe des espèces de poissons végétariennes, carnivores, omnivores, détritivores et planctophages, qui se nourrissent respectivement de plantes, de viande, de tout type de nourriture, de débris organiques et de plancton.

Les quatre principaux groupes qui constituent les poissons sont les poissons sans mâchoires (Agnatha), les poissons cartilagineux (Chondrichthyes), les poissons osseux (Osteichthyes), et les poissons à nageoires charnues (Sarcopterygii).

Chaque groupe possède des caractéristiques distinctes et des histoires évolutives qui contribuent à la diversité des espèces de poissons que nous voyons aujourd'hui. Ces groupes englobent une large gamme d'espèces de poissons, des poissons sans mâchoires primitifs tels

que les lamproies et les myxines aux poissons osseux plus avancés, qui constituent la majorité des espèces de poissons dans les océans du monde et les plans d'eau douce (Genten et al., 2009).

### 3.1 La sardine commune (*Sardina pilchardus*)

La sardine, *Sardina pilchardus* occupe la position systématique suivante (Tableau 3).

#### 3.1.1 Position systématique

La position systématique de *Sardina pilchardus* est représenté dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 3:** Position systématique de la *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792).

Embranchement	Chordés
Sous embranchement	Vertébrés
Super classe	Ostéichtyens
Classe	Actinoptérygiens
Sous classe	Néoptérygiens
Super ordre	Téléostéens
Ordre	Clupéiformes
Famille	Clupéidés
Genre	<i>Sardina</i>
Espèce	<i>Sardina pilchardus</i>

La sardine (*Sardina pilchardus*) est une espèce de clupéidé pélagique que l'on trouve dans les eaux côtières jusqu'à 120 mètres de profondeur, principalement dans l'Atlantique Nord-Est, de la Norvège à l'Écosse, jusqu'au Sénégal et en Méditerranée (Figure 9) (Forest, 2001).

Comme de nombreuses autres espèces de clupéidés, la sardine commune est caractérisée par un développement accéléré et sa longévité limitée en raison de la surpêche. Elle atteint généralement la maturité à un jeune âge, souvent dès sa deuxième année de vie. (Sinovic, 1986 ; Alemany et Alvarez, 1993 ; Voulgaridou et Stergiou, 2003 ; Silva et al., 2008)

Cette espèce forme souvent des bancs denses, se déplaçant près de la surface la nuit et en profondeur pendant la journée. Sa période de frai varie selon sa répartition géographique. (Dumay, 2006). La sardine commune se nourrit principalement de plancton, les jeunes

consommant du phytoplancton ainsi que des œufs et des larves de petits crustacés, tandis que les adultes se nourrissent principalement de crustacés planctoniques tels que les copépodes, ainsi que de diverses larves présentes dans le zooplancton, comme les crabes et les ophiures.

### 3.1.2 Appellations de *Sardina pilchardus*

Sardine européenne, appelée aussi pilchard en Grande-Bretagne, Sardina en Italie, *Sardina europea* en Espagne, et simplement Sardine en Algérie, au Danemark et au Portugal.

### 3.1.3 Caractéristiques de *Sardina pilchardus*

Cette espèce se distingue par une mâchoire légèrement proéminente et une carène ventrale peu prononcée. Les opercules présentent des rainures radiales, avec la nageoire dorsale positionnée en avant des nageoires pelviennes. La nageoire anale se caractérise par un prolongement au niveau des deux derniers rayons. Son dos affiche une teinte bleu-vert, parfois olive, tandis que ses flancs brillent d'une nuance dorée et son ventre d'un argenté éclatant. Une ligne de taches sombres court le long de chaque flanc. Les écailles, grandes et argentées, sont fragiles et ne s'étendent pas jusqu'à la tête. En Atlantique, sa taille maximale atteint 25 cm, tandis qu'en Méditerranée, elle se situe autour de 22 cm. En général, elle mesure entre 10 et 20 cm (Holden et *al.*, 1979).



**Figure 9 :** La sardine, *Sardina pilchardus* (photo personnelle).

## 3.2 La sardinelle commune (*Sardinella aurita*)

La *Sardinella aurita* fait partie des poissons pélagiques néritiques (Figure 10). Elle occupe la position systématique suivante (Tableau 4).

### 3.2.1 Position systématique

La position systématique de *Sardinella aurita* est représenté dans le tableau ci-dessous

**Tableau 4:** Position systématique de la *Sardinella aurita* (Valenciennes, 1847).

Embranchement	Chordées
Sous embranchement	Vertébrés
Super classe	Ostéichthyens
Classe	Actinoptérygiens
Sous classe	Néoptérygiens
Super ordre	Téléostéens
Ordre	Clupéiformes
Famille	Clupéidés
Genre	<i>Sardinella</i>
Espèce	<i>Sardinella aurita</i>



**Figure 10:** La sardinella, *Sardinella aurita* (photo personnelle).

La Sardinelle commune se nourrit principalement de zooplancton comme les copépodes, mais aussi de larves de poissons et parfois de phytoplancton. Pour la reproduction, les mâles ont des gonades blanches à jaunâtres, tandis que les femelles ont des gonades rouges. Ils se reproduisent près de la côte et forment des bancs qui se déplacent rapidement. Les bancs remontent à la surface la nuit et plongent le jour. Parfois, ils se mélangent avec d'autres espèces comme la Sardinelle Eba (Poll, 1953; Cadenat, 1953; Irvine, 1947)

### 3.2.2 Appellations de *Sardinella aurita*

L'allache, également connue sous le nom commun de *Meletta mediteranea*, est également désignée par différents noms vernaculaires locaux, tels que "Latcha" (Ghazaouet, Benisaf, Oran, Alger, Bouir - Bejaia) et "Latchoum" (Annaba).

### 3.2.3 Caractéristiques de *Sardinella aurita*

La *Sardinella aurita* se caractérise par un corps allongé, généralement de section sub-cylindrique, parfois légèrement comprimé (Figure 10). Son ventre est arrondi, mais présente une carène faible formée par un alignement de scutelles sur le profil ventral. Elle possède un opercule lisse avec deux excroissances charnues à son bord postérieur, et un œil de taille moyenne situé au sommet du crâne, avec de nombreuses stries (de 7 à 14) sur les fronts pariétaux.

La sardinelle a une bouche terminale, caractérisée par une mâchoire supérieure arrondie et dépourvue d'échancrure médiane. Sa seconde supra-maxillaire présente des bords supérieur et inférieur presque égaux, avec de fines et nombreuses branchio-spines, comptant plus de 80 sur la partie inférieure du premier arc branchial.

La nageoire dorsale de la sardine démarre légèrement en avant du centre de son corps, tandis que la nageoire anale est positionnée bien en arrière de la base de la dorsale, avec ses deux derniers rayons nettement plus longs que les précédents. Les nageoires pelviennes sont implantées sous la dorsale et comprennent 9 rayons.

*La Sardinella aurita* présente un dos bleu-verdâtre avec des flancs argentés, et présente également une ligne latérale dorée claire à mi-hauteur, précédée d'une tache dorée en arrière de l'opercule. De plus, une tache noire distincte est visible sur le bord arrière de l'opercule.

Les nageoires dorsale et pectorale sont jaunes, plus ou moins foncées, avec des rayons antérieurs noirs et une ombrage sur le bord distal de la dorsale. La base de la nageoire caudale est d'un jaune très clair, tandis que le reste présente une teinte sombre avec des pointes très foncées ou noires (Fischer, 1987).

## **CHAPITRE 2**

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1 MATÉRIEL

L'étude expérimentale s'est déroulée au laboratoire d'histologie et d'histopathologie de l'Institut des sciences vétérinaires et des sciences agronomiques de l'Université de Batna 1, sur une période allant de septembre 2021 à juin 2023.

Cette étude porte sur deux espèces de poissons largement consommées en Algérie, à savoir la sardine commune (*Sardina pilchardus*) et la Sardinelle (*Sardinella aurita*)

L'objectif principal de notre étude est d'analyser l'incidence du cycle de congélation-décongélation sur la structure de ces deux espèces. Avant d'approfondir cet aspect, une évaluation des effets de la réfrigération et de la congélation sur la structure des poissons a été réalisée. Cette démarche préliminaire vise à éviter toute confusion avec les effets des cycles de congélation-décongélation ultérieurs.

Pour chaque espèce, un total de 175 spécimens est utilisé, répartis comme suit : 25 spécimens pour la réfrigération (avec 4 répétitions), 30 spécimens frais et 30 congelés pour la congélation, et 30 spécimens avec 4 répétitions pour les cycles de congélation-décongélation.

Pour transporter les échantillons au laboratoire, les mesures suivantes ont été prises : les échantillons ont été achetés auprès d'une poissonnerie locale où le poisson était garanti d'avoir été capturé dans moins de 24 heures au port d'El Kala, et les achats ont été effectués le matin même pour garantir la fraîcheur maximale. Les échantillons ont été ensuite placés dans des glacières et des sacs spécialement conçus pour le transport alimentaire, avec une surveillance continue de la température pour maintenir la chaîne de froid. Ces précautions ont été prises pour assurer l'intégrité des échantillons pendant le transport au laboratoire et garantir des résultats fiables dans les analyses ultérieures.

#### 1.1 Évaluation de la modification des tissus en fonction de la réfrigération

Vingt-cinq (25) spécimens frais entiers pour chaque espèce capturée dans les 24 heures précédentes obtenus dans un marché aux poissons local, ont été inclus dans cette étude. Parmi ceux-ci, 5 ont été échantillonnés dans les 24 heures (groupe 1 jr) ; 5 ont été échantillonnés après 48 heures de conservation à 4 °C (groupe 2 jrs), 5 ont été échantillonnées après 72 (groupe 3

jrs), 5 ont été échantillonnées après 144 heures (groupe 6 jrs) et les 5 derniers spécimens, après une conservation supplémentaire à 4 °C pendant 192 heures (groupe 8 jrs) (Tableau 5).

## **1.2 Évaluation de la modification des tissus en fonction de la congélation**

L'évaluation de la fraîcheur et de la qualité de la sardine et de la sardinelle, tant fraîches que congelées, a été réalisée sur un total de 60 échantillons pour chaque espèce. Parmi eux, 30 échantillons frais, capturés au cours des dernières 24 heures, ont été prélevés à partir d'un marché aux poissons à Batna. Les 30 autres échantillons ont été prélevés sur les poissons restants, qui avaient été congelés à -20°C pendant 15 jours avant d'être décongelés soigneusement à 4°C pendant 12 heures (Tableau 5).

## **1.3 Évaluation de la modification des tissus en fonction de cycle de congélation-décongélation**

Un total de 30 échantillons de sardines et sardinelles congelées ont été évalués. Tous les échantillons ont été emballés individuellement dans des sacs en polyéthylène et répartis de manière aléatoire en 6 groupes (T0, T1, T2, T3, T4 et T5) de 5 pièces chacun. La procédure, qui consistait à congeler à -20°C à différents moments (J0, J4, J7, J11, J15 et J20) et à décongeler à 4°C pendant 12 heures, a été répétée pour obtenir des échantillons avec différents cycles de congélation-décongélation. Les échantillons prélevés avant la congélation étaient considérés comme ayant un cycle de congélation-décongélation nul (T0) (Tableau 5).

**Tableau 5:** Conditions Expérimentales pour l'Évaluation des Modifications Tissulaires des poissons

<b>Évaluation</b>	<b>Espèce</b>	<b>Nombre d'échantillons</b>	<b>Conditions</b>	<b>Durée</b>
<b>Évaluation de la modification des tissus en fonction de la réfrigération</b>	Sardine, Sardinelle	25 spécimens frais par espèce	Réfrigération à 4°C	1 jour, 2 jours, 3 jours, 6 jours, 8 jours
<b>Évaluation de la modification des tissus en fonction de la congélation</b>	Sardine, Sardinelle	60 échantillons par espèce	30 échantillons frais (capturés dans les 24 heures), 30 échantillons congelés à -20°C pendant 15 jours, décongelés à 4°C pendant 12 heures	Congélation 15 jours, décongélation 12 heures
<b>Évaluation de la modification des tissus en fonction des cycles de congélation-décongélation</b>	Sardine, Sardinelle	30 échantillons par espèce	Congélation à -20°C et décongélation à 4°C pendant 12 heures, répétée sur 6 groupes (T0 à T5) avec différents cycles	Cycles : J0, J4, J7, J11, J15, J20

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES UTILISÉES

Voici un tableau (Tableau 5). qui résume les méthodes et analyses utilisées pour évaluer l'impact de la réfrigération, de la congélation et des cycles de congélation-décongélation sur les poissons :

**Tableau 5 :** Les méthodes et analyses utilisées pour évaluer les différents traitements

Traitement	Nombre Total d'Échantillons	Répétitions	Analyses
Réfrigération	25	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse physico-chimique : pH, AW, TE</li> <li>- Analyse histologique qualitative</li> </ul>
Congélation	60	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse physico-chimique : pH, AW, TE</li> <li>- Analyse histologique qualitative</li> </ul>
Cycles Congélation-Décongélation	30	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse physico-chimique : pH, AW, couleur, Solubilité des protéines, Mesure de la capacité de rétention d'eau (perte par centrifugation, perte lors de la décongélation, perte lors de la cuisson, TE)</li> <li>- Analyse histologique qualitative et quantitative</li> </ul>

### 2.1 Analyses physico-chimiques et biochimiques

#### 2.1.1 Mesure du pH

Selon Li et *al.* (2013), les valeurs de pH ont été mesurées en mélangeant un échantillon de poisson (10 g) avec 90 mL d'eau distillée. Les niveaux de pH ont été mesurées au moyen d'un pH-mètre numérique inoLab® (Xylem Analytics, WTW, Weilheim, Allemagne).

#### 2.1.2 Mesure de l'activité de l'eau (Aw)

Le coefficient d'activité de l'eau (Aw) a été évaluée à l'aide d'un modèle Hygroscope Rotronic BT-RS1.

Pour effectuer la mesure, l'échantillon est d'abord fragmenté en de petites portions et placé dans un récipient dédié. Ensuite, ce récipient est inséré dans la cuvette à échantillon, préalablement remplie aux trois quarts. Enfin, le dispositif de mesure est déposé immédiatement sur la cuvette pour effectuer la mesure.

### **2.1.3 Mesure de la teneur en eau**

La teneur en eau de divers produits a été évaluée par déshydratation, impliquant la pesée initiale d'échantillons (10 g) et un séchage ultérieur au four à 37 °C pendant trois jours (Avinee et *al.*, 2010).

### **2.1.4 Couleur**

Dans leur recherche, Ali et *al.* (2015) ont développé une technique utilisant un colorimètre (Konica Minolta CR-10, Japon) pour évaluer les propriétés de surface des échantillons. Pour garantir une représentation complète, des mesures de L\* (luminosité), a\* (rougeur) et b\* (jaunissement) ont été enregistrées à trois endroits distincts sur la surface de chacun des cinq échantillons de poisson.

### **2.1.5 Taux des protéines totaux**

Dans leur étude, les chercheurs (Choi et *al.*, 2017) ont élucidé la méthodologie utilisée pour évaluer la solubilité des protéines. Un gramme d'échantillon de poisson a été homogénéisé à l'aide d'un mixeur à bras. Cet échantillon homogénéisé a ensuite été mélangé avec 20 mL de solution KI/phosphate de potassium très froide et laissé à une température de 4 °C pendant la nuit. Ensuite, le mélange a subi une centrifugation de 2000G (B. Braun Sigma 2K15 Centrifuge, Allemagne) à 4 °C pendant 20 minutes. Ensuite, une combinaison de 2 mL du surnageant et huit mL d'une solution de biuret a été préparée et ajoutée. Ensuite, la densité optique de ce mélange a été mesurée à une fréquence lumineuse spécifique de 540 nm. (Spectrophotomètre Shimadzu UV 120-01).

#### **Préparation du réactif**

Pour cette préparation, 1,5 g de sulfate de cuivre et 6 g de tartrate double de sodium et de potassium ont été soigneusement mélangés dans un volume de 500 millilitres d'eau distillée. Par la suite, 300 millilitres d'une solution de soude à une concentration de 15 % ont été ajoutés, complétés par de l'eau distillée jusqu'à obtenir un volume total de 1 litre. Gardez le réactif dans

un flacon hermétiquement clos, et protégez-le de l'exposition à la lumière en le rangeant dans un endroit sombre.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en procédant comme suit : une série de solutions étalons a été élaborée à partir de la solution mère d'albumine d'œuf (10 g/l).

L'équation de la courbe est souvent sous la forme :

$$y = a + b \cdot x$$

- y : est l'absorbance mesurée,
- x : est la concentration de protéines,
- a : est l'ordonnée à l'origine (souvent proche de zéro),
- b : est la pente de la courbe de calibration.

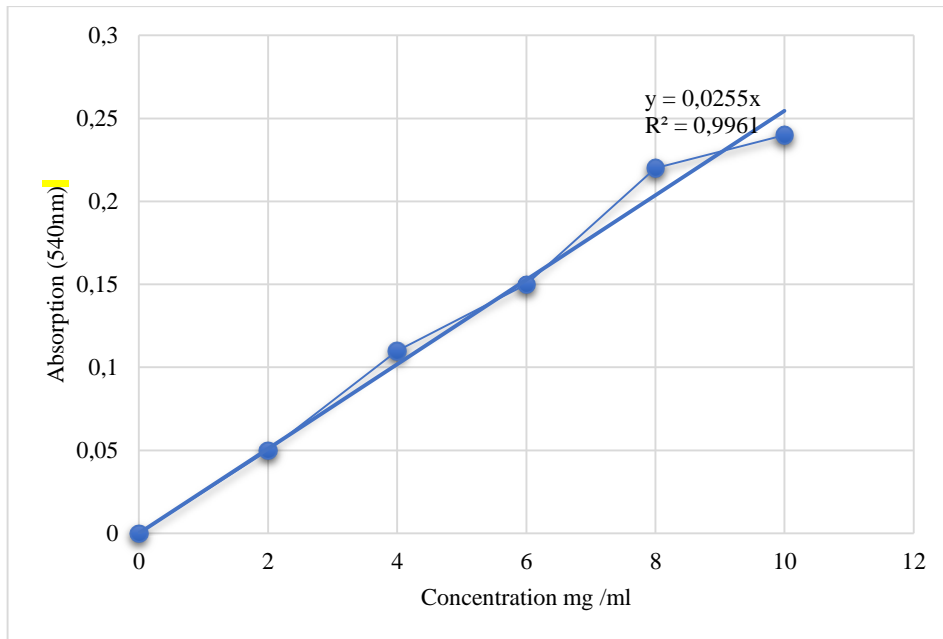
**Tableau 6:** Concentration protéique

Quantité de standard de protéines (mL)	Quantité d'eau distillée (mL).	Volume de réactif Biuret (mL) Quantité de réactif biuret (mL).
0,0	1,0	4
0,2	0,8	4
0,4	0,6	4
0,6	0,4	4
0,8	0,2	4
1,0	0,0	4

Protégez de la lumière pendant une demi-heure.

La solution a été analysée pour son absorption à 540nm par un spectrophotomètre.

Le graphique de calibration a été générée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2010 (Figure 11), montrant un coefficient de corrélation élevé ( $r^2 = 0,987$ ) entre la concentration et l'absorption.



**Figure 11:** Courbe d'étalonnage de la concentration des protéines

### 2.1.6 Capacité de rétention d'eau

Pour évaluer la rétention hydrique des échantillons, nous avons mesuré la perte par décongélation, la perte par centrifugation et la perte par cuisson, avec quelques modifications aux méthodes rapportées par Zhu *et al.* (2020).

En particulier, nous avons modifié l'évaluation de *la perte par centrifugation* en utilisant des échantillons de 2 grammes au lieu des 10 grammes mentionnés par Zhu *et al.* (2020).

De plus, dans l'évaluation de *la perte par cuisson*, nous avons standardisé le poids de l'échantillon à 5 grammes. Après que la viande ait décongelé, le liquide dans l'emballage a été versé, et les échantillons de viande ont été essuyés avec des serviettes en papier et pesés à nouveau.

La perte par congélation a été mesurée en pourcentage de la différence entre la quantité de poids perdu avant et après la congélation.

$$\text{Pertes à la décongélation (\%)} = \left[ \frac{(\text{poids avant congélation} - \text{poids après décongélation})}{\text{poids avant congélation}} \right] \times 100$$

*La perte à la centrifugation* : Deux grammes d'échantillons de poisson, enfermés dans du papier filtre, ont été chargés dans un tube à centrifuger et soumis à une centrifugation à 210G à 4 °C pendant 10 minutes. La différence de poids entre les échantillons avant et après la centrifugation a été utilisée pour calculer la perte par centrifugation.

$$\text{Pertes à la centrifugation (\%)} = \left[ \frac{(\text{poids avant centrifugation} - \text{poids après centrifugation})}{\text{poids avant centrifugation}} \right] \times 100$$

*La perte à la cuisson* : Pour déterminer la quantité de nourriture perdue pendant la cuisson, des échantillons de 5 g ont été mesurés, enveloppés dans du papier aluminium résistant à la chaleur, et placés dans un bain d'eau à 80 °C pendant 30 minutes. La température interne n'a pas été mesurée, mais selon une étude antérieure (Sultana et al., 2008), on estimait qu'il faudrait 30 minutes pour atteindre la meilleure température interne de 75 à 80 °C. Les échantillons sont laissés à sécher, puis pesés.

$$\text{Pertes à la cuisson (\%)} = \left[ \frac{(\text{poids avant cuisson} - \text{poids après cuisson})}{\text{poids avant cuisson}} \right] \times 100$$

## **2.2 Analyse histologique**

### **2.2.1 Préparation des coupes histologiques**

Les sections histologiques ont été réalisées en respectant les procédures et les méthodes détaillés de Carson et Hladik (2009) et de Luna (1968).

### **2.2.2 Échantillonnage**

Les spécimens prélevés pour la préparation des sections histologiques proviennent du muscle dorsal de chaque espèce.

#### **2.2.2.1 Fixation**

Immédiatement après leur prélèvement, les échantillons sont immergés dans des flacons préalablement identifiés contenant une solution fixatrice chimique à 10 % de formol. L'objectif de cette étape de fixation est d'arrêter les processus d'autolyse et de prévenir toute détérioration due à l'action des microorganismes, ce qui permet de maintenir la structure des tissus aussi intacte que possible, similaire à celle des tissus vivants. Une fois fixés, les échantillons sont ensuite sectionnés à l'aide d'un bistouri, puis disposés dans des cassettes, chaque cassette étant numérotée manuellement au crayon.

### **2.2.2.2 Déshydratation, éclaircissement et l'imprégnation**

Les échantillons sont soigneusement lavés à l'eau courante pendant quatre heures pour éliminer complètement le fixateur.

Une fois le lavage terminé, les échantillons sont placés dans un automate (BAVIMED) pour assurer:

- La déshydratation progressive qui se fait en plongeant les échantillons dans des bains d'alcool dont la concentration augmente graduellement jusqu'à atteindre de l'alcool absolu.
- La clarification se fait dans 2 bains consécutifs de xylène.
- L'impression se réalise dans 2 bains consécutifs de paraffine liquide maintenue à une température de 58°C.

### **2.2.2.3 Mise en blocs**

Pour préparer les blocs de paraffine, les échantillons sont placés dans des moules en acier inoxydable. Ensuite, la paraffine liquide a été versée sur les échantillons et placés les bases des cassettes par-dessus. Les moules ont été refroidis rapidement pour solidifier la paraffine, assurant ainsi des blocs de haute qualité pour la coupe histologique.

La dernière étape consiste à la création des blocs, réalisée manuellement. Elle implique l'orientation adéquate des fragments tissulaires dans le sens de la coupe, suivie du placement de la paraffine dans de petits moules à température ambiante. Cette opération entraîne le durcissement de la paraffine, induisant ainsi le refroidissement des échantillons de tissus prélevés. Les blocs de paraffine sont ensuite démoulés, révélant ainsi les fragments tissulaires inclus à l'intérieur.

### **2.2.2.4 Coupes au microtome (coupe et étalement)**

Les sections sont effectuées à l'aide d'un Microtome rotatif de marque "LEICA, JUNG HISTOCUT 820", d'une épaisseur de 5 micromètres.

Le dépliage et l'aplanissement des coupes sont effectués dans un bain-marie dont la température est maintenue à 45°C.

Ensuite, les lames sont séchées sur une plaque chauffante.

Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées au moyen d'une lame tranchante en acier inoxydable, en découpant un mince ruban.

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome rotatif manuel (LEICA, JUNG HISTOCUT 820) munis d'un réglage de l'épaisseur des coupes gradué de 0 à 50µm.

Le ruban de tissu obtenu est ensuite émergé dans un bain-marie (bain de flottaison) d'eau chaude à 45°C et il est flotté sur une lame de microscope en verre qu'a été identifiée (gravée par un stylo à tête en diamant) en utilisant une petite quantité de la solution d'étalement (liquide de Mayer). Cette solution est préparée comme suit :

\* 1 volume de glycérine.

\* 1 volume d'albumine (blanc d'œuf).

Au moment de l'emploi, on prend un volume du mélange ci-dessus additionné de 20 volumes de l'eau distillée. L'emploi de cette solution (liquide de Mayer) a pour but de bien coller les coupes sur les lames afin d'éviter leurs détachements lors de l'étape de la coloration. Après ces étapes les lames sont séchées sur une plaque chauffante.

### **2.2.2.5 Coloration**

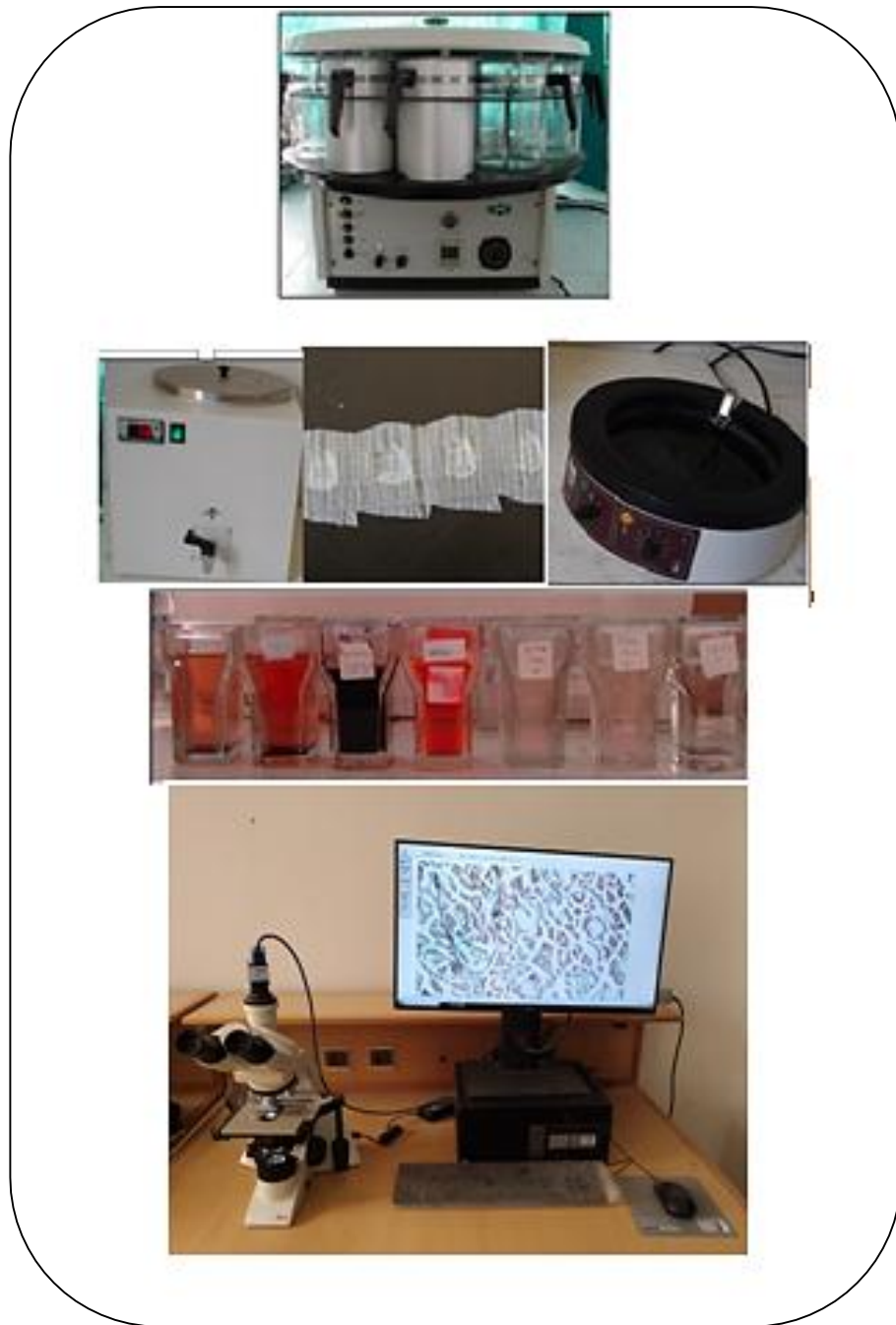
Une fois que les lames sont séchées, elles sont ensuite soumises à une étape de coloration. La première étape de la coloration H&E consiste en le déparaffinage et le remplacement de la paraffine par l'eau. Le xylène et ses substituts sont efficacement utilisés pour éliminer la paraffine des tissus traités (Day, 2014). Les lames sont déparaffinées en les plongeant dans deux bains successifs de xylène. Ensuite, Les coupes sont réhydratées en les plongeant dans des solutions d'éthanol de concentration décroissante (100%, 95% et 80%), permettant ainsi une réhydratation et une augmentation progressive de la teneur en eau des tissus. Une fois les lames immergées dans de l'eau distillée, elles sont prêtes à être colorées avec de l'hématoxyline pendant 15 minutes. Après cela, un rinçage à l'eau courante est effectué pour éliminer l'excès d'hématoxyline, puis les lames sont colorées à l'éosine. Enfin, pour achever le processus, les tissus sont déshydratés en les plongeant dans de l'éthanol de concentration croissante.

### **2.2.2.6 Montage**

Cette phase consiste à protéger les échantillons et à préparer les lames pour l'observation microscopique. Cela implique l'utilisation de lamelles et l'Eukitt. Après avoir monté les échantillons entre lame et lamelle, ces derniers sont laissés à sécher à température ambiante.

### **2.2.2.7 Microscopie**

Après cela, les coupes histologiques sont soigneusement observées au microscope, en commençant par le plus faible grossissement et en augmentant progressivement jusqu'au plus fort, tout en prenant des photos.

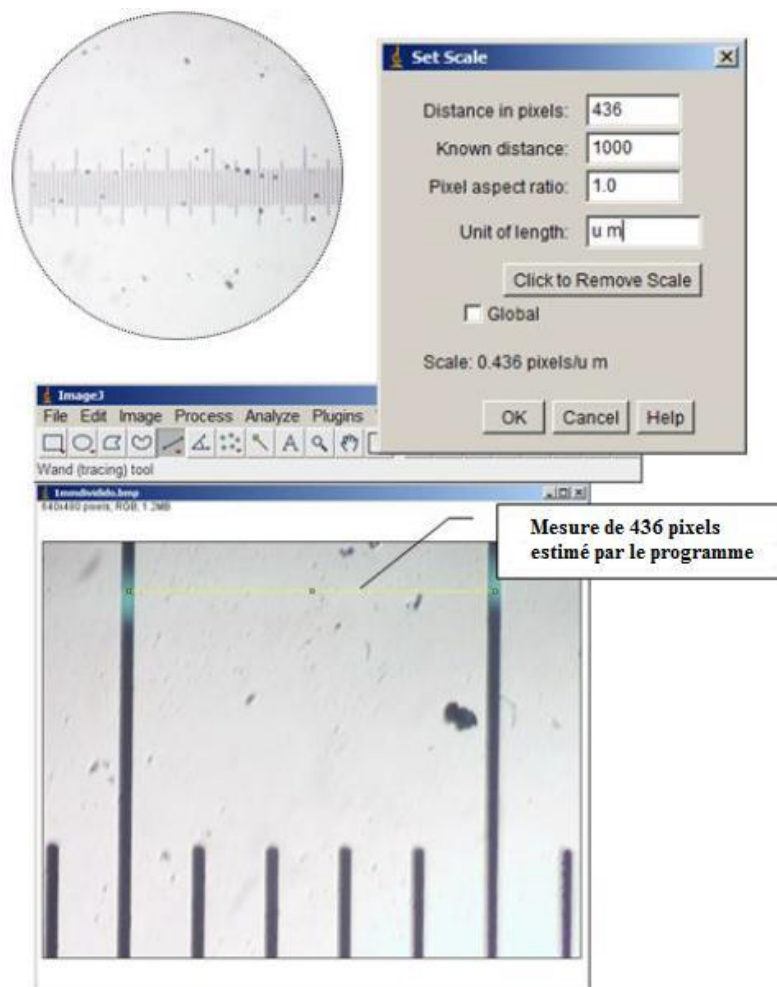


**Figure 12:** Principaux stades du processus de préparation des coupes histologiques

## 2.3 Analyse histologique et morphométrique

Après un examen microscopique préliminaire des coupes colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H-E), cinq zones à forte concentration de vacuoles des échantillons ont été sélectionnées à faible grossissement, et les mesures ont été effectuées à un grossissement de 100X.

La superficie moyenne des vacuoles, la superficie moyenne des myofibres contenant des vacuoles, et le rapport entre la superficie totale des vacuoles et la superficie cellulaire ont été déterminés afin de réaliser une analyse quantitative des vacuoles soumis à des cycles de congélation-décongélation. Divers paramètres ont été mesurés à l'aide d'un logiciel gratuit, ImageJ (version 1.52a) (Figure 13). Cela comprenait la quantification des caractéristiques morphologiques clés telles que la taille des vacuoles et des myofibres, ainsi que la relation globale entre les superficies des vacuoles et des cellules.



**Figure 13:** Interface du logiciel ImageJ

## 2.4 Analyse statistique

Toutes les données ont été saisies dans une base de données standard sur ordinateur (Microsoft Office Excel 2021). Les données ont été soumises à une analyse statistique à l'aide de la variance (ANOVA) réalisée avec le logiciel SPSS version 26 (IBM SPSS Statistics v26). Les moyennes ont été comparées à l'aide de le procédé de Tukey.

La différence est considérée comme significative si la probabilité ( $p < 0.05$ ). Dans le cas contraire, la différence est considérée comme non significative ( $P \geq 0,05$ ).

## **CHAPITRE 3**

# **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 1 Évaluation de la modification des tissus à différentes durées de conservation au réfrigérateur

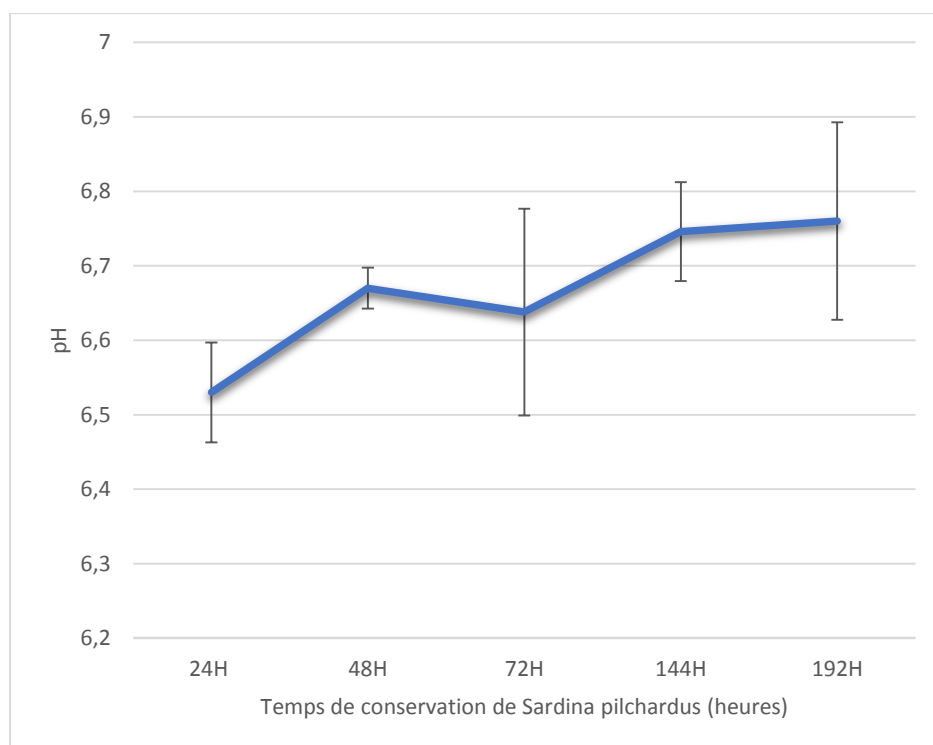
#### 1.1 Propriétés chimiques

##### 1.1.1 pH

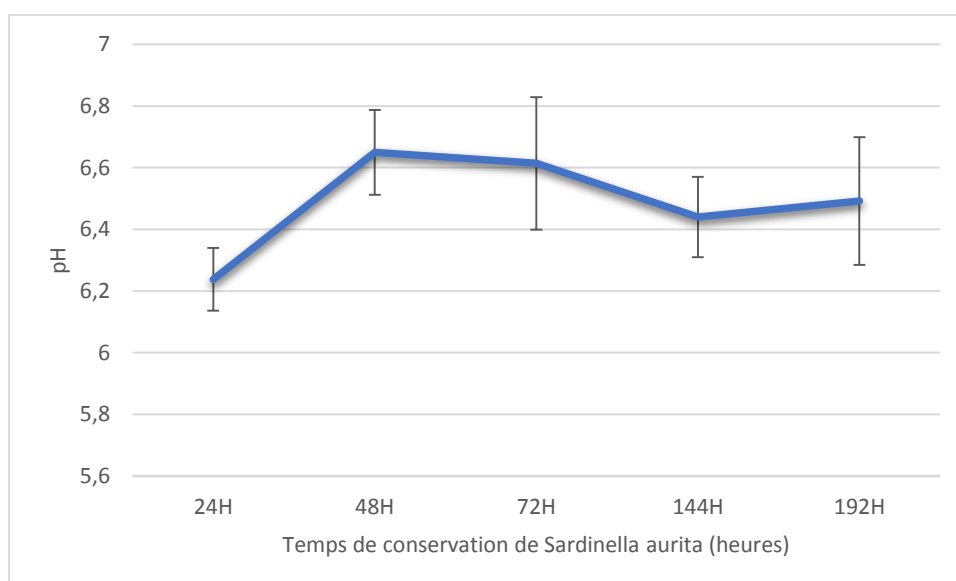
Pour les échantillons de poisson, les valeurs de pH ont montré une tendance à fluctuer légèrement tout au long de la période de stockage. Initialement, les mesures de pH étaient généralement faibles, avec une moyenne de  $6,53 \pm 0,06$  pour *Sardina pilchardus* et de  $6,23 \pm 0,1$  pour *Sardinella aurita*. mais elles ont tendance à augmenter progressivement au fil des jours de stockage. Cependant, des fluctuations imprévisibles ont été observées, avec des augmentations et des diminutions sporadiques durant toute la période d'étude (Figure 14 et 15).

Selon Erkan (2008), l'augmentation des niveaux de pH est le résultat de l'accumulation de composés alcalins, en particulier l'ammoniac, qui est principalement produit par l'activité microbienne.

Dans une étude menée par El Marrakchi et ses collègues en 1990, il a été découvert que les sardines stockées sur la glace avaient une valeur de pH de 5,8 le premier jour et de 6,36 le neuvième jour. De manière similaire, Nunes et *al.*, 1992, Gökoğlu et *al.*, 1998, et Janči et *al.*, 2023 ont également observé une augmentation de la valeur du pH des sardines au fil du temps pendant le stockage.



**Figure 14:** pH de la *Sardina pilchardus* pendant la réfrigération ( $p < 0,05$ )



**Figure 15:** pH de la *Sardinella aurita* pendant la réfrigération ( $p < 0,05$ )

### 1.1.2 Activité de l'eau

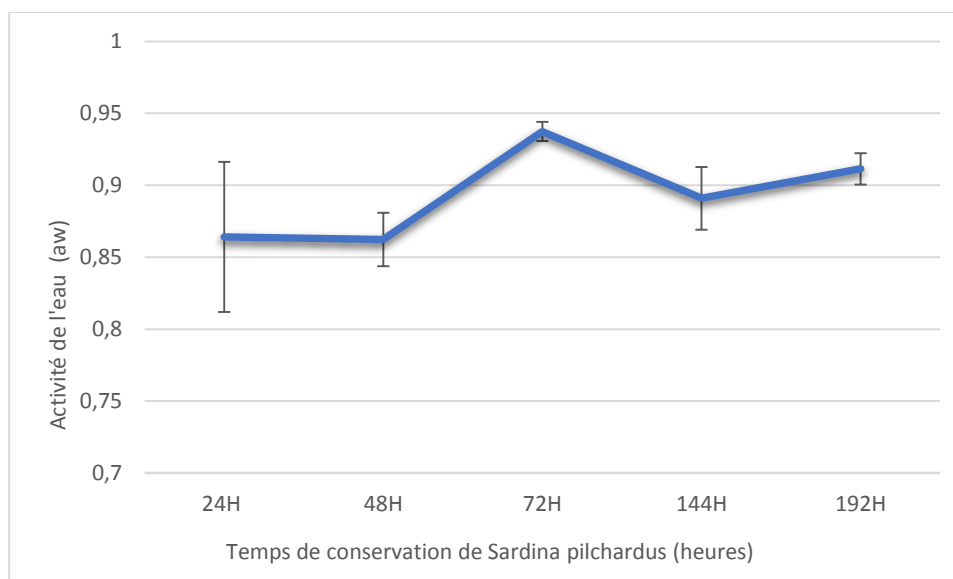
Les résultats de l'activité de l'eau pour les échantillons de *Sardina pilchardus* et de *Sardinella aurita*, conservés pendant huit jours dans des conditions réfrigérées avant d'être

analysés, ont montré des tendances similaires à celles observées pour le pH. Les valeurs d'activité de l'eau ont initialement été mesurées à des niveaux relativement bas, pour *Sardina pilchardus* est  $0,864 \pm 0,05$  et pour *Sardinella aurita* est  $0,911 \pm 0,009$ , mais elles ont montré une légère tendance à augmenter au fil du temps pour les deux espèces de poisson. Cependant, des variations sporadiques ont été observées tout au long de la période d'analyse, avec des augmentations et des diminutions intermittentes des valeurs d'activité de l'eau (Figure 16 et 17).

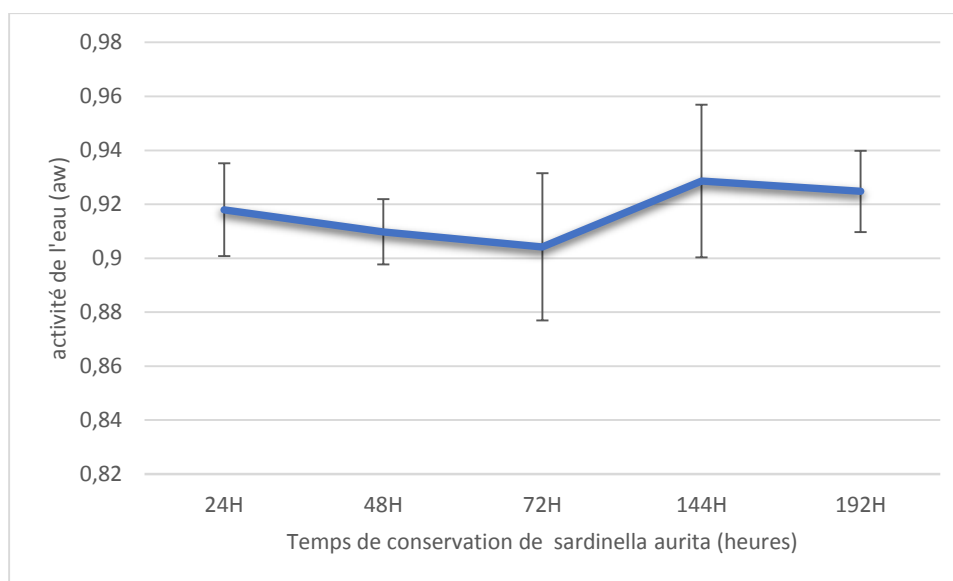
La réfrigération peut initialement diminuer l'activité de l'eau des poissons pendant les premiers jours de stockage. Cela est dû au fait que la température basse ralentit les réactions chimiques et microbiennes qui favorisent la libération d'eau et donc la diminution de l'activité de l'eau. Cela est dû à la perte d'humidité pendant le stockage réfrigéré, qui est une conséquence naturelle du froid ralentissant les réactions chimiques et la croissance microbienne (Tavares et al., 2021 ; Durate et al., 2020).

Cependant, au fil du temps, surtout sur une période prolongée comme 8 jours, il peut y avoir une augmentation de l'activité de l'eau. La fluctuation de l'activité de l'eau dans les sardines due à la réfrigération est un processus complexe qui peut affecter leur texture, leur stabilité chimique et leurs propriétés microbiennes. (García et Careche, 2002).

Selon Belitz et al. (2009), la réduction de l'activité de l'eau peut entraver le développement de micro-organismes, ralentir les réactions catalysées par les enzymes et retarder le brunissement non enzymatique.



**Figure 16:** Activité de l'eau de *Sardina pilchardus* pendant la réfrigération ( $p < 0,05$ ).



**Figure 17:** Activité de l'eau de *Sardina aurita* pendant la réfrigération ( $p < 0,05$ )

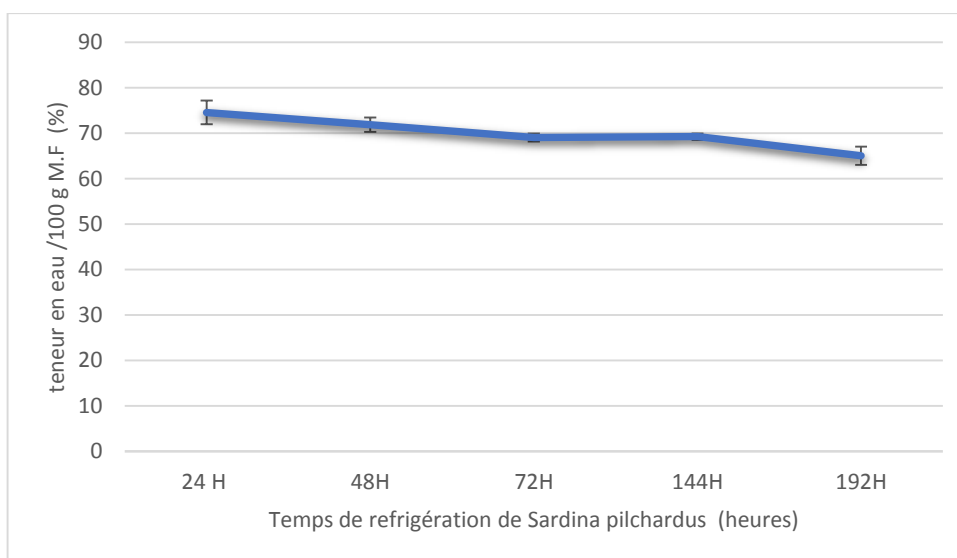
### 1.1.3 La teneur en eau

Les données montrent que la teneur en eau des échantillons de *Sardina Pilchardus* diminue de façon notable ( $p < 0,05$ ) au fil du temps, passant de 74,6% à 65,08%. En revanche, pour *Sardinella aurita*, la teneur en eau aussi diminué, passant de 78,56% à 76,2% (Figure 18 et 19).

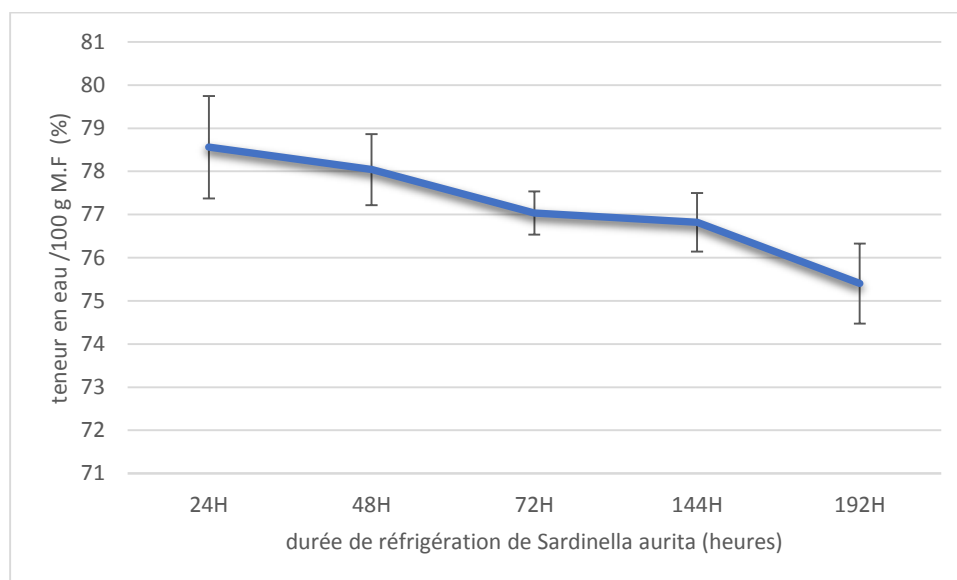
Des recherches sur les sardines (*Sardina pilchardus*) ont montré que le refroidissement dans de la glace et de l'eau peut affecter la teneur en eau, la qualité des lipides et l'acceptation sensorielle du poisson. Il a été constaté que le stockage des sardines fraîches sur de la glace pendant 0 à 15 jours entraînait une diminution de la teneur en humidité (Gracia et al., 2002).

Cette perte peut être due à la dégradation des protéines. En effet, la dégradation des protéines entraîne une diminution de la capacité de rétention d'eau de la fraction myofibrillaire (Seet et al., 1983 ; Castrillon et al., 1996; Reemtsma et al., 2008).

Cependant, certains auteurs ont observé une légère augmentation de cette teneur en eau après plusieurs jours de stockage sous glace. Cette augmentation a été attribuée à une diffusion de l'eau à l'intérieur des structures musculaires lors du contact de la glace avec le poisson (Nunes et al., 1992 ; Aubourg, 2001).



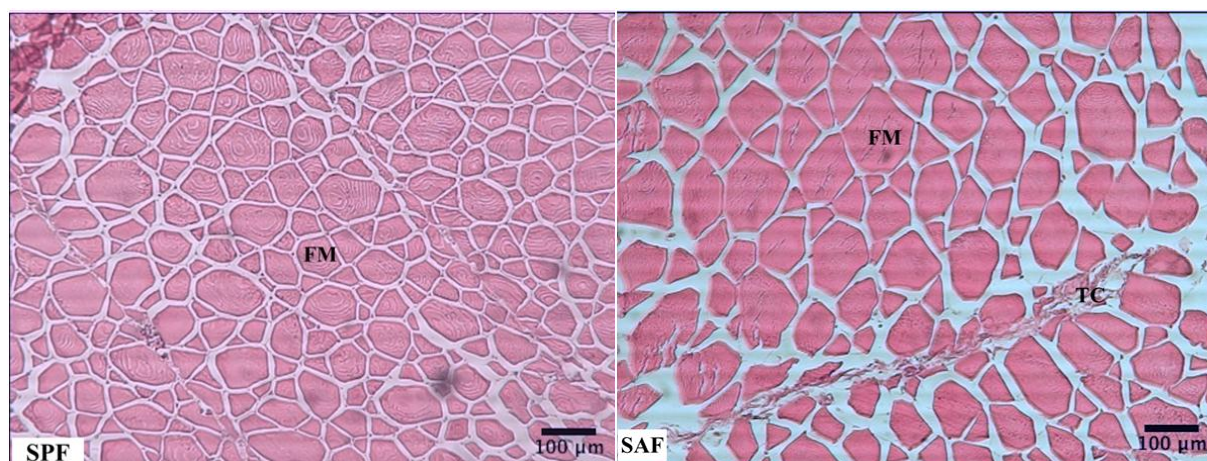
**Figure 18:** Teneur en eau de *Sardina pilchardus* pendant la réfrigération( $p < 0,05$ )



**Figure 19:** Teneur en eau de *Sardinella aurita* pendant réfrigération( $p < 0,05$ )

## 1.2 Analyse histologique

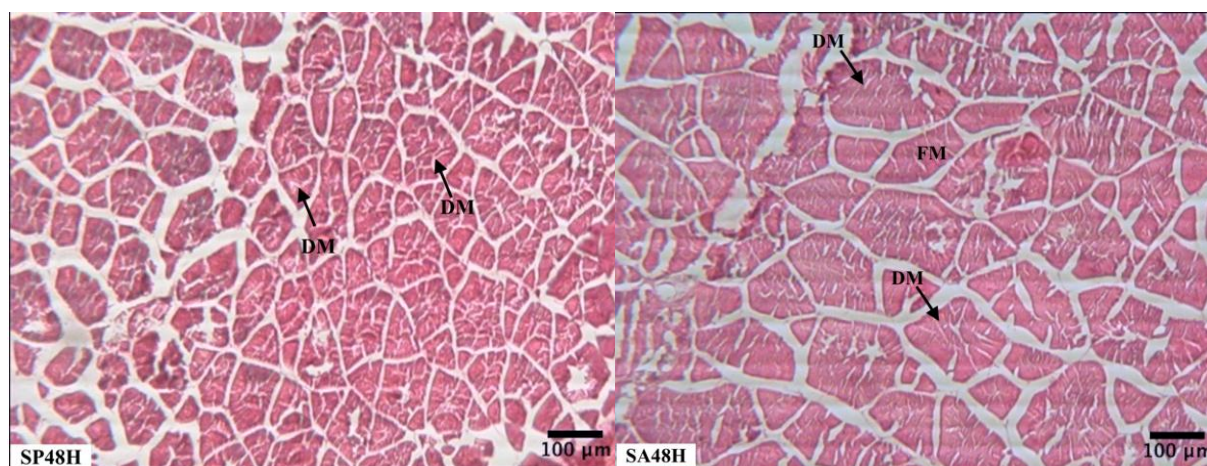
La structure musculaire des poissons frais (SP et SA), observée en coupe transversale, présentait une organisation globalement préservée. Les fibres étaient regroupées en faisceaux avec peu d'espace entre elles. Les fibres musculaires présentaient des aspects microscopiques normaux et étaient disposées de manière parallèle et précise pour les deux espèces (*Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita*) (moins de 24 heures). Les stries étaient évidentes et les noyaux étaient aplatis, placés sous le sarcolemme. Le tissu conjonctif interfibrillaire était inchangé (Figure 20).



**Figure 20:** Histologie de *Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita* frais (moins de 24 heures) (H&E).

(SPF: *Sardina pilchardus* frais, SAF: *Sardinella aurita* frais, TC: Tissu conjonctif, FM: fibre musculaire)

Après 48 heures de stockage dans le réfrigérateur, certaines stries ont disparu et la fragmentation transversale a commencé à devenir visible. Le cytoplasme a éclairci sa couleur. Chez la sardine, les changements sont plus prononcés (Figure 21).



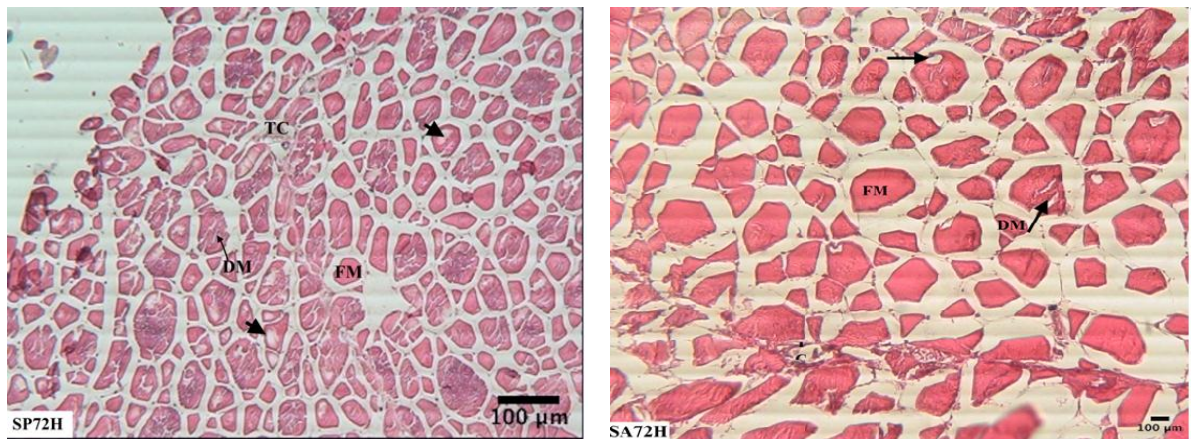
**Figure 21:** Histologie de *Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita* sous réfrigération (48 heures) (H&E).

(SP48H: *Sardina pilchardus* conservé 48 heures, SA48H: *Sardinella aurita* conservé 48 heures, FM : fibre musculaire, DM : déchirure d'une fibre musculaire)

Après 72 heures, les aspects liés à la désorganisation sont devenus plus visibles, se traduisant par une augmentation des espaces interfibrillaires. Les stries sont devenues de plus

en plus rares. Les fragmentations des fibres étaient nombreuses, surtout chez la *Sardina pilchardus*. En coupe transversale, la disparition des noyaux a été observée.

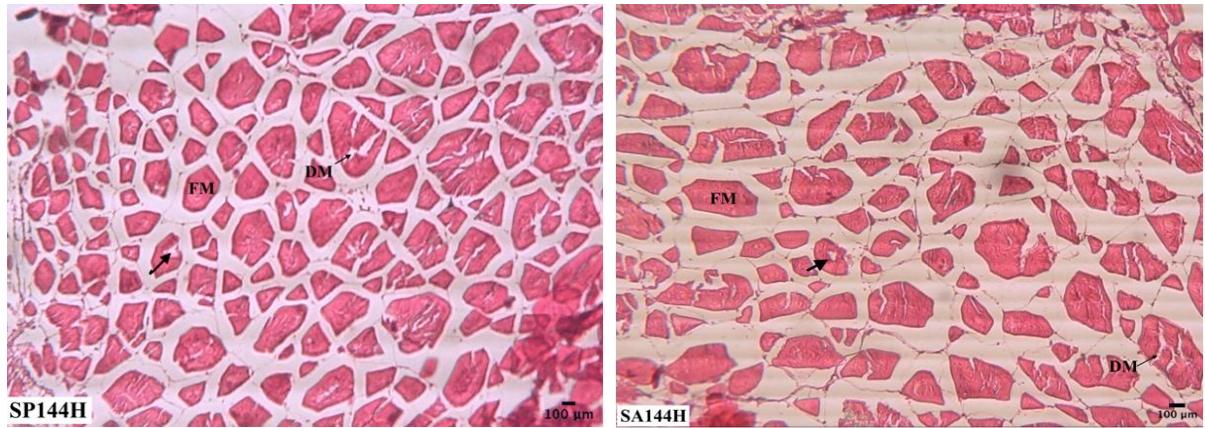
De plus, chez la *Sardina pilchardus*, les vacuolisations cytoplasmiques sont également apparues de manière significativement plus marquée par rapport à la *Sardinella aurita* (Figure 22).



**Figure 22:** Histologie de *Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita* sous réfrigération (72 heures) (H&E).

(SP72H: *Sardina pilchardus* conservé 72 heures , SA72H: *Sardinella aurita* conservé 72 heures, FM :Fibre musculaire, flèches: vacuolisation de fibre musculaire, DM :déchirure d'une fibre musculaire ).

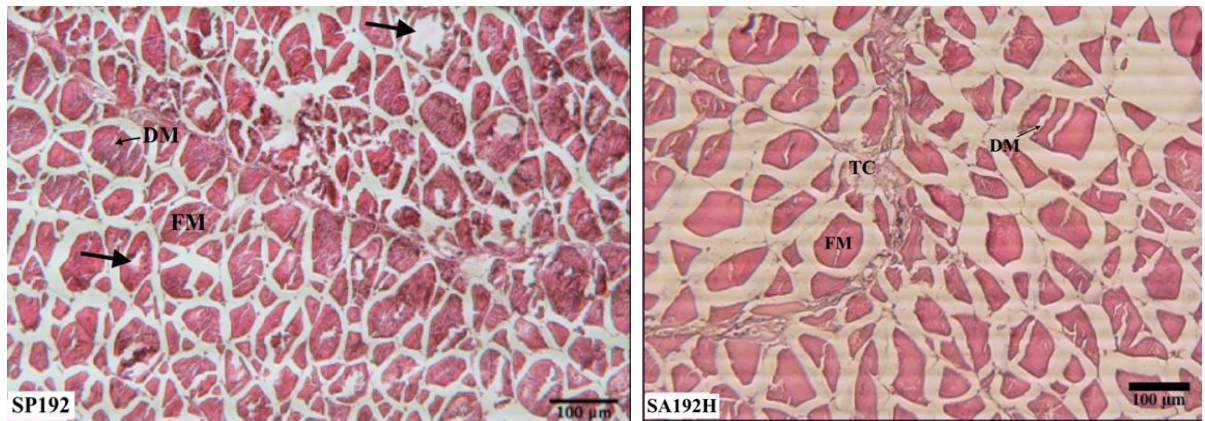
Après 144 heures, les changements du tissu musculaire sont plus prononcés, avec des fragmentations prédominantes. Le tissu conjonctif interfibrillaire est déchiré et les espaces interfibrillaires sont élargis. Ces altérations sont plus prononcées chez la *Sardina pilchardus* que chez la *Sardinella aurita*. De plus, chez la *Sardina pilchardus*, les vacuolisations cytoplasmiques sont également apparues de manière significativement plus marquée par rapport à la *Sardinella aurita* (Figure 23).



**Figure 23:** Histologie de *Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita* sous réfrigération (144heures) (H&E).

(SP144H: *sardina pilchardus* conservé 144 heures, SA144H: *Sardinella aurita* conservé 7144 heures, FM :fibre musculaire, flèches: vacuolisation de fibre musculaire, DM :déchirure d'une fibre musculaire).

Après 192 heures de conservations, l'analyse histologique a révélé la présence de zones focalisées de dégradation important des myofibrilles ainsi que des myofibrilles rétrécies et fragmentées plus prononcés surtout pour la *Sardina pilchardus* (Figure 24).



**Figure 24:** Histologie de *Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita* sous réfrigération (192 heures) (H&E).

(SP192H: *Sardina Pilchardus* conservé 192 heures , DM :Déchirure d'une fibre musculaire, SA192H: *Sardinella Aurita* conservé 192 heures, FM :fibre musculaire,)

Les altérations observées dans la structure des myofibrilles sont comparables à celles rapportées chez des spécimens de *Merluccius merluccius* conservés dans la glace pendant 72 et

120 heures (Tinacci et *al.*, 2018). Notamment, aucun changement vacuolaire n'a été constaté dans tous les échantillons (conservés à 4°C) des deux espèces de poisson. Une autre étude a examiné les effets de la conservation à froid sur le tissu musculaire de différentes espèces de poissons et a constaté que les fibres musculaires peuvent devenir désorganisées, fragmentées et dégradées avec le temps (Săvescu et *al.*, 2011).

L'effet de la réfrigération sur l'histologie du poisson implique des changements dans la structure cellulaire et la composition du tissu musculaire de poisson au fil du temps. Cette étude a montré que la réfrigération prolongée peut avoir un impact sur les caractéristiques histologiques de la viande de poisson, y compris des altérations dans les fibres musculaires, le tissu conjonctif et l'intégrité globale du tissu. La surveillance de l'histologie de la viande de poisson pendant la réfrigération est essentielle pour évaluer la qualité et la fraîcheur du produit et garantir qu'il reste sûr à la consommation.

En analysant ces aspects, nous pouvons constater qu'il existe des différences dans la manière dont les fibres musculaires de différentes espèces de poissons récoltées sont affectées par la conservation aux réfrigérateurs :

Le tissu musculaire du *Sardinella aurita* est plus résistant à la conservation.

En revanche, chez la *Sardine pilchardus*, les fibres musculaires sont plus dégradables.

## **2 Évaluation de la modification des tissus en fonction de la congélation**

### **2.1 Propriétés chimiques**

#### **2.1.1 pH**

Les résultats de l'étude révèlent des variations légères mais significatives du pH pour les deux espèces de poissons étudiées, *Sardina Pilchardus* et *Sardinella Aurita*, entre les échantillons frais et congelés. (Figure 25 et 26).

Pour *Sardina Pilchardus*, le pH moyen des échantillons frais est de  $6,53 \pm 0,03$ , tandis que celui des échantillons congelés est de  $6,52 \pm 0,02$ .

En ce qui concerne *Sardinella Aurita*, le pH moyen des échantillons frais est de  $6,23 \pm 0,06$ , et celui des échantillons congelés est de  $6,19 \pm 0,11$ .

Dans les deux cas, il y a une légère baisse du pH lorsque les échantillons sont congelés.

Des recherches disponibles suggèrent que le stockage des poissons congelés peut entraîner une élévation du pH en raison de l'accumulation de substances alcalines, telles que l'ammoniac, essentiellement issus des actions microbiennes (Malik et *al.*, 2021; Nakazawa et *al.*, 2020). Cependant, l'ampleur de l'augmentation du pH peut varier en fonction de l'espèce de poisson, de la saison de capture, de l'emplacement géographique, de la taille du poisson et de la composition de l'eau (Malik et *al.*, 2021). La diminution du pH due à l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) est également liée à la concentration d'ATP dans la chair de poisson (Rahman et *al.*, 2022).

### 2.1.2 Activité de l'eau

Les résultats concernant l'activité de l'eau pour les deux espèces de poissons étudiées, *Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita*, révèlent des tendances similaires (Figure 25 et 26).

Pour *Sardina pilchardus*, l'activité de l'eau moyenne des échantillons frais est de  $0,865 \pm 0,02$ , tandis que celle des échantillons congelés est de  $0,862 \pm 0,05$ .

Pour *Sardinella aurita*, l'activité de l'eau moyenne des échantillons frais est de  $0,918 \pm 0,01$ , et celle des échantillons congelés est de  $0,913 \pm 0,01$ .

Dans les deux cas, on observe une légère diminution de l'activité de l'eau lorsque les échantillons sont congelés.

La congélation des poissons peut entraîner une diminution de l'activité de l'eau, car une grande partie de l'eau contenue dans les tissus du poisson se transforme en glace pendant le processus de congélation. Lorsque l'eau est transformée en glace, elle devient liée et moins disponible pour les réactions chimiques et microbiennes qui influencent l'activité de l'eau. Par conséquent, la congélation peut réduire la disponibilité de l'eau libre dans les tissus des poissons, ce qui entraîne une réduction de l'activité de l'eau.

Selon les conclusions de Christian et Scott (1953), l'activité de l'eau est cruciale dans de nombreuses réactions chimiques et biologiques. De plus, elle peut être utilisée pour prédire la prolifération de micro-organismes responsables de la décomposition des aliments. Kim et *al.* (2017) ont observé une corrélation entre les fluctuations de l'activité de l'eau et les mouvements des fluides ainsi que la formation de cristaux de glace. Kim et *al.* (2017) ont observé une corrélation entre les fluctuations de l'activité de l'eau et les mouvements des fluides ainsi que la formation de cristaux de glace.

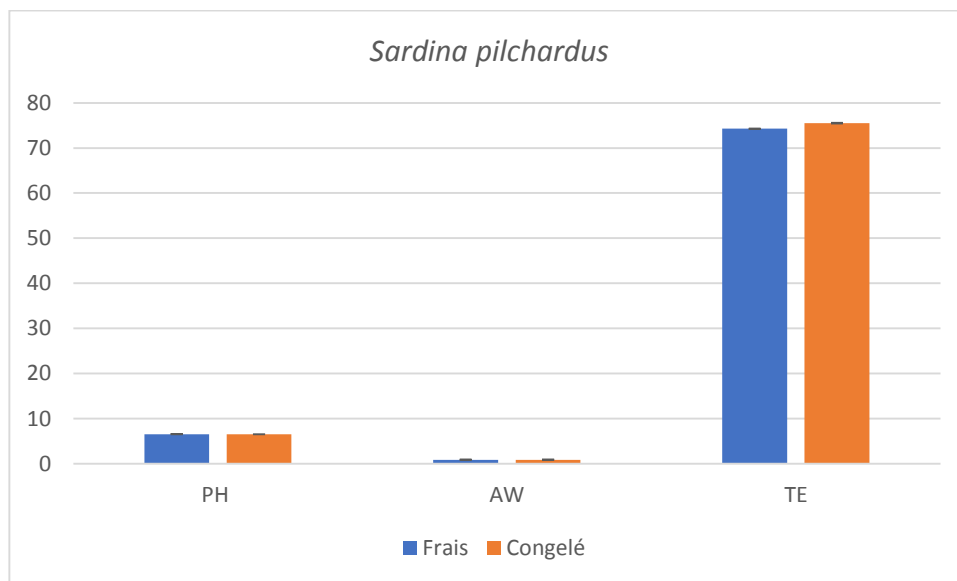
### 2.1.3 La teneur en eau

Les résultats montrent que l'activité de l'eau varie légèrement entre les échantillons frais et congelés pour les deux espèces étudiées, *Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita* (Figure 25 et 26).

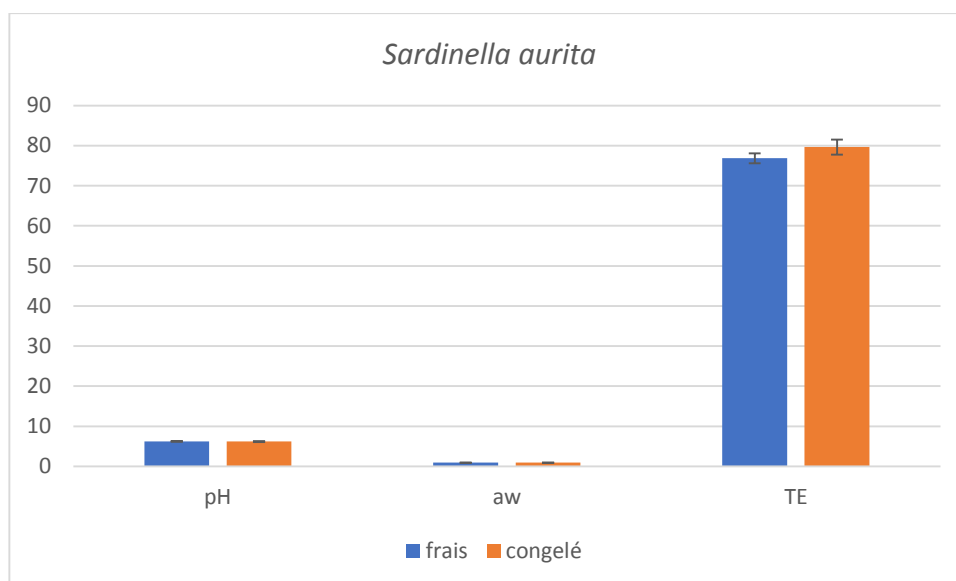
Pour *Sardina pilchardus*, la teneur en eau moyenne des échantillons frais est de  $47,27\% \pm 0,02$ , tandis que celle des échantillons congelés est de  $75,5\% \pm 0,05$ .

Pour *Sardinella aurita*, les valeurs moyennes de teneur en eau sont légèrement plus élevées, avec  $76,85\% \pm 0,01$  pour les échantillons frais et  $79,85\% \pm 0,01$  pour les échantillons congelés. On peut estimer que la teneur en eau des sardines et sardinelles congelées serait similaire à celle des sardines et sardinelles fraîches, mais avec une teneur en eau plus faible en raison de l'évaporation d'eau pendant le processus décongélation.

Selon Truonghuynh et al. (2020), l'incapacité des fibres musculaires à absorber de l'eau pendant la décongélation est la cause de la perte de teneur en eau après la congélation. La fonte des cristaux de glace présents dans les fibres musculaires est considérée comme la source de cette eau.



**Figure 25:** L'activité de l'eau, le pH et la teneur en eau de *Sardina pilchardus* frais et congelé ( $p < 0,05$ )



**Figure 26:** L'activité de l'eau, le pH et la teneur en eau de *Sardinella aurita* frais et congelé ( $p < 0,05$ )

## 2.2 Analyse histologique

Trente échantillons de sardines (*Sardina pilchardus*) ont été classés comme congelés car différents nombres et tailles de vacuoles ont été trouvés dans le cytoplasme des cellules musculaires (Figure 27 SPC).

Les 30 autres échantillons de sardines fraîches (*Sardina pilchardus*) ont été classés comme frais car aucune vacuole n'était présente (Figure 27 SPF).

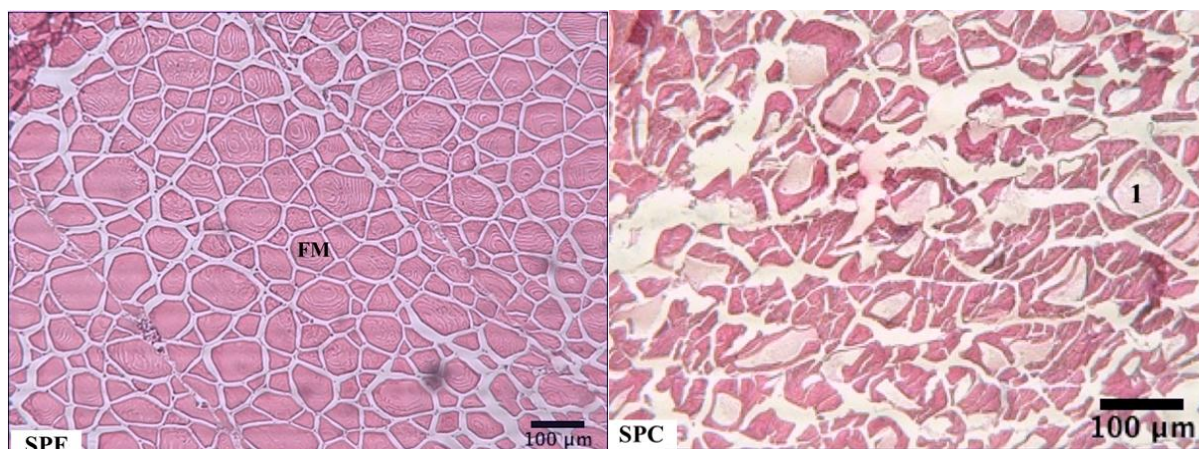
Le muscle de la sardine fraîche (*Sardina pilchardus*) est coupé en coupe transversale pour montrer des myofibrilles qui sont constamment alignées et ont des formes polygonales distinctes. Toutes les fibres musculaires sont présentes et dans leur forme d'origine, et le tissu conjonctif qui entoure normalement chaque fibre musculaire a été préservé (Figure 27 SPF).

En ce qui concerne *Sardinella aurita*, des observations similaires ont été faites pour les échantillons frais, avec un aspect similaire des myofibrilles alignées et des formes polygonales distinctes, ainsi qu'une préservation du tissu conjonctif environnant (Figure 28 SAF).

Après avoir été soumis à une congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une durée de 15 jours, les échantillons de *Sardinella aurita* (Figure 28 SAC) et de *Sardina pilchardus* (Figure 28 SPC) ont montré des altérations dans la structure de certaines fibres musculaires.

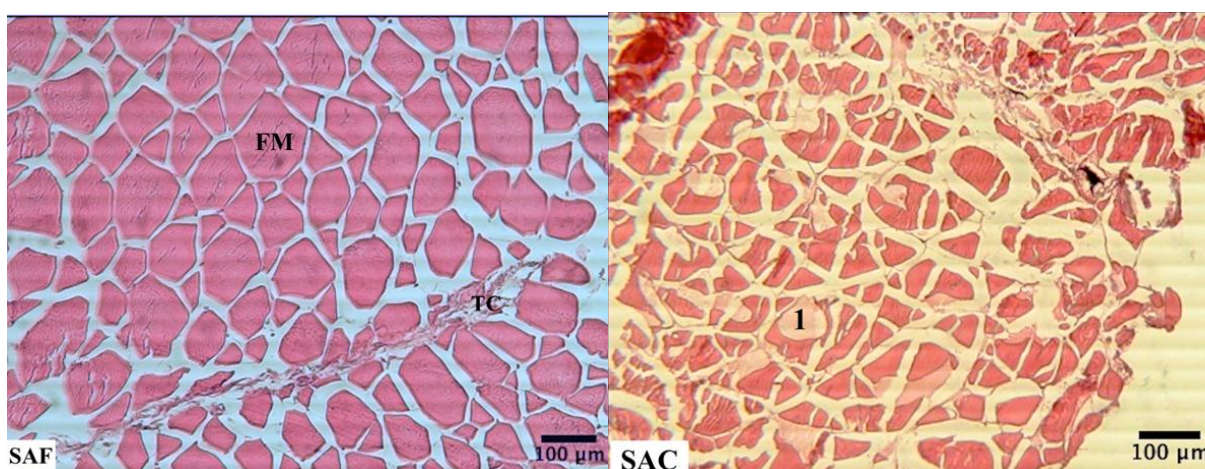
Plus précisément, la plupart des fibres musculaires ont été affectées dans leur partie centrale, présentant des lacunes au niveau de cette zone, tandis que leur périphérie restait généralement intacte. Ces altérations ont été plus prononcées pour la *Sardina pilchardus* que la

*Sardinella aurita* et qui ont attribuées à la présence de cristaux de glace extracellulaires, qui ont exercé une pression sur les fibres musculaires et ont provoqué leur réduction.



**Figure 27:** Caractéristiques microscopiques de la *Sardina pilchardus* fraîche et congelée.  
(H&E).

(SPF: *Sardina pilchardus* frais, SPC: *Sardina pilchardus* congelé, 1: empreinte cristalline de glace).



**Figure 28:** Caractéristiques microscopiques de la *Sardinella aurita* fraîche et congelée.  
(H&E).

(SAF: *Sardinella aurita* frais, SAC: *Sardinella aurita* congelé, FM: fibre musculaire. TC: tissu conjonctif, 1: empreinte cristalline de glace).

### 3 Évaluation de la modification des tissus en fonction de cycle de congélation-décongélation

#### 3.1 Propriétés physicochimiques

##### 3.1.1 pH

Les résultats indiquent que le pH de *Sardina pilchardus* varie légèrement à chaque cycle de congélation-décongélation. Initialement, le pH est mesuré à 6,53 (T0), puis il montre une légère augmentation à T1 et continue à augmenter progressivement jusqu'à T5 (6,55). (Figure 29).

Pour la *Sardinella aurita*, les résultats montrent des variations du pH au fil des cycles de congélation-décongélation, avec une tendance à la baisse jusqu'à T3 (6,15), suivie d'une augmentation notable à T5 (6,47) (Figure 30).

Les cycles répétés de congélation-décongélation ont été constatés comme affectant le pH du poisson.

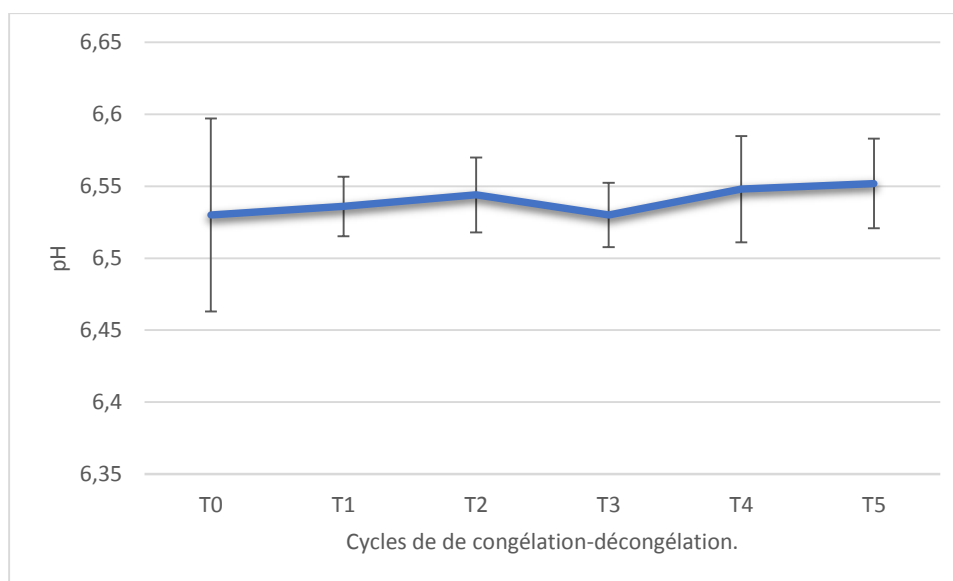
Dans l'étude de Zuanazzi et son équipe, il a été observé que les valeurs de pH des filets de tilapia du Nil n'ont augmenté qu'à partir du quatrième cycle de congélation-décongélation (Zuanazzi et *al.*, 2020).

De même, dans l'étude de Vilkova et *al.* En 2022, les valeurs de pH des échantillons d'*esturgeon russe* ont diminué lors de cycles répétés de congélation-décongélation.

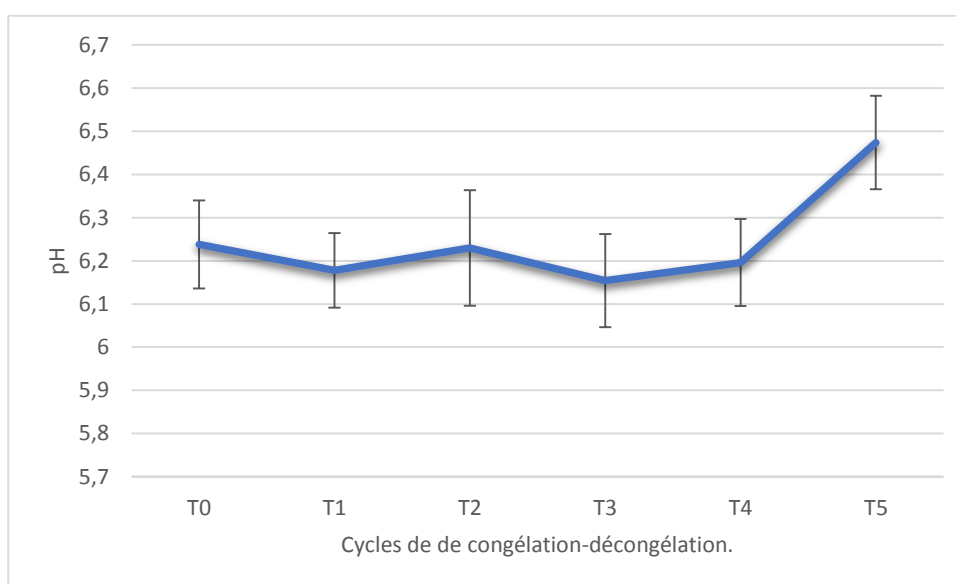
Hu et Xie ont également rapporté une augmentation des valeurs de pH du poisson *Trachurus murphyi* avec l'augmentation des cycles de congélation et de décongélation (Hu et Xie, 2021).

De plus, Yang a constaté que les valeurs de pH des muscles de carpe montraient une tendance à augmenter d'abord puis à diminuer à mesure que le nombre de cycles de congélation-décongélation augmentait (Jeong et *al.*, 2011).

Par conséquent, le pH du poisson peut être affecté par des cycles répétés de congélation-décongélation, avec des variations observées en fonction de l'espèce de poisson spécifique et du nombre de cycles.



**Figure 29:** pH de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )



**Figure 30:** pH de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

### 3.1.2 Activité de l'eau

Les résultats de l'activité de l'eau pour *Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita* montrent des variations au cours des différents cycles de congélation-décongélation.

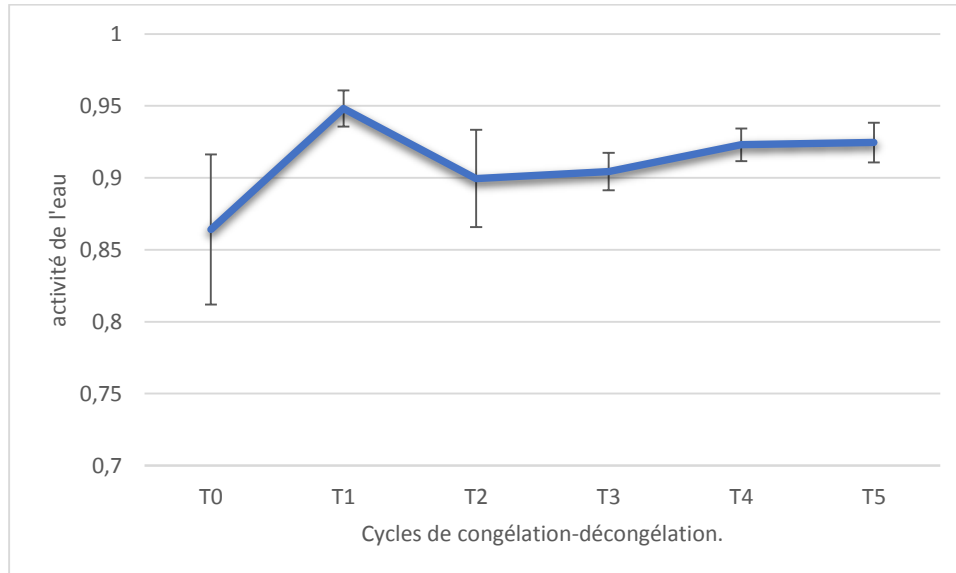
Pour la *Sardina pilchardus*, l'activité de l'eau varie de  $0,864 \pm 0,005$  à  $0,924 \pm 0,01$ , Pour la *Sardinella aurita*, les résultats montrent des variations de l'activité de l'eau au fil des

cycles de congélation-décongélation. On observe une tendance à la baisse de l'activité de l'eau jusqu'à T4 ( $0,899 \pm 0,01$ ), suivie d'une augmentation notable à T5 ( $0,920 \pm 0,01$ ) (Figure 31 et 32).

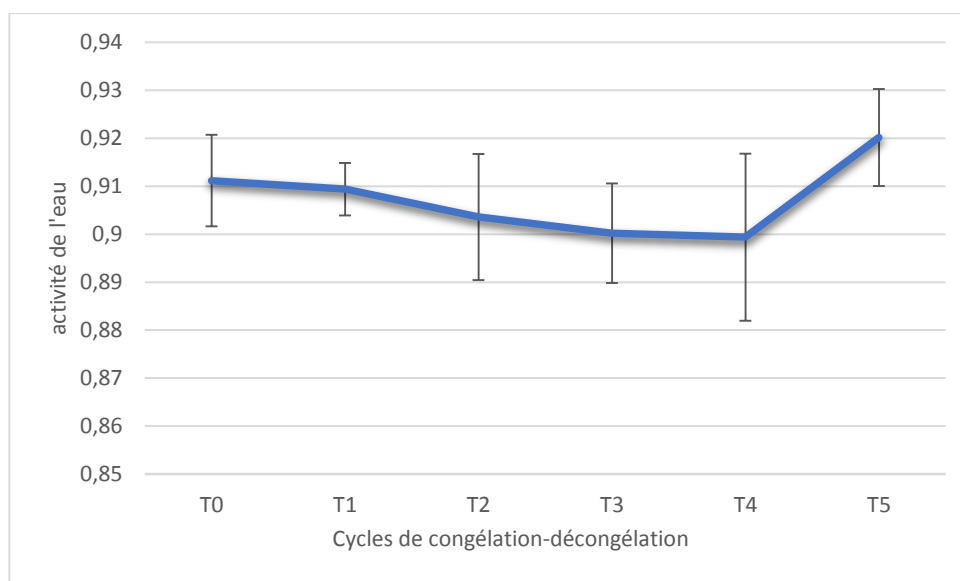
Les cycles répétés de congélation et de décongélation ont été observés comme affectant l'activité de l'eau dans le poisson. De multiples cycles de congélation-décongélation peuvent entraîner une augmentation de la proportion d'eau libre dans la chair du poisson (Ying et Xie, 2021).

De plus, la migration de l'eau immobilisée vers l'eau libre a été observée dans les filets de poisson soumis à des cycles de congélation et de décongélation (Luo et al., 2023). La destruction des fibres myogéniques due à la croissance des cristaux de glace pendant la congélation et la décongélation peut également avoir un impact sur l'état de l'eau dans les filets de poisson (Du et al., 2023).

De plus, la microstructure des fibres musculaires de poisson peut devenir plus lâche et se désintégrer après de multiples cycles de congélation-décongélation, entraînant une réduction de la capacité de rétention d'eau (Solovyev et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'activité de l'eau dans le poisson peut être affectée par le nombre de cycles de congélation-décongélation auxquels il est soumis.



**Figure 31:** Activité de l'eau de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )



**Figure 32:** Activité de l'eau de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

### 3.1.3 Couleur

Les cycles de congélation-décongélation peuvent altérer la persistance de la couleur de la viande (Ali et al., 2015). De plus, La concentration et la composition chimique de la myoglobine jouent un rôle crucial dans la détermination de la couleur de la viande (Leygonie et al., 2012).

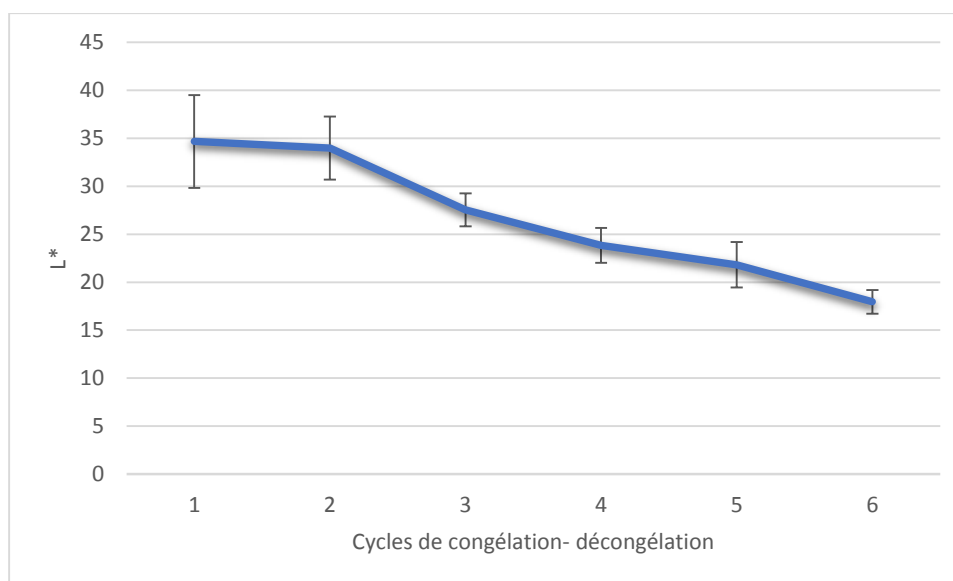
Pour *Sardina pilchardus*, la valeur  $L^*$  diminue progressivement à mesure que les cycles augmentent, passant de  $34,67 \pm 4,82$  (T0) à  $17,9 \pm 1,22$  (T5) (Figure 33).

De même, pour *Sardinella aurita*, on observe une diminution similaire de la valeur  $L^*$  avec l'augmentation des cycles, passant de  $63,51 \pm 11,01$  (T0) à  $33,64 \pm 15,63$  (T5). (Figure 33).

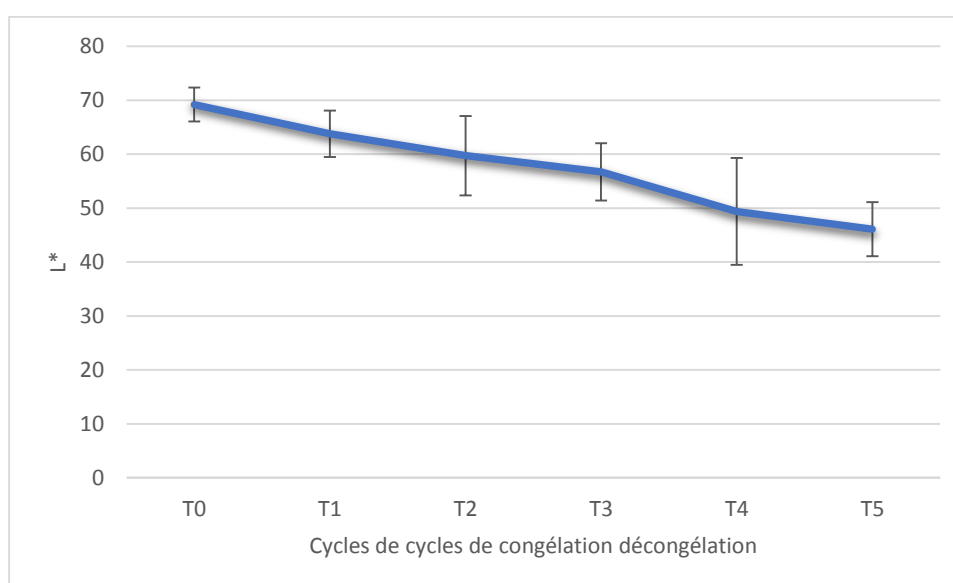
La luminosité diminue progressivement, indiquant un assombrissement des échantillons.

Les variations de température lors du processus de stockage peuvent contribuer à un assombrissement significatif, entraînant une diminution de la luminance ( $L^*$ ) (Li et al., 2017). Parallèlement, la dénaturation des protéines due aux cycles de congélation-décongélation peut induire une augmentation de la luminosité (Jeong et al., 2011).

Cette dénaturation protéique peut se produire lors du processus de congélation en raison de l'augmentation de la force ionique intracellulaire suite à la migration de l'eau dans les espaces extracellulaires (Leygonie et al., 2012).



**Figure 33:** L\* de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation ( $p < 0,05$ )



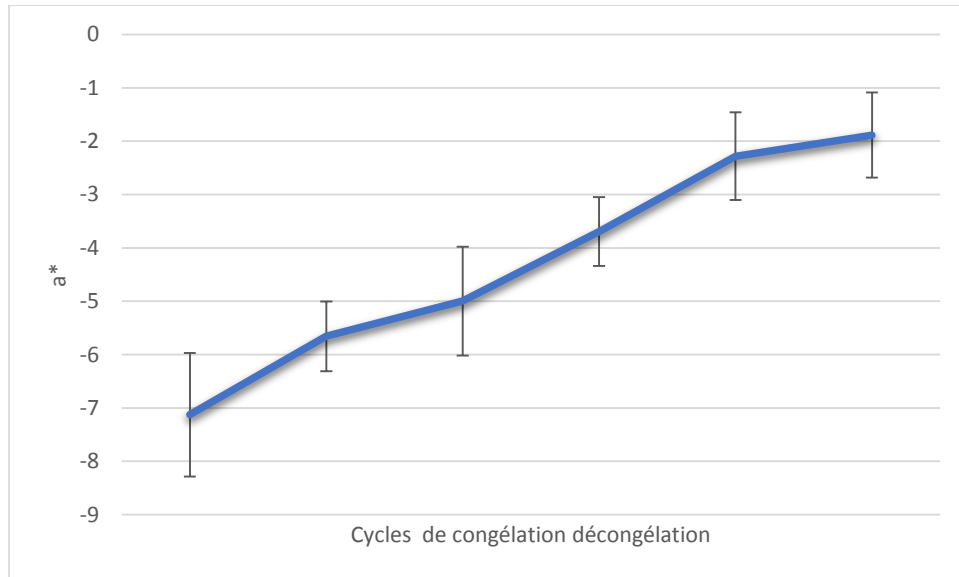
**Figure 34:** L\* de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation.

Les valeurs  $a^*$  (intensité de la couleur rouge-vert) des échantillons de Sardine et de *Sardinella* varient également en fonction des cycles de congélation-décongélation.

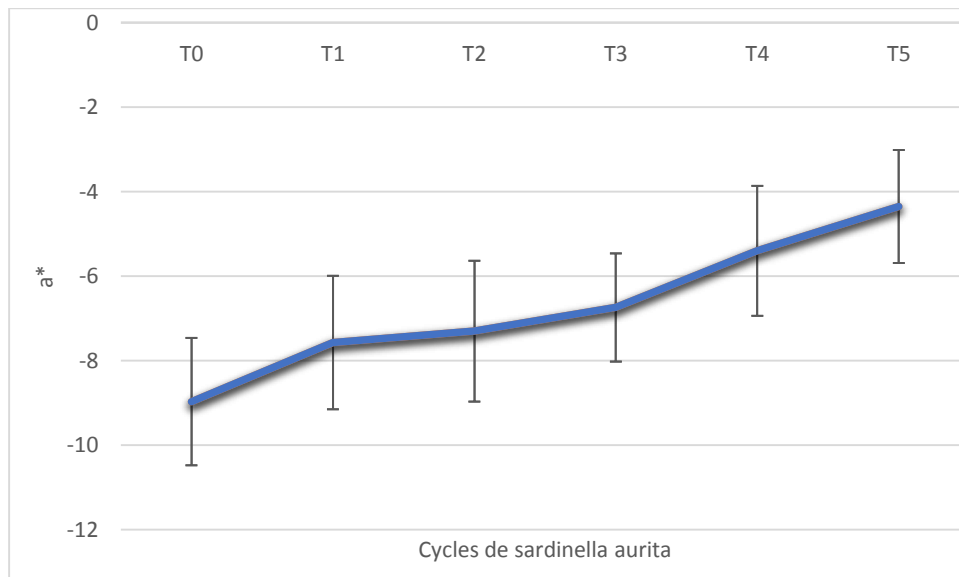
Pour la Sardine, les valeurs  $a^*$  augmente progressivement à mesure que les cycles augmentent, passant de  $-6,49 \pm 1,4$  à  $-2,14 \pm 1,03$ . (Figure 34).

De même, pour la *Sardinella*, on observe une augmentation similaire des valeurs  $a^*$  avec l'augmentation des cycles, passant de  $-9,27 \pm 2,82$  à  $-5,05 \pm 2,56$ . (Figure 35).

L'augmentation de l'intensité de la couleur rouge ( $a^*$ ) des filets de tilapia au cours des cycles de congélation-décongélation peut être associée à la dénaturation de la partie globine de la molécule de myoglobine (Zuanazzi et al., 2020), ce qui rend la myoglobine plus sensible à l'auto-oxydation et entraîne des changements de coloration subséquents (Leygonie et al., 2012).



**Figure 35 :**  $a^*$  de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )



**Figure 36:**  $a^*$  de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

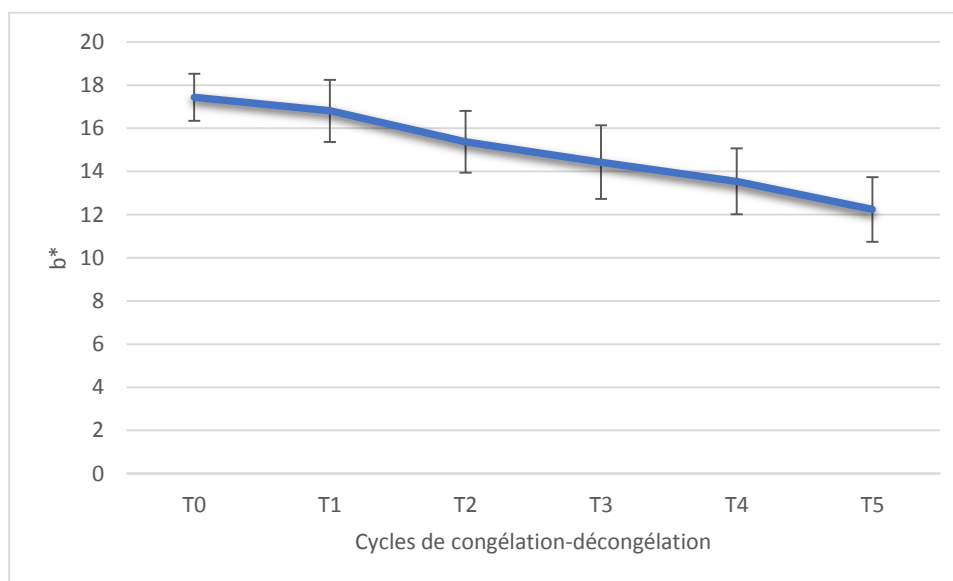
Les valeurs  $b^*$  (intensité de la couleur jaune-bleu, indiquant la jaunisse) des échantillons de Sardine et de Sardinella présentent également des variations en fonction des cycles de congélation-décongélation.

Pour la Sardine, les valeurs  $b^*$  diminuent progressivement à mesure que les cycles augmentent, passant de  $17,43 \pm 1,28$  à  $13,09 \pm 0,75$ . (Figure 36).

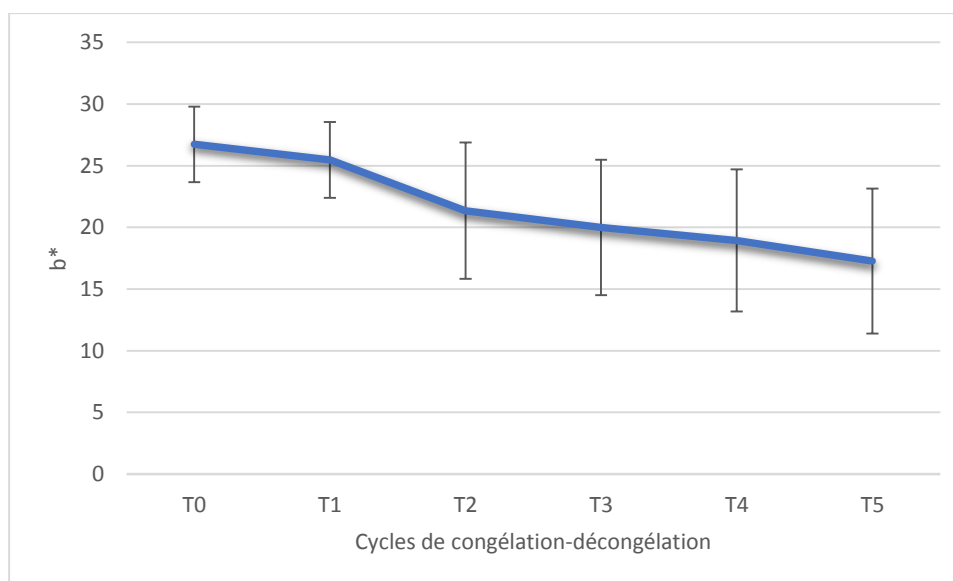
De même, pour la Sardinella, on observe une diminution similaire des valeurs  $b^*$  avec l'augmentation des cycles, passant de  $26,74 \pm 3,06$  à  $17,28 \pm 5,87$ . (Figure 37).

D'autre part, l'augmentation de l'intensité de la coloration jaune ( $b^*$ ) des filets de tilapia du Nil peut être liée à l'oxydation des lipides (Jovana et al., 2020), ce qui induit la formation de pigments fluorescents jaunes dans le produit, comme rapporté par Hamre et al. (2003) pour les filets de hareng congelés.

Donc tous ces altérations de couleur peuvent être associées à divers facteurs tels que la dénaturation des protéines, la formation de cristaux de glace et l'oxydation des lipides pendant le processus de congélation et de décongélation (Jovana et al., 2020). Les changements de couleur dus aux cycles de congélation et de décongélation sont attribués à une combinaison de dommages mécaniques, de dénaturation des protéines musculaires et de perte de capacité de rétention d'eau (Baygar et al., 2014).



**Figure 37:**  $b^*$  de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )



**Figure 38:** b\* de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (p<0,05)

### 3.1.4 Taux de concentrations des protéines totaux

Les protéines des sardinelles et des sardines présentent une diminution progressive de la solubilité après les cycles de congélation-décongélation (Figure 38 et 39).

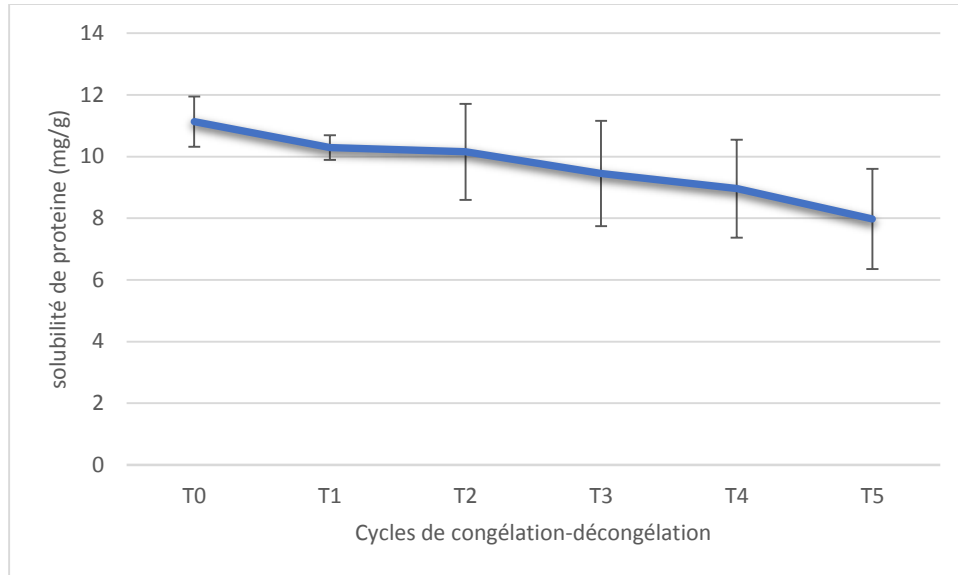
Les résultats révèlent une tendance à la baisse de la solubilité des protéines à mesure que le nombre de cycles de congélation-décongélation augmente pour les deux types de poisson, la sardine et la sardinelle.

Par exemple, pour la sardine, la solubilité des protéines diminue progressivement de 11,13 mg/g à 7,98 mg/g après cinq cycles, tandis que pour la sardinelle, elle diminue de 15,99 mg/g à 8,88 mg/g sur la même période de cycles. Ces résultats suggèrent que la répétition du processus de congélation-décongélation peut altérer la capacité des protéines à se dissoudre dans l'eau, ce qui pourrait avoir un impact sur la texture et la qualité du poisson.

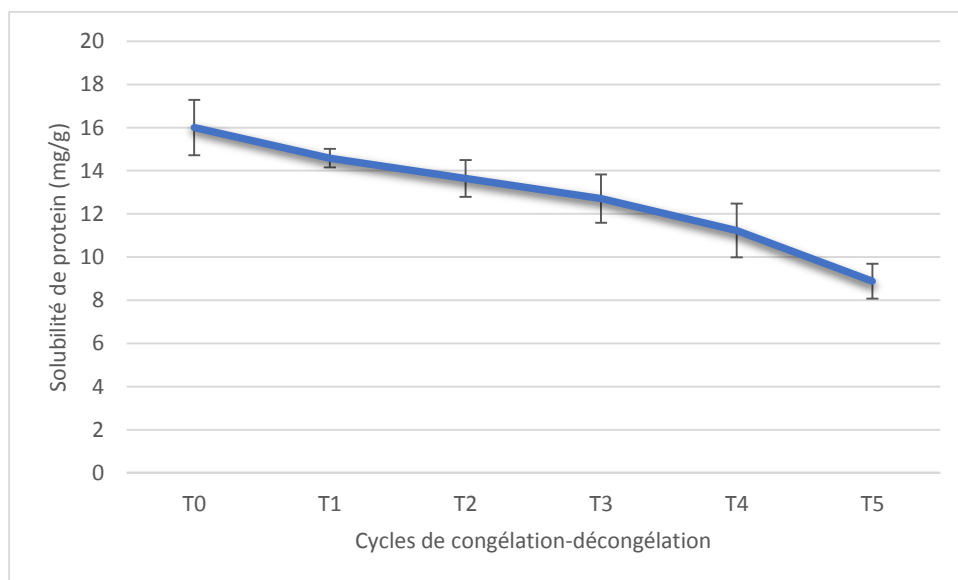
Dans une étude menée par Careche et son équipe (1998), des chutes significatives de la solubilité des protéines solubles ont été observées dans les filets de morue à -20°C et -30°C, avec une diminution plus prononcée à -20°C.

Selon des recherches, la solubilité des protéines diminue à environ 60% après le cinquième cycle de congélation et de décongélation pour le bar (*Dicentrarchus labrax*) (Baygar et al., 2012). Cette réduction de la solubilité est attribuée à la dénaturation des protéines musculaires, telles que la myosine, et à la formation d'agrégats (Baygar et al., 2012 ; Du, Xin

et *al.*, 2021). Le processus de dénaturation est également mis en évidence par la diminution de la teneur en groupes sulfhydryle et la formation d'agrégats de calcium-ATPase. Ces changements dans la solubilité des protéines contribuent à la perte globale de qualité observée dans les produits de poisson surgelés (Baygar et Alparslan, 2015).



**Figure 39:** Solubilité de protéine de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )



**Figure 40:** Solubilité de protéine de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

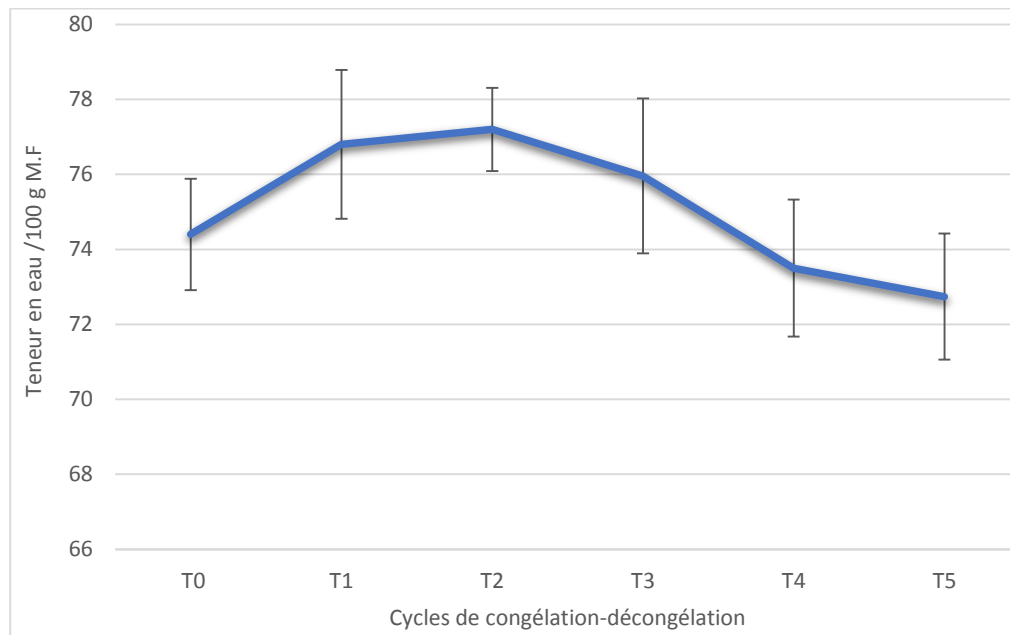
### 3.1.5 Capacité de rétention d'eau

Les résultats montrent une variabilité de **Teneur en eau (%)** des échantillons de sardinelle et de sardine soumis à des cycles de congélation-décongélation.

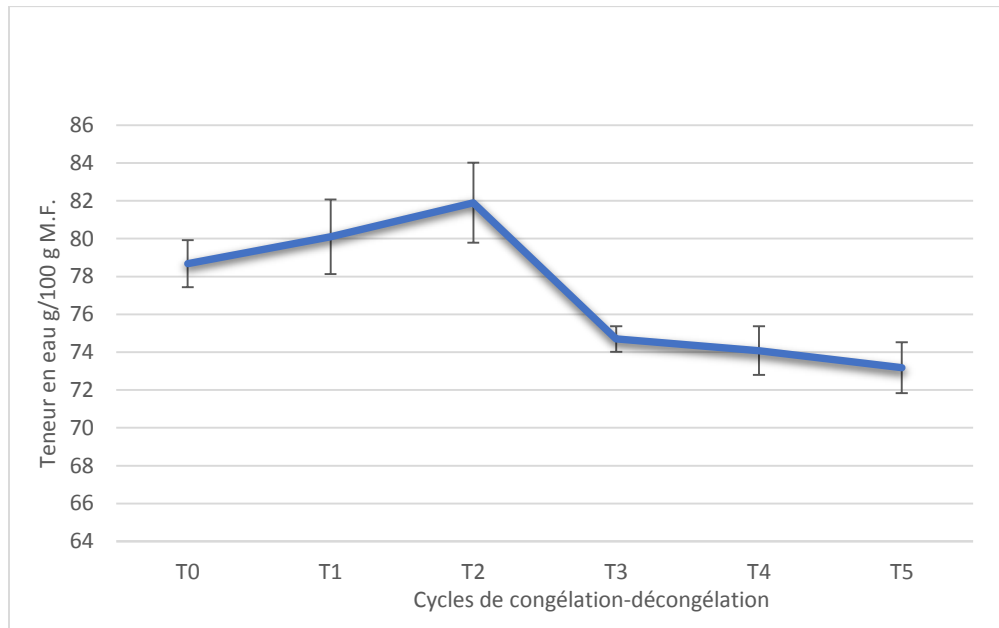
Pour la *Sardina pilchardus*, la teneur en eau au début de l'expérience, au T0, est de 74,4 %. Cette teneur en eau augmente progressivement jusqu'au T2, atteignant 77,2 %. Cependant, aux cycles suivants (T3, T4 et T5), une baisse significative de la teneur en eau est constatée, descendant à 75,96 %, 73,5 % et 74,18 % respectivement. (Figure 40).

Pour la *sardinella aurita* au T0, la teneur en eau est de 78,68%, puis elle augmente progressivement jusqu'au T2, atteignant 81,9%. Cela Cependant, aux cycles suivants (T3, T4 et T5), une diminution significative de la teneur en eau est observée, descendant à 74,7%, 74,08%, et 73,18% respectivement. (Figure 41).

L'augmentation de la teneur en eau pourrait être due à la libération d'eau pendant la décongélation, tandis que la diminution pourrait résulter de processus de perte d'eau pendant les cycles répétés de congélation-décongélation, ainsi que d'altérations physiques et chimiques du poisson induites par ces processus.

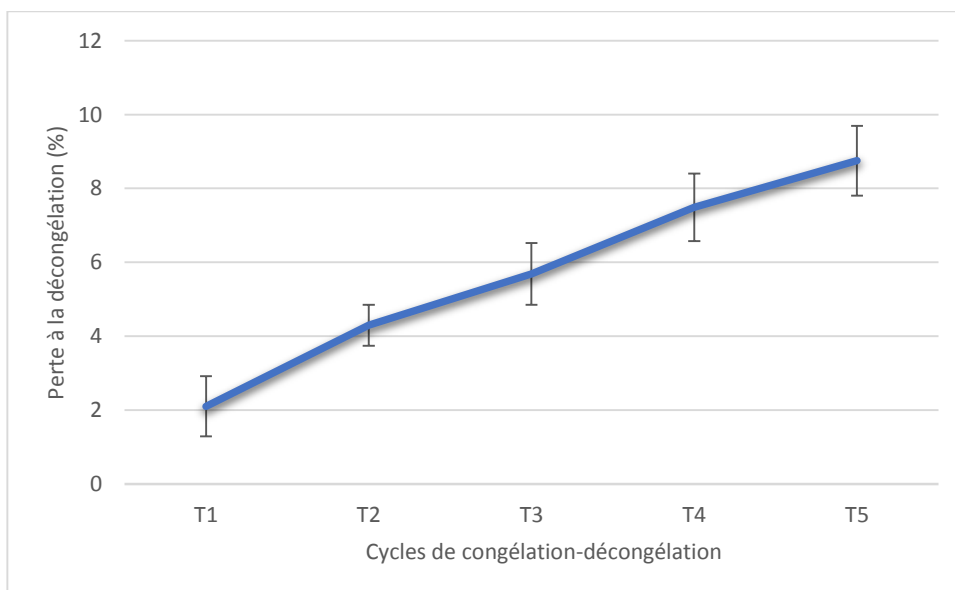


**Figure 41:** Teneur en eau de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

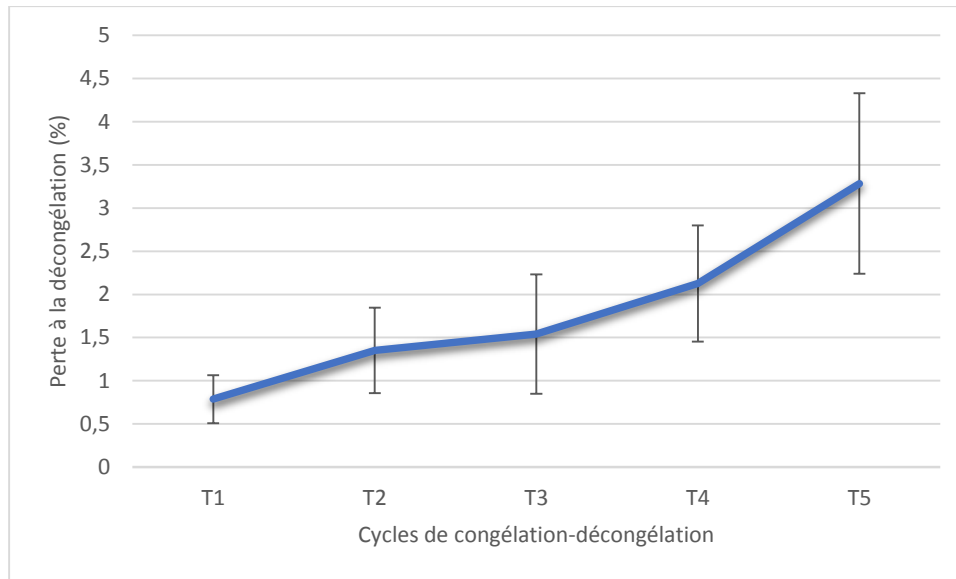


**Figure 42:** Teneur en eau de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

**La perte de décongélation** augmente progressivement à mesure que les échantillons de sardinelle et de sardine subissent plus de cycles de congélation-décongélation (Figure 42 et 43). À T1, la perte de décongélation est de  $2,1\% \pm 0,81$  pour la sardine et de  $0,78\% \pm 0,27$  pour la sardinelle. Cette perte augmente à T2, T3, T4 et atteint  $8,75\%$  pour la sardine et  $3,28\%$  pour la sardinelle à T5. Cette tendance indique que les échantillons des deux espèces perdent de l'eau pendant le processus de décongélation.

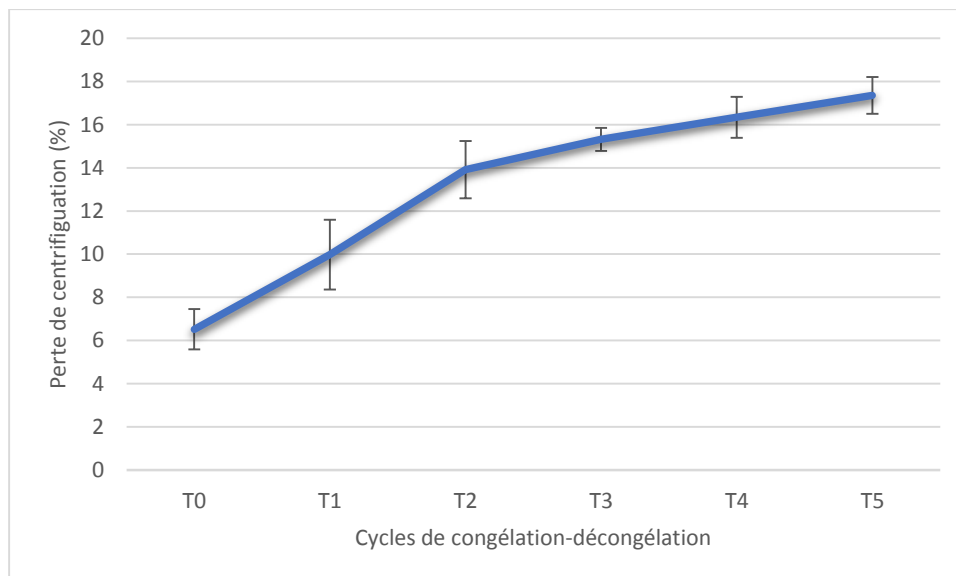


**Figure 43:** Perte à la décongélation de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

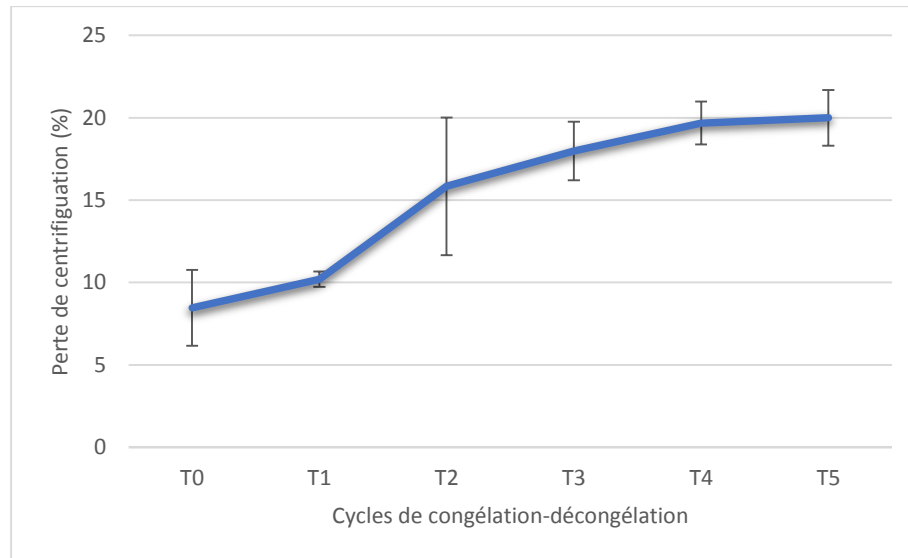


**Figure 44:** Perte à la décongélation de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

**La perte par centrifugation**, également mesurée en pourcentage, augmente significativement à mesure que les échantillons subissent à des cycles répétés de congélation et décongélation (Figure 44, 45). À T0, la perte par centrifugation est de 8,64% avec une incertitude de  $\pm 0,7\%$ . Cette perte augmente à T1, T2, T3, T4, atteignant 20% à T5. Cette tendance indique que les échantillons ont de plus en plus de difficulté à retenir l'eau pendant le processus.

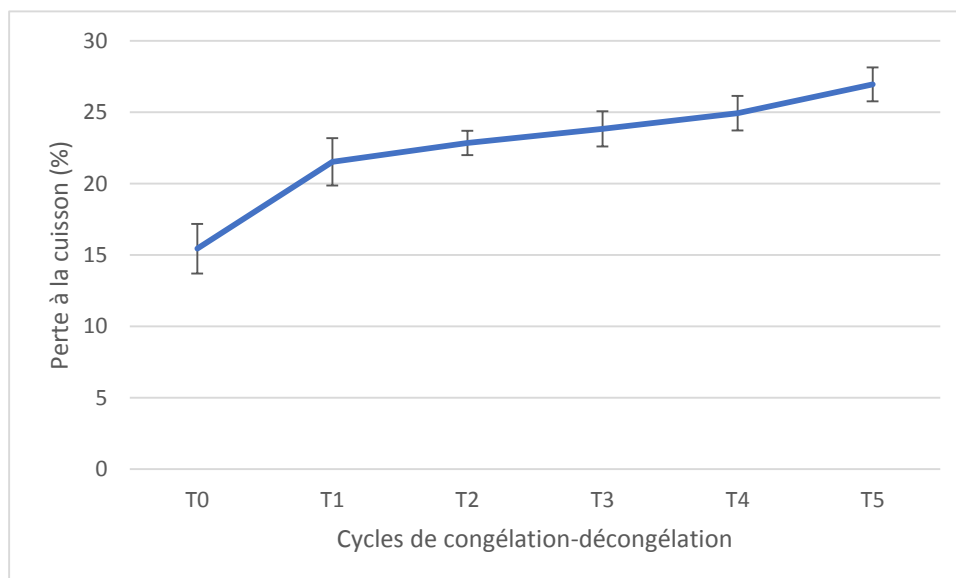


**Figure 45:** Perte de la centrifugation de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

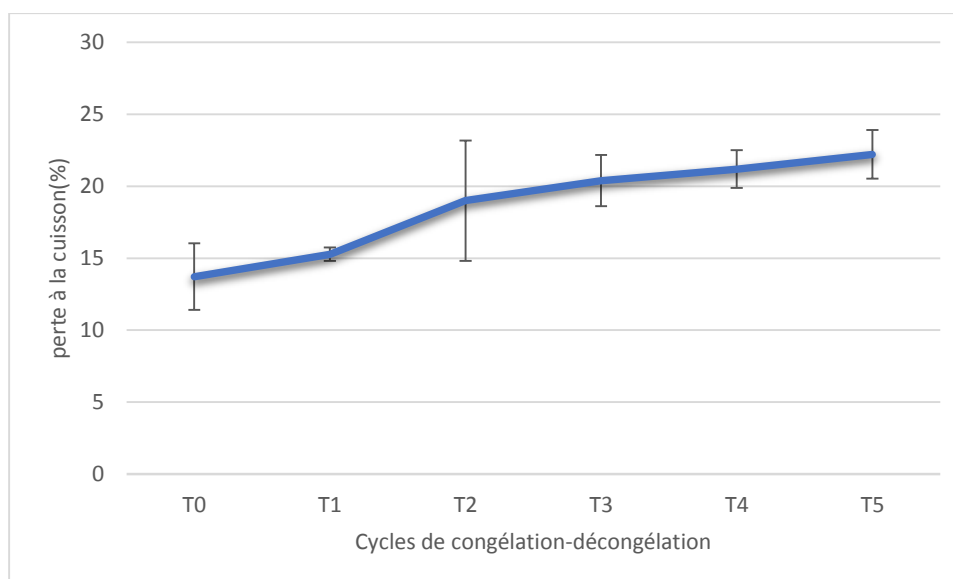


**Figure 46:** Perte de la centrifugation de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

**La perte à la cuisson** augmente significativement avec les cycles de congélation-décongélation (Figure 46 et 47). À T0, la perte à la cuisson est de  $15,44\% \pm 1,7$  pour la sardine et pour  $13,72\% \pm 2,3$  la sardinelle. Cette perte augmente à T1, T2, T3, T4, atteignant pour la sardine  $26,22\%$  et  $22,22\%$  pour la sardinelle à T5. Cette tendance indique que les échantillons perdent une quantité significative d'eau pendant la cuisson, ce qui peut affecter la qualité du produit.



**Figure 47:** Perte à la cuisson de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )



**Figure 48:** Perte à la cuisson de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. ( $p < 0,05$ )

Les cycles répétés de congélation et de décongélation ont été constatés comme ayant un effet sur la teneur en humidité du poisson. De multiples cycles de congélation -décongélation peuvent entraîner une augmentation de la proportion d'eau libre dans la chair du poisson (Lv et Xie, 2021).

L'augmentation du diamètre, du volume et de la porosité des cristaux de glace dans le poisson congelé lors de congélations et décongélation répétées est associée à une augmentation de la perte centrifuge, de la perte à la cuisson et de la conductivité, indiquant une perte d'humidité (Hu et *al.*, 2021).

De plus, la capacité de rétention d'eau des muscles de poisson diminue après de multiples cycles de congélation-décongélation, entraînant une réduction de la teneur en humidité (Sandra et *al.*, 2019).

La migration de l'eau immobilisée vers l'eau libre est observée, indiquant également une diminution de la teneur en humidité (Du et *al.*, 2023). Par conséquent, les cycles répétés de congélation et de décongélation peuvent entraîner une diminution de la teneur en eau du poisson.

### 3.2 Analyse histologique

Il était possible d'observer à partir de la Figure 48 et 49 que, à mesure que le nombre de cycles de congélation-décongélation augmentait, les tissus musculaires passaient d'un état serré et ordonné à un état désordonné et non systématique.

Dans le groupe d'échantillons frais, les fibres musculaires étaient intactes et structurées de manière serrée et ordonnée. Cependant, les fibres musculaires tranchées en travers semblaient polygonales en forme, comme rapporté par Năstase et *al.* (2017), qui ont constaté que les fibres musculaires de poisson en faisceaux ont une forme polygonale et semblent uniformes lorsqu'elles ne sont pas congelées.

Après le premier cycle de congélation-décongélation, la microstructure des fibres musculaires était altérée, principalement caractérisée par l'élargissement des espaces entre les fibres. Cette altération découle de la formation initiale de cristaux de glace dans les cellules musculaires, provoquant des dommages aux membranes cellulaires et des déformations des fibres, entraînant ainsi des espaces intercellulaires et une perte d'intégrité cellulaire.

Lors du deuxième cycle, les dommages cellulaires se sont aggravés lors de la décongélation, entraînant une rupture supplémentaire des membranes cellulaires et une libération accrue de liquides extracellulaires, perturbant davantage la structure histologique du muscle.

Après le troisième cycle, une dégradation plus sérieuse de la structure des fibres musculaires était observée, caractérisée par des ruptures à grande échelle et une désintégration notable des fibres. Le tissu musculaire présentait une déformation significative, fusionnant parfois en une seule masse lorsqu'il était sévèrement déshydraté et dégénéré. Cette déformation semblait résulter d'une perte de la capacité de contact, ce qui conférait au tissu une apparence rigide. Des substances granulaires basophiles distinctes, composées de matériau protéique interstitiel, étaient visibles entre les fibres musculaires, ce qui est une caractéristique observée chez d'autres espèces de poissons telles que le carpe et le merlu (Strateva et *al.*, 2021 ; Năstase et *al.*, 2017). Ces substances, présentes dans l'espace intercellulaire, témoignent de la poursuite de la désorganisation des fibres musculaires et de la dégradation accrue des composants tissulaires.

Après le quatrième cycle, il y a eu une augmentation de la dégradation des fibres musculaires et de la fragmentation cellulaire, avec des altérations morphologiques plus marquées des fibres musculaires, entraînant une perte de structure et d'organisation.

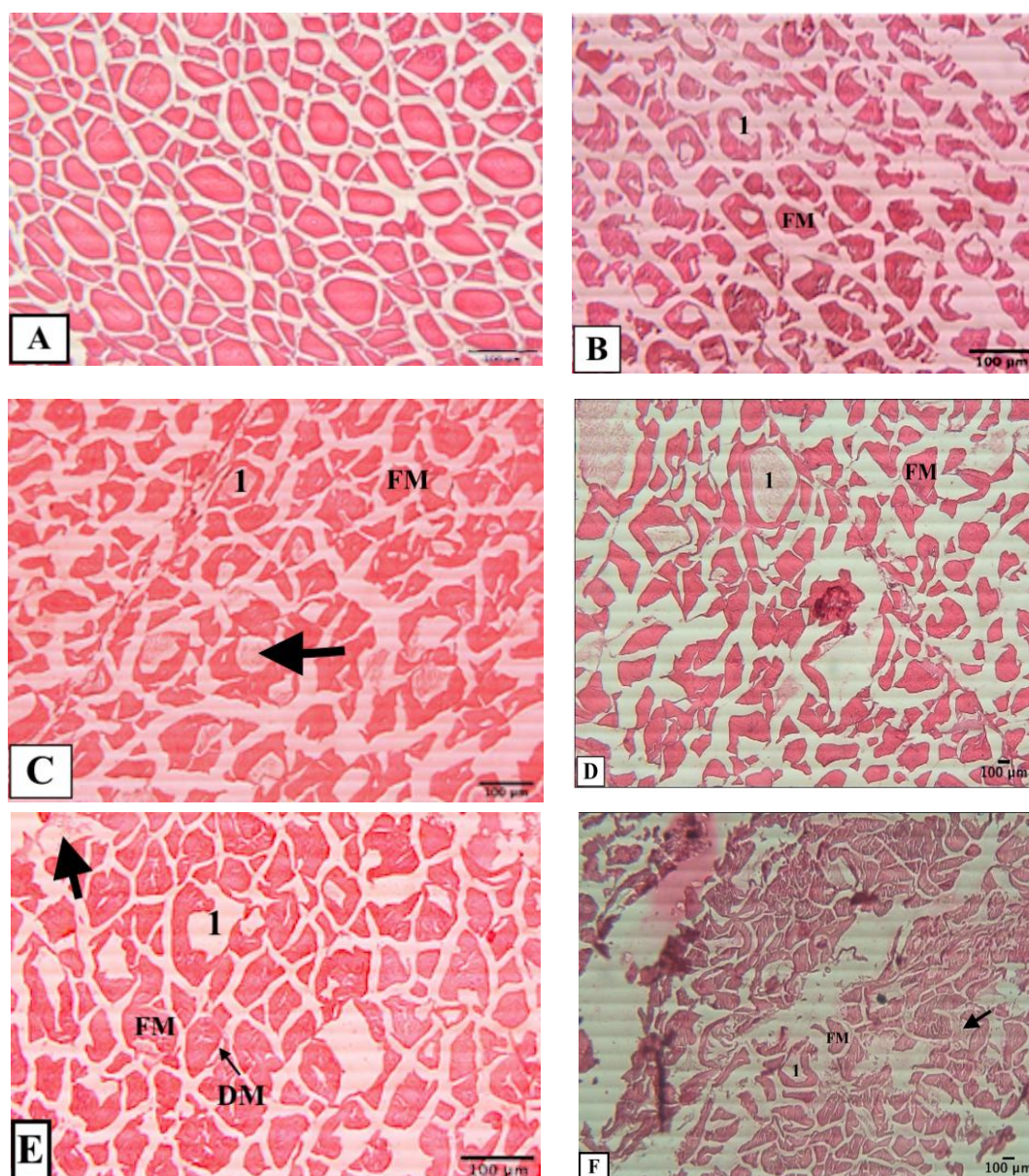
Au cinquième cycle, la structure des fibres musculaires était lâche et compacte, en accord avec la réduction de la force de cisaillement. Les espaces entre les fibres musculaires étaient agrandis en raison de la destruction de l'endomysie et des faisceaux de fibres musculaires. Pendant ce temps, les espaces entre les fibres étaient agrandis et les fibres étaient segmentées, détruisant. De plus, l'intégrité de la microstructure musculaire était affectée par la dégradation des principales protéines dans les fibres musculaires et les dommages mécaniques des cristaux de glace dans les cycles de congélation et de décongélation. Par conséquent, la texture d'origine de la viande du poisson frais était perdue, et ainsi la qualité comestible de la viande de poisson (*Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita*) était dégradée.

Donc les multiples cycles de congélation-décongélation ont des effets néfastes sur l'histologie du tissu musculaire des poissons. Des études menées sur diverses espèces de poissons telles que les carpes, la truite arc-en-ciel et le *Trachurus murphyi* ont montré que la congélation et la décongélation répétées entraînent des dommages structurels aux fibres musculaires (Ningning et al., 2023 ; Strateva et al., 2021 ; Hu et al., 2021).

La sardine montre une dégradation plus rapide par rapport à la sardinelle lors de chaque cycle de congélation-décongélation, ce qui peut influencer leur qualité et leur texture (Feng et al., 2012)

La sardine a une teneur en lipides plus élevée et une composition en acides gras oméga-3 plus riche que la sardinelle (Melgosa et al., 2020). Les acides gras oméga-3 sont sensibles à l'oxydation et peuvent se dégrader plus rapidement lors de cycles de congélation-décongélation répétés. Ainsi, la sardine est plus susceptible de subir une détérioration rapide en raison de la dégradation accrue de ces acides gras, affectant sa qualité nutritionnelle et sensorielle. En revanche, la composition différente en lipides et en acides gras de la sardinelle pourrait la rendre moins sensible à cette détérioration rapide (Mkadem et al., 2020).

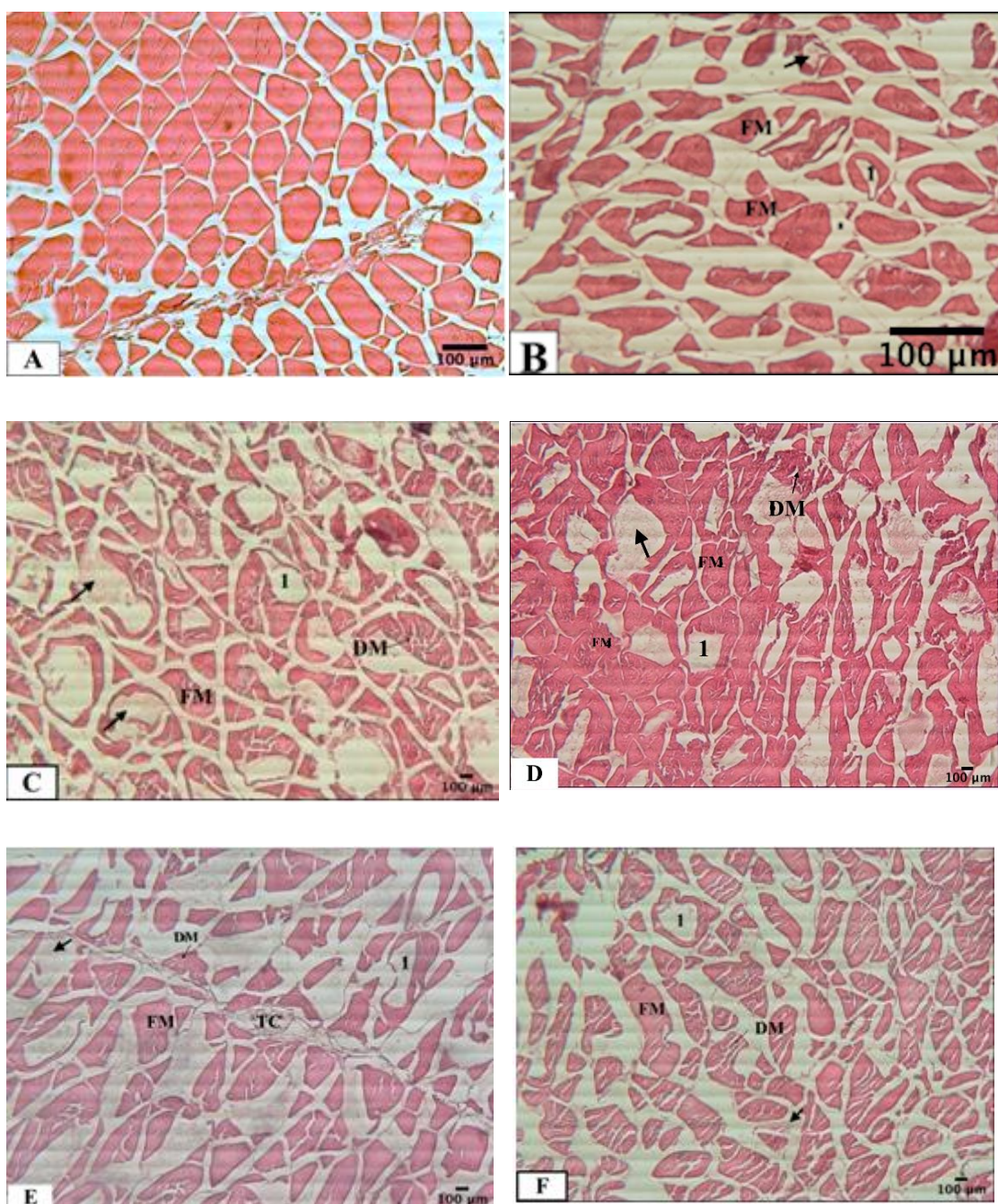
Ces différences soulignent l'importance de prendre en compte la composition musculaire et la teneur en lipides des poissons lors de la manipulation et du stockage, afin de maintenir leur qualité et leur fraîcheur.



**Figure 49:** Histologie musculaire de *Sardina pilchardus* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (H&E).

A: T0 (poisson frais); B: T1 (un cycle de congélation-décongélation) ; C: T2 (deux cycles de congélation-décongélation) ; D: T3 (trois cycles de congélation-décongélation) ; E : T4 (quatre cycles de congélation-décongélation) ; F :T5 (cinq cycles de congélation-décongélation).

(FM: fibre musculaire, 1: empreinte cristalline de glace, flèche: matériel protéique interstitiel)



**Figure 50:** Histologie musculaire de *Sardinella aurita* soumise à différents cycles de congélation-décongélation. (H&E).

A: T0 (poisson frais); B: T1 (un cycle de congélation-décongélation) ; C: T2 (deux cycles de congélation-décongélation) ; D: T3 (trois cycles de congélation-décongélation) ; E : T4 (quatre cycles de congélation-décongélation) ; F :T5 (cinq cycles de congélation-décongélation).

(FM: fibre musculaire. TC: tissu conjonctif, 1: empreinte cristalline de glace, flèche: matériel protéique interstitiel).

### 3.3 Analyse histomorphométrique

Dans cette étude, nous avons effectué une analyse quantitative des tailles des cristaux de glace en calculant le rapport entre ces tailles et la surface cellulaire des poissons. Malgré quelques difficultés rencontrées dans le calcul de la surface des fibres musculaires des poissons congelés/décongelés, nous avons pu observer une augmentation significative de la taille des cristaux de glace au fil des cycles de congélation-décongélation pour les deux espèces étudiées.

Plus précisément, pour *Sardina pilchardus*, la superficie des cristaux de glace a augmenté de manière significative, passant de 1025,91  $\mu\text{m}^2$  lors du premier cycle à 2239,69  $\mu\text{m}^2$  lors du cinquième cycle. En conséquence, la proportion de la superficie des cristaux de glace par rapport à celle de la fibre musculaire a également augmenté, passant de 25% à 63%

De même, pour *Sardinella aurita*, nous avons observé une augmentation significative de la superficie des cristaux de glace, passant de 603,63  $\mu\text{m}^2$  au premier cycle à 1640,54  $\mu\text{m}^2$  au cinquième cycle. En conséquence, la proportion de la superficie des cristaux de glace par rapport à celle de la fibre musculaire a également augmenté, passant de 16% à 44%.

Ces résultats indiquent une évolution similaire dans la superficie des cristaux de glace pour les deux espèces, avec une augmentation significative au fil des cycles de congélation-décongélation, comme illustré dans les figures 50, 51, 52 et 53.

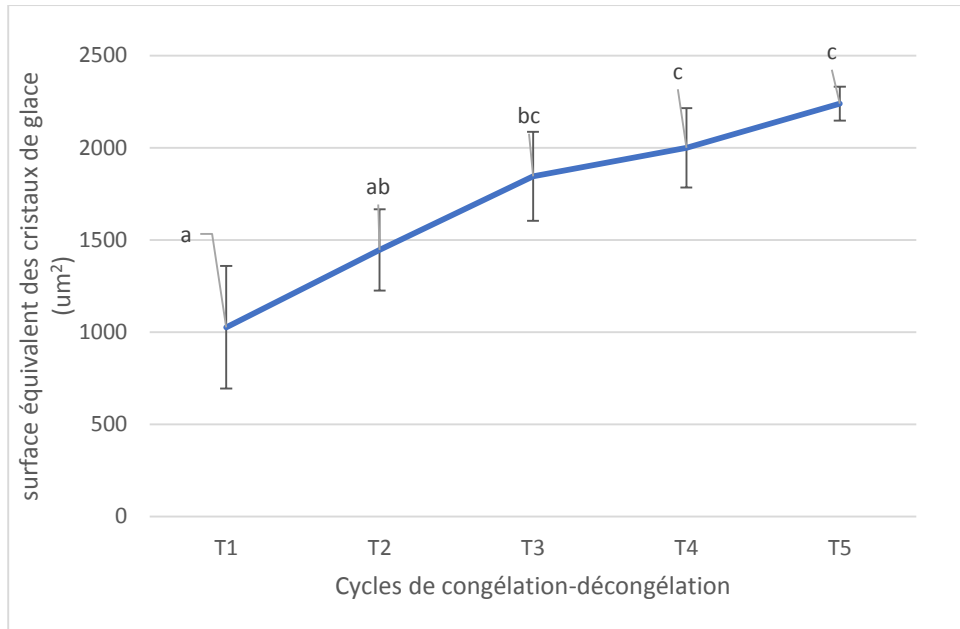
Les cycles répétés de congélation-décongélation ont un impact significatif sur le diamètre des cristaux de glace dans le poisson. Les études sur le *Trachurus murphyi* et la carpe miroir montrent qu'à mesure que les cycles de congélation-décongélation augmentent, le diamètre moyen des cristaux de glace augmente également, entraînant des changements structuraux dans les produits à base de poisson (Chunlin et al., 2021 ; Zhu SongMing et al., 2003). De plus, des recherches sur la carpe argentée et les pilons de poulet confirment que les cycles multiples de congélation-décongélation entraînent la croissance des cristaux de glace, provoquant un retrait osmotique de l'eau, des dommages mécaniques et la dénaturation des protéines, affectant finalement la qualité du tissu du poisson (Backi, C. J., 2022).

La croissance des cristaux de glace est attribuable à la recristallisation durant la période de stockage à basse température (Jiang et al., 2020). Ainsi, la fusion partielle des cristaux de glace de petite taille favorise la formation de nouveaux cristaux plus grands lors de stockages ultérieurs (Payne et al., 1994).

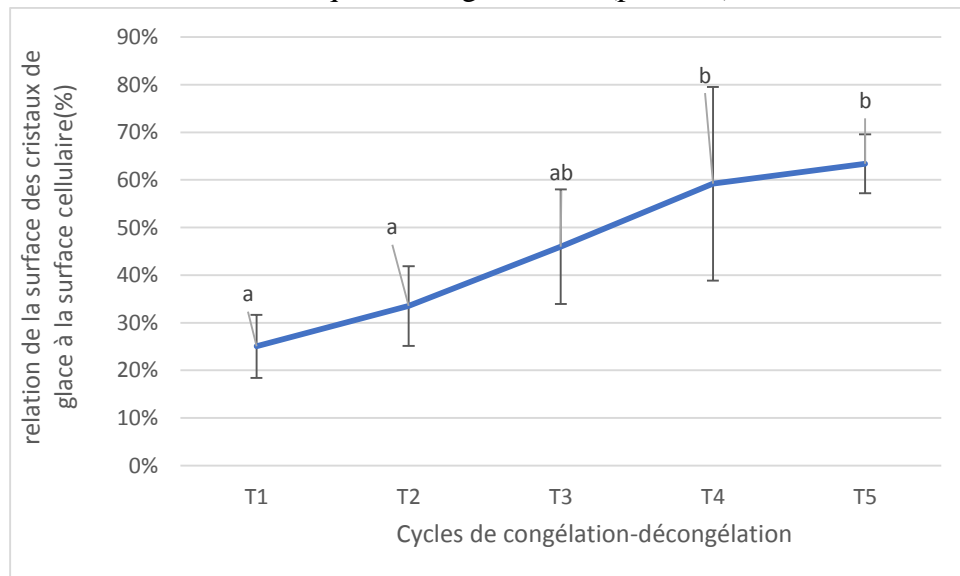
L'accroissement de la taille/volume des cristaux de glace induit des dommages mécaniques considérables aux fibres musculaires, provoquant ainsi une augmentation de la libération d'un liquide non gelé à la fois à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule. Cela se traduit

par des pertes accrues lors de la décongélation et une migration accrue de l'eau extracellulaire (Jiang *et al.*, 2020).

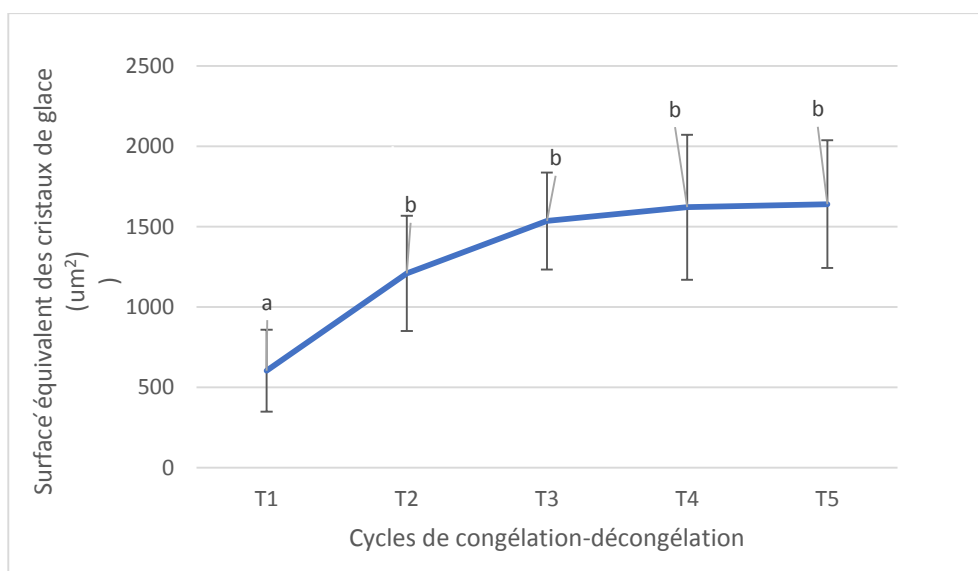
En outre, La transformation de l'eau en cristaux glacés entraîne une augmentation de la concentration des substances dissoutes dans l'eau résiduelle, conduisant à une dénaturation supplémentaire des protéines (Kaale et Eikevik, 2016).



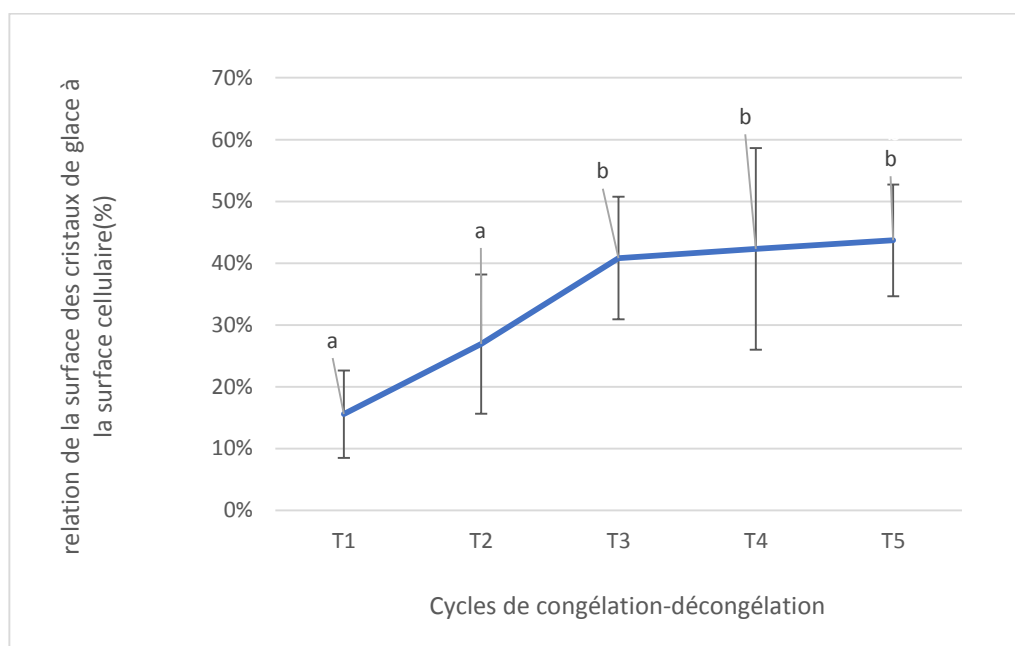
**Figure 51:** La surface moyenne des cristaux de glace observées lors de divers cycles de congélation-décongélation de *Sardina pilchardus*. Différentes lettres indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).



**Figure 52:** La relation entre la surface des cristaux de glace et la surface des cellules de *Sardina pilchardus*. Différentes lettres indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).



**Figure 53:** La surface moyenne des cristaux de glace observée lors de divers cycles de congélation-décongélation de *Sardinella aurita*. Différentes lettres indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).



**Figure 54:** La relation entre la surface des cristaux de glace et la surface des cellules de *Sardinella aurita*. Différentes lettres indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).

# **CONCLUSION**

## CONCLUSION

L'étude approfondie des effets de la réfrigération, de la congélation et des cycles de congélation-décongélation sur la qualité des poissons, en particulier la sardine (*Sardina pilchardus*) et la sardinelle (*Sardinella aurita*), a permis de mettre en évidence des transformations significatives aux niveaux physicochimique et histologique.

Premièrement, l'étude des effets de la réfrigération sur les propriétés chimiques des échantillons de *Sardina pilchardus* et de *Sardinella aurita* révèle des tendances distinctes dans leur comportement de conservation. Les observations ont mis en lumière des fluctuations significatives mais subtiles du pH, de l'activité de l'eau et de la teneur en eau au fil du temps pour les deux espèces. Cependant, une analyse approfondie suggère que la *Sardina pilchardus* pourrait être plus susceptible de se détériorer rapidement que la *Sardinella aurita* lorsqu'elles sont soumises à la réfrigération. Ceci est étayé par une diminution plus prononcée de la teneur en eau chez la *Sardina pilchardus*, suggérant des processus de dégradation des protéines plus actifs, ce qui indique une altération accélérée de la qualité du poisson. Ces conclusions soulignent l'importance de surveiller attentivement les conditions de réfrigération pour garantir la qualité et la fraîcheur des produits de la mer, en mettant en évidence la nécessité de stratégies de gestion différenciées selon les espèces pour minimiser les pertes et garantir la satisfaction des consommateurs. La réfrigération est une méthode efficace pour maintenir la fraîcheur des produits de la mer, mais elle n'est pas adaptée à une conservation à long terme

Deuxièmement, la congélation des poissons a également entraîné des changements dans le pH et l'activité de l'eau, les valeurs restent généralement proches entre les échantillons frais et congelés, suggérant une certaine conservation des propriétés chimiques. Cette constance peut être attribuée à l'efficacité de la congélation pour ralentir les processus de dégradation, limitant ainsi les variations dans les concentrations chimiques. Cela souligne l'efficacité de la congélation pour maintenir la composition chimique des poissons dans une certaine mesure, ce qui peut être un avantage pour la préservation de la qualité des produits de la mer sur le long terme.

Troisièmement, l'impact des cycles de congélation-décongélation sur la qualité des poissons s'est avéré significatif. L'exposition à des températures fluctuantes semble induire des altérations notables dans les propriétés physicochimiques et histologiques du poisson. Les

résultats suggèrent que ce processus peut accélérer la détérioration du poisson, compromettant sa texture, sa saveur, sa valeur nutritionnelle et sa qualité globale. Il est donc crucial de prendre des mesures pour minimiser les cycles de congélation-décongélation répétés afin de préserver la qualité et la fraîcheur du poisson, en particulier dans des régions où de telles pratiques de stockage sont courantes. Des méthodes alternatives de stockage et de gestion doivent être envisagées pour garantir la qualité des produits de la mer et répondre aux normes de sécurité alimentaire et aux attentes des consommateurs.

Sur le plan histologique, lors de la réfrigération, le tissu musculaire des poissons frais montre une organisation normale, avec des fibres musculaires alignées, des stries distinctes et un tissu conjonctif préservé autour. Cependant, avec une durée de réfrigération prolongée, des altérations sont observées, telles que la fragmentation des fibres musculaires, l'élargissement des espaces interfibrillaires et la dégénérescence des myofibres. Ces changements sont plus prononcés chez la *Sardina pilchardus* que chez la *Sardinella aurita*, suggérant une sensibilité différente à la réfrigération entre les deux espèces.

En ce qui concerne la congélation, les échantillons de *Sardinella aurita* et de *Sardina pilchardus* présentent des altérations dans la structure des fibres musculaires après avoir été congelés à -20°C pendant 15 jours. Ces altérations se caractérisent par des lacunes au centre des fibres musculaires, attribuées à la présence de cristaux de glace (empreintes des cristaux de glace).

Pour ce qui est des cycles de congélation-décongélation, les observations histologiques révèlent une détérioration progressive des tissus musculaires à chaque cycle. Les fibres musculaires passent d'un état serré et ordonné à un état désordonné et non systématique, avec une augmentation de la dégradation, des ruptures et des fragmentations des fibres musculaires. Cette dégradation est plus marquée chez la *Sardina pilchardus* que chez la *Sardinella aurita*, ce qui peut être attribué à des différences dans la composition musculaire et la sensibilité aux cycles de congélation-décongélation entre les deux espèces.

En conclusion, cette étude met en évidence l'importance de comprendre les effets de la réfrigération, de la congélation et des cycles de congélation-décongélation sur la qualité des poissons pour garantir la sécurité alimentaire et prévenir la fraude. Des pratiques de stockage et de traitement appropriées, ainsi que des mesures de contrôle de qualité rigoureuses, sont

essentielles pour assurer l'intégrité et la qualité des produits de la mer sur le marché, garantissant ainsi la satisfaction et la confiance des consommateurs.

**RECOMMENDATIONS  
ET  
PERSPECTIVES**

## **RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES**

- Sensibiliser aux effets des cycles de congélation-décongélation : informer les acteurs de l'industrie alimentaire sur les conséquences préjudiciables des répétitions de la congélation-décongélation sur la qualité des produits et l'intégrité des tissus musculaires.
- Renforcer les contrôles qualité : à travers la mise en place des protocoles de contrôle qualité rigoureux tout au long de la chaîne d'approvisionnement pour détecter et prévenir les fraudes alimentaires éventuelles, notamment la substitution de poissons frais par des produits congelés.
- Investir dans la recherche et le développement : encourager la recherche sur de nouvelles technologies de conservation et de détection des altérations tissulaires afin d'améliorer la qualité et la sécurité des produits de la mer.
- Promouvoir une consommation responsable : sensibiliser les consommateurs aux bonnes pratiques d'achat, de stockage et de préparation des produits de la mer pour garantir leur sécurité alimentaire et leur satisfaction gustative.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alemany, F., & Alvarez, F. (1993). Growth differences among sardine (*Sardina pilchardus* Wallb.) populations in Western. *Sci. Mar*, 57(2-3), 229-234.
- Ali, S., Zhang, W., Rajput, N., Khan, M. A., Li, C. B., & Zhou, G. H. (2015). Effect of multiple freeze–thaw cycles on the quality of chicken breast meat. *Food chemistry*, 173, 808-814.
- Alim, M. B., Fahmi, A. S., Purnamayati, L., & Agustini, T. W. (2020, July). Non-destructive freshness assessment of *Cyprinus carpio* based on image analysis. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 530, No. 1, p. 012014). IOP Publishing.
- Alizadeh, E., Chapleau, N., De Lamballerie, M., & Le-Bail, A. (2007). Effect of different freezing processes on the microstructure of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4), 493-499.
- Aubourg, S. P., Lehmann, I., & Gallardo, J. M. (2002). Effect of previous chilled storage on rancidity development in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(15), 1764-1771.
- Aubourg, S. P., Piñeiro, C., & González, M. J. (2004). Quality loss related to rancidity development during frozen storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 671-678.
- Aubourg, S.P. (2001). Damage detection in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during chilled storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 857–862.
- Avinee, G., Charfi, S., Stocker, N., Gyde, E., Hebert, A., Mabilie, M. P., ... & Chatelain, D. (2010). L'anatomie pathologique, une méthode d'étude originale des denrées alimentaires. In *Annales de pathologie* (Vol. 30, No. 5, pp. 344-349). Elsevier Masson.
- Avramiuc, M. (2017). The influence of slow thawing on evolution of some biochemical compounds in frozen fishes. *Food and Environment Safety Journal*, 16(2).
- Backi, C. J. (2022). Industrial Thawing of Fish Blocks. In *Sustainable Fish Production and Processing* (pp. 175-201). Academic Press.
- Baygar, T., & Alparslan, Y. (2015). Effects of multiple freezing ( $-18\pm 2^{\circ}$  C) and microwave thawing cycles on the quality changes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of food science and technology*, 52, 3458-3465.
- Baygar, T., Alparslan, Y., & Kaplan, M. (2012). Determination of changes in chemical and sensory quality of sea bass marinades stored at  $+4 (\pm 1)$  C in marinating solution. *CyTA- Journal of Food*, 10(3), 196-200.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). 0.2. 1 Water Molecule.
- Bone, Q. (1966). On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 46(2), 321-349.
- Bone, Q., Hoar, W. S., & Randall, D. J. (1978). Locomotor muscle. *Fish physiology*, 7, 361-424.
- Bonnet, M., Louveau, I., Cassar-Malek, I., Lefaucheur, L. and Rescan, P.Y., 2015. Comprendre le développement des muscles et des tissus adipeux: un préalable pour maîtriser les qualités des carcasses et des produits des animaux d'élevage. *INRA Productions Animales*, 28(2), pp.137-150.

- Boruah, S. K., Agarwal, B., Baruah, S., & Boruah, P. K. (2018). Nanostructured biosensor to estimate the freshness of fish. *ADB Journal of Engineering Technology*, 7.
- Breccia, A., Palmieri, M. A., Di-Yorio, M. P., Battista, A. G., Vissio, P. G., & Pérez-Sirkin, D. I. (2022). Anatomy and histology of the digestive tract and immunolocalization of Npy in the fish *Cichlasoma dimerus* (Cichliformes: Cichlidae). *Revista de Biología Tropical*, 70(1), 307-318.
- Cadenat, J. (1953). Notes d'ichtyologie ouest africaine: 6. Poissons des campagnes du "Gérard Tréca".
- Cai, Q. X., Wu, Y. Y., Li, L. H., Yang, X. Q., Zhao, Y. Q., & Wang, Y. Q. (2015). Lipid oxidation during processing of traditional salting fish of white Chinese croaker (*Argyrosomus amoyensis*). *Advanced Materials Research*, 1073, 1844-1848.
- Calanche, J., Tomas, A., Martinez, S., Jover, M., Alonso, V., Roncalés, P., & Beltrán, J. A. (2019). Relation of quality and sensory perception with changes in free amino acids of thawed seabream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, 119, 126-134.
- Cao, R., Lin, R., Sun, H., & Liu, Q. (2020). Microbiota and shelf life of whole and gutted pacific saury (*Cololabis saira*) during refrigerated storage. *Journal of Ocean University of China*, 19, 473-478.
- Cao, Y., He, S., Yu, Q., Han, L., Zhang, W., & Zou, X. (2022). Effects of multiple freeze-thaw cycles on meat quality, nutrients, water distribution and microstructure in bovine rumen smooth muscle. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(5), 3001-3011.
- Careche, M., Herrero, A. M., Rodríguez-Casado, A., Del Mazo, M. L., & Carmona, P. (1999). Structural changes of hake (*Merluccius merluccius* L.) fillets: effects of freezing and frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 952-959.
- Careche, M.; Mazo, M.; Torrejon, P.; Tejada, M. (1998). Importance of frozen storage temperature in the type of aggregation myofibrillar proteins in cod (*Gadus morhua*) fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6):1539-46.
- Carson, F. L., & Hladik, C. (1997). *Histotechnology: a self-instructional text* (Vol. 96, pp. 189-202). Chicago: ASCP press.
- Castrillón, A. M., Alvarez-Pontes, E., Arias, M. T. G., & Navarro, P. (1996). Influence of Frozen Storage and Defrosting on the Chemical and Nutritional Quality of Sardine (*Clupea pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(1), 29-34.
- Chen, J., Jayachandran, M., Bai, W., & Xu, B. (2022). A critical review on the health benefits of fish consumption and its bioactive constituents. *Food Chemistry*, 369, 130874.
- Chiesa, L. M., Pavlovic, R., Nobile, M., Di Cesare, F., Malandra, R., Pessina, D., & Panseri, S. (2020). Discrimination between fresh and frozen-thawed fish involved in food safety and fraud protection. *Foods*, 9(12), 1896.
- Choi, E. J., Park, H. W., Chung, Y. B., Park, S. H., Kim, J. S., & Chun, H. H. (2017). Effect of tempering methods on quality changes of pork loin frozen by cryogenic immersion. *Meat science*, 124, 69-76.
- Christian, J. H. B., & Scott, W. J. (1953). Water relations of salmonellae at 30 C. *Australian journal of biological sciences*, 6(4), 565-573.

- Chudasama, B. G., Dave, T. H., & Bhola, D. V. (2018). Comparative study of quality changes in physicochemical and sensory characteristics of iced and refrigerated chilled store Indian Mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *J. Entomol. Zool. Stud*, 6, 533-537.
- Currie, Suzanne et EVANS, David H. (ed.). *The physiology of fishes*. CRC Press, 2020.
- Dawson, P., Al-Jeddawi, W., & Remington, N. (2018). Effect of freezing on the shelf life of salmon. *International Journal of Food Science*, 2018(1), 1686121.
- Day, C.E., (2014). *Histopathology methods and protocols*, New York, Humana Press.
- Domingo, J. L., Bocio, A., Falcó, G., & Llobet, J. M. (2007). Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*, 230(2-3), 219-226.
- De Paiva Soares, K. M., & Gonçalves, A. A. (2012). Qualidade e segurança do pescado. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 71(1), 1-10.
- Du, N., Sun, Y., Chen, Z., Huang, X., Li, C., Gao, L., ... & Hao, Q. (2023). Effects of multiple freeze-thaw cycles on protein and lipid oxidation, microstructure and quality characteristics of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fishes*, 8(2), 108.
- Du, X., Li, H., Nuerjiang, M., Rui, L., Kong, B., Xia, X., & Shao, M. (2021). Influence of repeated freeze-thaw treatments on the functional and structural properties of myofibrillar protein from mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Food Biophysics*, 16(4), 492-501.
- Duarte, A. M., Silva, F., Pinto, F. R., Barroso, S., & Gil, M. M. (2020). Quality assessment of chilled and frozen fish—mini review. *Foods*, 9(12), 1739.
- Dumay, J. (2006). *Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: application à la valorisation de co-produits de poisson (Sardina pilchardus)* (Doctoral dissertation, Université de Nantes).
- Dyshliuk, N., Usenko, S., Slobodyanyuk, N., Mazurkevych, T., & Stehnei, Z. (2023). Microstructural analysis of frozen and salted fish and seafood meat. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 14(1).
- El Marrakchi, A., Bennour, M., Bouchriti, N., Hamama, A., & Tagafait, H. (1990). Sensory, chemical, and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of food protection*, 53(7), 600-605.
- Erkan, N., & Özden, Ö. (2008). Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *International journal of food science & technology*, 43(9), 1549-1559.
- Essen-Gustavsson, B., Karlsson, A., Lundström, K., & Enfält, A. C. (1994). Intramuscular fat and muscle fibre lipid contents in halothane-gene-free pigs fed high or low protein diets and its relation to meat quality. *Meat science*, 38(2), 269-277.
- Estupiñan, S., Cortés, G., Millán de Larriva, R., Penedo Padrón, J. C., & Sanjuán Velázquez, E. (2000). Cambios en la vida útil de la dorada acuacultivada en Canarias (*Sparus aurata*) conservada en hielo. *Alimentaria*.
- FAO., Page Web : La qualité et son évolution dans le poisson frais - 8. évaluation de la qualité du poisson . <https://www.fao.org/3/v7180f/v7180f09.htm> Consulté le 21 février 2023
- Fasolato, L., Balzan, S., Riovanto, R., Berzaghi, P., Mirisola, M., Ferlito, J. C., ... & Novelli, E. (2012). Comparison of visible and near-infrared reflectance spectroscopy to authenticate fresh and frozen-thawed swordfish (*Xiphias gladius* L). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(5), 493-507.

- Fasolato, L., Mirisola, M., Tepedino, G., Balzan, S., Arcangeli, G., Rosteghin, M., ... & Berzaghi, P. (2008). Dossier: Mai più decongelato per fresco-La ricerca applicata alle frodi in commercio. *EUROFISHMARKET*, 1, 22-45.
- Feng, Y. W., Ma, L. Z., Du, Y. C., Fan, S. H., & Dai, R. T. (2012). Chemical composition analysis of three commercially important fish species (sardine, anchovy and mackerel). *Advanced Materials Research*, 554, 900-904.
- Fischer, W. (1987). Fiches FAO d'identification des especes pour les besoins de la peche.(Rev 1). Mediterranee et mer Noire. Zone de Peche 37. Vertebres, 2.
- Forest, A. (2001). Ressources halieutiques hors quotas du Nord Est Atlantique: bilan des connaissances et analyse de scénarios d'évolution de la gestion.
- García, R., & Careche, M. (2002). Influence of chilling methods on the quality of sardines (*Sardina pilchardus*). *Journal of food protection*, 65(6), 1024-1032.
- Genten, F., Terwinghe, E., & Danguy, A. (2009). *Atlas of fish histology*. CRC Press.
- Gil, M. M., & Barbosa, A. L. (2011). *Microorganisms and safety*. *Practical Food and Research*, 3rd ed.; Cruz, RMS, Ed, 195-217.
- Gladyshev, M. I., Glushchenko, L. A., Makhutova, O. N., Rudchenko, A. E., Shulepina, S. P., Dubovskaya, O. P., ... & Sushchik, N. N. (2018). Comparative analysis of content of omega-3 polyunsaturated fatty acids in food and muscle tissue of fish from aquaculture and natural habitats. *Contemporary problems of ecology*, 11, 297-308.
- Gökoğlu, N., & Yerlikaya, P. (2015). *Seafood chilling, refrigeration and freezing: science and technology*. John Wiley & Sons.
- Gonçalves, D. B., Santos, C. S., Pinho, T., Queirós, R., Vaz, P. D., Bloore, M., ... & Hoffmann, I. (2021). Near infrared reflectance spectroscopy coupled to chemometrics as a cost-effective, rapid, and non-destructive tool for fish fraud control: Monitoring source, condition, and nutritional value of five common whitefish species. *Journal of AOAC International*, 104(1), 53-60.
- Hamre, K., Lie, Ø., & Sandnes, K. (2003). Development of lipid oxidation and flesh colour in frozen stored fillets of Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). Effects of treatment with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 82(3), 447-453.
- Hassoun, A. (2021). Exploring the potential of fluorescence spectroscopy for the discrimination between fresh and frozen-thawed muscle foods. *Photochem*, 1(2), 247-263.
- Hassoun, A., Shumilina, E., Di Donato, F., Foschi, M., Simal-Gandara, J., & Biancolillo, A. (2020). Emerging techniques for differentiation of fresh and frozen-thawed seafoods: Highlighting the potential of spectroscopic techniques. *Molecules*, 25(19), 4472.
- Hematyar, N., Masilko, J., Mraz, J., & Sampels, S. (2018). Nutritional quality, oxidation, and sensory parameters in fillets of common carp (*Cyprinus carpio* L.) influenced by frozen storage (-20 C). *Journal of food processing and preservation*, 42(5), e13589.
- Hirofumi, N., Tatsuya, T., & Seiichi, K. (2012). Simple detection method of biogenic amines in decomposed fish by intramolecular excimer fluorescence. *Food and Nutrition Sciences*, 2012.
- Holden, M. J., & Raitt, D. F. S. (Eds.). (1979). *Manual of Fisheries Science: Methods of Resource Investigation and Their Application*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Hu, C., & Xie, J. (2021). The effect of multiple freeze–thaw cycles on protein oxidation and quality of *Trachurus murphyi*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e15998.
- Huss, H. H. (1995). *Quality and Quality Changes in Fresh Fish—Technical Paper n° 348*. FAO: Fisheries, Roma.
- Ifremer (2008) fiche de synthèse sur l'ABVT. Bibliomer <http://goo.gl/6MLChx> (Accessed april 8, 2023).
- Irvine, W. (1947). Shaw, the Fabians, and the Utilitarians. *Journal of the History of Ideas*, 8(2), 218-231.
- Janči, T., Gauta, T., Putnik, P., Kanski, D., & Lovrinov, M. (2023). Influence of Fish Handling Practices Onboard Purse Seiners on Quality Parameters of Sardines (*Sardina pilchardus*) during Cold Storage. *Biomolecules*, 13(2), 192.
- Javadian, S. R., Rezaei, M., Soltani, M., Kazemian, M., & Pourgholam, R. (2013). Effects of thawing methods on chemical, biochemical, and microbial quality of frozen whole rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(2), 168-177.
- Jay, J.M.; Loessner, M.J.; & Golden, D.A. (2006). *Modern Food Microbiology*, 7th ed.; Springer: New York, NY, USA.
- Jeong, J. Y., Kim, G. D., Yang, H. S., & Joo, S. T. (2011). Effect of freeze–thaw cycles on physicochemical properties and color stability of beef semimembranosus muscle. *Food Research International*, 44(10), 3222-3228.
- Jia, H., Roy, K., Pan, J., & Mraz, J. (2022). Icy affairs: Understanding recent advancements in the freezing and frozen storage of fish. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1383-1408.
- Jiang, Q., Yin, T., Yang, F., Yu, D., Xu, Y., Tie, H., ... & Xia, W. (2020). Effect of freezing methods on quality changes of grass carp during frozen storage. *Journal of Food Process Engineering*, 43(11), e13539.
- Johnston, I. A. (1977). A comparative study of glycolysis in red and white muscles of the trout (*Salmo gairdneri*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fish Biology*, 11(6), 575-588.
- Johnston, W. A. (1994). *Freezing and refrigerated storage in fisheries (Vol. 340)*. Food & Agriculture Org.
- Kaale, L. D., & Eikevik, T. M. (2016). Changes of proteins during superchilled storage of Atlantic salmon muscle (*Salmo salar*). *Journal of food science and technology*, 53, 441-450.
- Kagan, R., & Viner, T. C. (2022). Identification of freeze-thaw artifact in fresh and decomposed black rockfish (*Sebastes melanops*) and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Pathology*, 59(6), 1022-1030.
- Valenciennes, A. (1847). *Histoire Naturelle des Poissons*, vol. 20, 472 p. Chez FG Levrault, Paris.
- Kestin, S.C., Warriss, P.D., Kuhlmann, H., Münkner, W., Robb, D.H., & Schelvis-Smit, A. (2001). *Farmed fish quality*.
- Keys, D. R., Lowder, A. C., & Mireles DeWitt, C. A. (2018). Conditions for the effective chilling of fish using a nano- sized ice slurry. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), e13564.

- Kiani, H., & Sun, D. W. (2011). Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 22(8), 407-426.
- Kiessling, A., Ruohonen, K., & Bjørnevik, M. (2006). Muscle fibre growth and quality in fish.
- Kim, H. W., Hong, Y. J., Jo, J. I., Ha, S. D., Kim, S. H., Lee, H. J., & Rhee, M. S. (2017). Raw ready- to- eat seafood safety: microbiological quality of the various seafood species available in fishery, hyper and online markets. *Letters in applied microbiology*, 64(1), 27-34.
- Kirschbaum, F., & Formicki, K. (Eds.). (2020). *The histology of fishes*. CRC Press. Sato K., Yoshinaka R., Sato M., Shimizu Y., 1986. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish*, 52 1595-1600.
- Koizumi, C., Wada, S., & Ohshima, T. (1987). Factors Affecting Development of Rancid Off Odor in Cooked. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(11), 2003-2009.
- Koizumi, C., Wada, S., & Ohshima, T. (2007). Factors Affecting Development of Rancid Off Odor in Cooked Fish.
- Leary, S. C., Lyons, C. N., Rosenberger, A. G., Ballantyne, J. S., Stillman, J., & Moyes, C. D. (2003). Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(4), R817-R826.
- Leygonie, C., Britz, T. J., & Hoffman, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat. *Meat science*, 91(2), 93-98.
- Li TingTing, L. T., Li JianRong, L. J., Hu WenZhong, H. W., & Li XuePeng, L. X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives.
- Li, H., Wang, L., Wang, J., Li, X., Li, J., Cui, F., ... & Mi, H. (2023). Effects of ultrasound-assisted freezing on the quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) subjected to multiple freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*, 404, 134530.
- Li, X., Zhang, Y., Li, Z., Li, M., Liu, Y., & Zhang, D. (2017). The effect of temperature in the range of- 0.8 to 4 C on lamb meat color stability. *Meat science*, 134, 28-33.
- Liebel, S., Tomotake, M. E. M., & Ribeiro, C. A. O. (2013). Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2), 09-15.
- Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., ... & Bugeon, J. (2015). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *The Scientific World Journal*, 2016(1), 3182746.
- Liu, X., Yan, Z., Wang, D., Zhao, R., Niu, D., & Wang, Y. (2023). Corrosion cracking behavior of reinforced concrete under freeze-thaw cycles. *Journal of Building Engineering*, 64, 105610.
- Losada, V.; Barros-Velázquez, J.; Gallardo, J.M.; & Aubourg, S.P.(2004) Effect of advanced chilling methods on lipid damage during sardine (*Sardina pilchardus*) storage. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 106, 844-850.
- Love, R. M. (1970). *The Chemical Biology of Fishes*. Academic Press, London.
- Love, R. M. (1975). Variability in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Northeast Atlantic: a review of seasonal and environmental influences on various attributes of the flesh. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32(12), 2333-2342.

- Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology (pp. xii-258).
- Luo, K., Feng, A., Lin, X., Fu, R., & Wei, H. (2023). Analysis of the water state and microfractal dimension of tilapia fillets during freezing and thawing. *Journal of Food Science*, 88(3), 1089-1100.
- Lv, Y., & Xie, J. (2021). Effects of freeze–thaw cycles on water migration, microstructure and protein oxidation in cuttlefish. *Foods*, 10(11), 2576.
- Magnussen, O. M., Nordtvedt, T. S., & Hardarson, V. (2001). Developments in rapid chilling of fish. *Proc. Bristol Meet*, 99-106.
- Malik, I. A., Elgasim, E. A., Adiamo, O. Q., Ali, A. A., & Mohamed Ahmed, I. A. (2021). Effect of frozen storage on the biochemical composition of five commercial freshwater fish species from River Nile, Sudan. *Food Science & Nutrition*, 9(7), 3758-3767.
- Maulu, S., Nawanzi, K., Abdel-Tawwab, M., & Khalil, H. S. (2021). Fish nutritional value as an approach to children's nutrition. *Frontiers in nutrition*, 8, 780844.
- Mazorra- Manzano, M. A., Pacheco- Aguilar, R., Díaz- Rojas, E. I., & Lugo- Sánchez, M. E. (2000). Postmortem changes in black skipjack muscle during storage in ice. *Journal of Food Science*, 65(5), 774-779.
- McClelland, G. B., Craig, P. M., Dhekney, K., & Dipardo, S. (2006). Temperature-and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Physiology*, 577(2), 739-751.
- Médale F., Navarro A., Zamorano M.J., Hildebrandt S., Gines R., Aguilera C., & Afonso J.M. (2009). Teneur en lipides et composition en acides gras de la chair de poissons issus de la pêche et de l'élevage. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(4), 173-181.
- Meistro, S., Pezzolato, M., Muscolino, D., Giarratana, F., Baioni, E., Panebianco, A., & Bozzetta, E. (2016). Histology as a valid tool to differentiate fresh from frozen-thawed marinated fish. *Journal of food protection*, 79(8), 1457-1459.
- Melgosa, R., Trigueros, E., Sanz, M. T., Cardeira, M., Rodrigues, L., Fernández, N., ... & Simões, P. (2020). Supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical water technologies for the production of bioactive extracts from sardine (*Sardina pilchardus*) waste. *The Journal of Supercritical Fluids*, 164, 104943.
- Mkaem, H., & Kaanane, A. (2020). Seasonal changes in chemical composition and fatty acids of sardines (*Sardina pilchardus*) from the Dakhla coast (Morocco). *Moroccan Journal of Agricultural Sciences*, 1(3).
- Mokhtar, D. M. (2021). *Fish histology: from cells to organs*. Apple Academic Press.
- Moosavi-Nasab, M., Khoshnoudi-Nia, S., Azimifar, Z., & Kamyab, S. (2021). Evaluation of the total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in fish fillets using hyperspectral imaging coupled with deep learning neural network and meta-analysis. *Scientific reports*, 11(1), 5094.
- Morash, A. J., Kajimura, M., & McClelland, G. B. (2008). Intertissue regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPTI): mitochondrial membrane properties and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1778(6), 1382-1389.

- Nakazawa, N., & Okazaki, E. (2020). Recent research on factors influencing the quality of frozen seafood. *Fisheries Science*, 86, 231-244.
- Nalan, G., & Pinar, Y. (2015). Quality changes of fish during chilling. Nalan G, Pinar Y. *Seafood Chilling, Refrigeration and Freezing*. p, 113-127.
- Năstase, G., Lyu, C., Ukpai, G., Șerban, A., & Rubinsky, B. (2017). Isochoric and isobaric freezing of fish muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485(2), 279-283.
- Nunes, M. L., Batista, I., & De Campos, R. M. (1992). Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(1), 37-43.
- Pacquit, A., Lau, K. T., McLaughlin, H., Frisby, J., Quilty, B., & Diamond, D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. *Talanta*, 69(2), 515-520.
- Pal, J., Ravi, O. P. K., Kumari, S., & Singh, A. K. (2021). Preservation of seafoods by hurdle technology. In *Meat and Nutrition*. IntechOpen.
- Panguila, E. A., de Sousa, M. I., Esteves, E., & Figueira, A. C. (2018). Evaluation of the freshness and shelf-life of fresh and chilled mackerel (*Scomber* spp.) and horse mackerel (*Trachurus* spp.), marketed in Luanda (Angola) and in Faro (Portugal). In *INCREaSE: Proceedings of the 1st International Congress on Engineering and Sustainability in the XXI Century-INCREaSE 2017* (pp. 168-181). Springer International Publishing.
- Pavlov, A., Dimitrov, D., Penchev, G., & Georgiev, L. (2008). Structural changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fish meat during freezing.
- Payne, S. R., Sandford, D., Harris, A., & Young, O. A. (1994). The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. *Meat science*, 37(3), 429-438.
- Pearson, A., & Blackhurst, D. (2001). Chilling and freezing food with ice slurries.
- Pease, H. D. (1912). Hygienic results of refrigeration in the conservation of fish and mollusks. *American Journal of Public Health*, 2(11), 849-854.
- Poll, M. (1953). *Poissons : Téléostéens malacoptérygiens*. Institut royal des sciences naturelles de Belgique.
- Popelka, P., Nagy, J., Pipová, M., Marcinčák, S., & Lenhardt, L. (2014). Comparison of chemical, microbiological and histological changes in fresh, frozen and double frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, 83(2), 157-161.
- Prabhakar, P. K., Vatsa, S., Srivastav, P. P., & Pathak, S. S. (2020). A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations. *Food research international*, 133, 109157.
- Rahman, M. M., Shibata, M., Nakazawa, N., Rithu, M. N. A., Nakauchi, S., Hagiwara, T., ... & Okazaki, E. (2022). Non-destructive Approach for the Prediction of pH in Frozen Fish Meat Using Fluorescence Fingerprints in Tandem with Chemometrics. *Fishes*, 7(6), 364.
- Reemtsma, T., Quintana, J. B., Rodil, R., Garcı, M., & Rodrı, I. (2008). Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air I. Occurrence and fate. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(9), 727-737.

- Richelmi, G. B., Pezzolato, M., Gili, S., Gallina, S., Decastelli, L., Tarasco, R., ... & Bozzetta, E. (2013). Pilot project to set up a control programme on fishery products. *Italian Journal of Food Safety*, 2(2), e25-e25.
- Robotti, E., Belay, M. H., Calà, E., Benedetto, A., Cerruti, S., Pezzolato, M., ... & Brizio, P. (2023). Identification of Illicit Conservation Treatments in Fresh Fish by Micro-Raman Spectroscopy and Chemometric Methods. *Foods*, 12(3), 449.
- Roiha, I. S., Tveit, G. M., Backi, C. J., Jónsson, Á., Karlsdóttir, M., & Lunestad, B. T. (2018). Effects of controlled thawing media temperatures on quality and safety of pre-rigor frozen Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Lwt*, 90, 138-144.
- Rome, L. C. (1998). 5.4 Matching muscle performance to changing demand. *Principles of animal design: the optimization and symmorphosis debate*, 103.
- Rome, L. C. (2006). Design and function of superfast muscles: new insights into the physiology of skeletal muscle. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 193-221.
- Romotowska, P. E., Gudjonsdottir, M., Karlsdóttir, M. G., Kristinsson, H. G., & Arason, S. (2017). Stability of frozen Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) as affected by temperature abuse during transportation. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 275-282.
- Saito, K., Ahhmed, A., Takeda, H., Kawahara, S., Irie, M., & Muguruma, M. (2007). Effects of a humidity-stabilizing sheet on the color and K value of beef stored at cold temperatures. *Meat science*, 75(2), 265-272.
- Sängler, A. M., & Stoiber, W. (2001). Muscle fiber diversity and plasticity. In *Fish physiology* (Vol. 18, pp. 187-250). Academic Press.
- Săvescu, N., Predoi, G., Cornilă, N., Belu, C., & Georgescu, B. (2011). Histological aspects regarding the muscular tissue harvested from some marine fish preserved by refrigeration. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 68(1).
- Seet, S. T., Heil, J. R., Leonard, S. J., & Brown, W. D. (1983). High vacuum flame sterilization of canned diced tuna: preliminary process development and quality evaluation. *Journal of Food Science*, 48(2), 364-369.
- Shenouda, S. Y. (1980). Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. In *Advances in food research* (Vol. 26, pp. 275-311). Academic Press.
- Shimomura, H., Takahashi, T., Morishita, T., & Ueno, R. (1987). Investigation of the differentiation of frozen-thawed fish from unfrozen fish by comparison of lysosomal enzyme activity. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*, 53(10).
- Sikorski Z.E., Scott D.N., & Buisson D.H., (1984). The role of collagen in the quality and processing of fish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 20, 301-343.
- Sikorski, Z. E., Olley, J., Kostuch, S., & Olcott, H. S. (1976). Protein changes in frozen fish. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 8(1), 97-129.
- Silva, A., Carrera, P., Massé, J., Uriarte, A., Santos, M. B., Oliveira, P. B., ... & Stratoudakis, Y. (2008). Geographic variability of sardine growth across the northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea. *Fisheries Research*, 90(1-3), 56-69.
- Silva, A., Santos, M. B., Caneco, B., Pestana, G., Porteiro, C., Carrera, P., & Stratoudakis, Y. (2006). Temporal and geographic variability of sardine maturity at length in the

- northeastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*, 63(4), 663-676.
- Sinovčić, G. (1986). Estimation of growth, mortality, production and stock size of sardine, *Sardina pilchardus* (Walb.) from the Middle Adriatic. *Acta Adriatica*, 27(1/2), 67-74.
  - Solovyev, M., & Gisbert, E. (2016). Influence of time, storage temperature and freeze/thaw cycles on the activity of digestive enzymes from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish physiology and biochemistry*, 42, 1383-1394.
  - Sørensen, K. M., Aru, V., Khakimov, B., Aunskjær, U., & Engelsen, S. B. (2018). Biogenic amines: a key freshness parameter of animal protein products in the coming circular economy. *Current opinion in food science*, 22, 167-173.
  - Soto, D., & Wurmman, C. (2019). Offshore aquaculture: a needed new frontier for farmed fish at sea. In *The future of ocean governance and capacity development* (pp. 379-384). Brill Nijhoff.
  - Strateva, M., & Penchev, G. (2020). Histological, physicochemical and microbiological changes in fresh and frozen/thawed fish. *Trakia Journal of Sciences*, 18(1), 69.
  - Strateva, M., Penchev, G., & Stratev, D. (2021). Histological, physicochemical and microbiological changes in the carp (*Cyprinus carpio*) muscles after freezing. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 30(3), 324-338.
  - Sulekha, B. T., & Mercy, T. A. (2022). Sublethal Effects of Monocrotophos on Histological Architecture of Liver and Kidney of a Freshwater Fish, *Anabas testudineus*. *Ecol. Environ. Conserv.*, 28(3), 1216-1225.
  - Sultana, A., Nakanishi, A., Roy, B. C., Mizunoya, W., Tatsumi, R., Ito, T., ... & Ikeuchi, Y. (2008). Quality improvement of frozen and chilled beef biceps femoris with the application of salt-bicarbonate solution. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(6), 903-911.
  - Tatontos, S. J., Harikedua, S. D., Mongi, E. L., Wonggo, D., Montolalu, L. A., Makapedua, D. M., & Dotulong, V. (2019). Efek pembekuan-pelelehan berulang terhadap mutu sensori ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis* L). *Media Teknologi Hasil Perikanan*, 7(2), 32-35.
  - Tavares, J., Martins, A., Fidalgo, L. G., Lima, V., Amaral, R. A., Pinto, C. A., ... & Saraiva, J. A. (2021). Fresh fish degradation and advances in preservation using physical emerging technologies. *Foods*, 10(4), 780.
  - Teixeira, J. (1965). Un système simple d'entreposage et conservation du poisson par congélation ou réfrigération: New Techniques to Extend Fish Preservative Periods in the Holds of Fishing Boats.
  - Tinacci, L., Armani, A., Guidi, A., Nucera, D., Shvartzman, D., Miragliotta, V., ... & Abramo, F. (2018). Histological discrimination of fresh and frozen/thawed fish meat: European hake (*Merluccius merluccius*) as a possible model for white meat fish species. *Food Control*, 92, 154-161.
  - Topić Popović, N., Benussi Skukan, A., Džidara, P., Čož-Rakovac, R., Strunjak-Perović, I., Kozačinski, L., ... & Brlek-Gorski, D. (2010). Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia.
  - Truonghuynh, H. T., Li, B., Zhu, H., Guo, Q., & Li, S. (2020). Freezing methods affect the characteristics of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*): use of cryogenic freezing for long-term storage. *Food Science and Technology*, 40, 429-435.

- Uddin, M. (2009). Differentiation of Fresh and Frozen–Thawed Fish. In Handbook of seafood and seafood products analysis (pp. 753-768). CRC Press.
- Uddin, M., Okazaki, E., Turza, S., Yumiko, Y., Tanaka, M., & Fukuda, Y. (2005). Non-destructive visible/NIR spectroscopy for differentiation of fresh and frozen-thawed fish. *Journal of Food Science*, 70(8), c506-c510.
- Upton, H. F. (2015). Seafood fraud. Congressional Research Service.
- Valls, J., Paredes, A., González, D., & González, A. (2004). Evaluación física, química, microbiológica y sensorial de filetes de sardina (*Sardinella aurita* V.) empacados al vacío y congelados a-18° C. *Revista científica*, 14(2), 0.
- Van Nguyen, M. (2018). Influences of bleeding conditions on the quality and lipid degradation of cobia (*Rachycentron canadum*) fillets during frozen storage. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(2), 289-300.
- Vázquez-Sánchez, D., García, E. E. S., Galvão, J. A., & Oetterer, M. (2020). Quality index method (QIM) scheme developed for whole Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) ice stored under refrigeration and correlation with physicochemical and microbiological quality parameters. *Journal of aquatic food product technology*, 29(3), 307-319.
- Venugopal, V. (2006). Quick freezing and individually quick frozen products. In: Venugopal (Ed.) *Seafood processing*. (pp.446) Taylor and Francis, CRC Press, New York. (Chapter 4; pp 95-140)
- Vilkova, D., Kondratenko, E., Chèné, C., & Karoui, R. (2022). Effect of multiple freeze–thaw cycles on the quality of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) determined by traditional and emerging techniques. *European Food Research and Technology*, 1-13.
- Voulgaridou, P., & Stergiou, K. I. (2003). Trends in various biological parameters of the European sardine, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), in the Eastern Mediterranean Sea. *Scientia marina*, 67(S1), 269-280.
- Walbaum, J. J. (1792). *Petri Arredi sueci genera piscium. quibus systema totum ichthyologiae proponitur cum classibus, ordinibus, generum characteribus, specierum differentiis, observationibus plurimis.*
- Wei, Q. K., Hwang, S. L., & Chen, T. R. (2006). Microbiological quality of ready-to-eat food products in southern Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(1), 17.
- Xu YongXia, X. Y., Liu Ying, L. Y., Zhang ChaoMin, Z. C., Li XuePeng, L. X., Yi ShuMin, Y. S., & Li JianRong, L. J. (2015). Physicochemical responses and quality changes of turbot (*Psetta maxima*) during refrigerated storage.
- Žák, J., Dyková, I., Blažek, R., & Reichard, M. (2022). Good Practices for Histological Analysis of the Annual Killifish *Nothobranchius furzeri* (Nothobranchiidae). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2022(11), pdb-prot107739.
- Zhu, M. M., Peng, Z. Y., Lu, S., He, H. J., Kang, Z. L., Ma, H. J., ... & Wang, Z. R. (2019). Physicochemical properties and protein denaturation of pork longissimus dorsi muscle subjected to six microwave-based thawing methods. *Foods*, 9(1), 26.

- Zhu, S., Bail, A. L., & Ramaswamy, H. S. (2003). Ice crystal formation in pressure shift freezing of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as compared to classical freezing methods. *Journal of food processing and preservation*, 27(6), 427-444.
- Zhu, S., Ramaswamy, H. S., & Simpson, B. K. (2004). Effect of high-pressure versus conventional thawing on color, drip loss and texture of Atlantic salmon frozen by different methods. *LWT-Food Science and Technology*, 37(3), 291-299.
- Zuanazzi, J. S. G., Goes, E. S. D. R., Almeida, F. L. A. D., Goes, M. D., Lara, J. A. F. D., & Ribeiro, R. P. (2019). Effects of freezing and thawing cycles on the quality of Nile tilapia fillets. *Food Science and Technology*, 40, 300-304.

**PUBLICATION**



## Effect of freeze–thaw cycles on the physicochemical, water–holding properties, and histology of *Sardinella aurita*

### Efecto de los ciclos de congelación y descongelación en las propiedades fisicoquímicas, capacidad de retención de agua y la histología de *Sardinella aurita*

Mounia Megaache , Omar Bennoune\* 

University of Batna 1, Institute of Veterinary and Agricultural Sciences, Department of Veterinary Sciences, Laboratory of Health, Animal Production and Environment. Batna, Algeria.

\*Corresponding author: [omar.bennoune@univ-batna.dz](mailto:omar.bennoune@univ-batna.dz)

#### ABSTRACT

This study investigates the impact of freeze–thaw cycles on samples of *Sardinella aurita*, focusing on the examination of physicochemical properties, water–holding capacity, color changes, and histological alterations in fish meat. The present findings indicate significant variations in the studied parameters, i.e., pH, water activity, lightness (L\*), redness (a\*), yellowness (b\*), protein solubility (mg·g<sup>-1</sup>), moisture content (%), thawing loss (%), centrifugation loss (%), cooking loss (%), underscoring the importance of comprehending the consequences of freezing–thawing in the fishing and food processing industry. Initially, a statistically significant decrease in pH levels was observed (T0: 6.23 ± 0.1, T4: 6.19 ± 0.1), followed by a notable increase after the fifth freeze–thaw cycle (T5: 6.47 ± 0.1), possibly due to chemical and microbiological composition shifts. Water activity exhibited a gradual decrease (T0: 0.911 ± 0.009, T4: 0.899 ± 0.01), likely attributed to water loss during freezing–thawing (P < 0.05). Colorimetry results demonstrated a significant decrease in brightness (L\*) and a slight increase in yellow hue (b\*) throughout the cycles, with values ranging from 63.51 (T0) to 33.64 (T5) for L\* and from 26.74 (T0) to 17.28 (T5) for b\*. These variations highlight notable and significant changes in the product's color over the freeze–thaw cycles (P < 0.05). Histological analysis revealed structural changes, including muscle fiber dehydration. These observed changes hold implications for product quality and consumer perception. It is essential to recognize that various factors, such as fish size, seasonality, and environmental conditions influence these results. Further research is needed to delve deeper into these aspects. In essence, this study offers valuable insights for industry professionals, aiding them in making informed decisions regarding seafood products subjected to freezing–thawing cycles. This not only ensures product quality and safety but also helps prevent food fraud and provides consumers with high–quality products.

**Key words:** *Sardinella aurita*; histological changes; freeze–thaw cycles; water–holding

#### RESUMEN

Este estudio investiga el impacto de los ciclos de congelación y descongelación en muestras de *Sardinella aurita*, centrándose en el examen de propiedades fisicoquímicas, capacidad de retención de agua, cambios de color y alteraciones histológicas en la carne del pescado. Los hallazgos actuales indican variaciones significativas en estos parámetros [pH, actividad de agua, luminosidad (L\*), rojez (a\*), amarillez (b\*), solubilidad de proteínas (mg·g<sup>-1</sup>), contenido de humedad (%), pérdida de descongelación (%), pérdida por centrifugación (%), pérdida de cocción (%)]. Los resultados revelan alteraciones significativas en estos parámetros, destacando la importancia de comprender los efectos de la congelación y descongelación en la calidad del pescado dentro de la industria pesquera y de procesamiento de alimentos. Inicialmente, se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de pH (T0: 6.23 ± 0.1, T4: 6.19 ± 0.1), seguida de un aumento notable después del quinto ciclo (T5: 6.47 ± 0.1), posiblemente debido a cambios en la composición química y microbiológica. La actividad del agua mostró una disminución gradual, probablemente atribuida a la pérdida de agua durante la congelación y descongelación (P < 0,05). Los resultados de la colorimetría mostraron una disminución significativa en la luminosidad (L\*) y un ligero aumento en el tono amarillo (b\*) a lo largo de los ciclos, con valores que van desde 63.51 (T0) hasta 33.64 (T5) para L\* y desde 26.74 (T0) hasta 17.28 (T5) para b\*. Estas variaciones resaltan cambios notables y significativos en el color del producto a lo largo de los ciclos de congelación y descongelación (P < 0,05). Estos cambios observados tienen implicaciones en la calidad del producto y la percepción del consumidor. Es importante reconocer que estos resultados están influenciados por diversos factores, como el tamaño del pescado, la estacionalidad y las condiciones ambientales. Se necesita investigación adicional para profundizar en estos aspectos. En resumen, este estudio proporciona información valiosa para los profesionales de la industria, ayudándolos a tomar decisiones informadas sobre productos de mar sometidos a ciclos de congelación y descongelación. Esto no solo garantiza la calidad y seguridad del producto, sino que también ayuda a prevenir el fraude alimentario y proporciona a los consumidores productos de alta calidad.

**Palabras clave:** *Sardinella aurita*; cambios histológicos; ciclos de congelación y descongelación; retención de agua



## INTRODUCTION

Consumer interests related to food safety and quality are paramount when selecting fish for purchase, and this holds true on a global scale [1, 2]. Consumers are increasingly vigilant when choosing fish, driven by concerns that the fish they buy may have undergone alterations. These alterations may involve opting for thawed fish rather than fresh ones [2, 3]. After death, fish undergo significant chemical and bacterial changes that render them more suitable for consumption, as highlighted in a study [4]. Furthermore, assessing the quality of frozen fish takes into account the condition of the fish before the freezing process [5, 6]. Certain fish species have a limited shelf life due to their low protein, fat, and moisture levels, as well as the presence of microorganisms [4, 7]. The shelf life of such fish has been extended through the development of methods for freezing perishable raw materials, enabling long-term storage. Freezing is one of the most common processes employed in the food industry today to preserve the quality of meat and other food products over time [8]. It leads to the deceleration of many biochemical reactions, resulting in alterations in food quality. Additionally, freezing reduces water activity, a critical aspect of the freezing process that inhibits microbial growth [9]. It also induces changes in muscle structure, impacting the overall sensory quality of fishery products [10, 11].

In 2018, it was reported that ice crystals formed in muscles during freezing cause irreversible structural damage to muscle fibers and myofibrils [12]. This damage is attributed to changes in muscle morphology and size due to the formation of ice crystals, which occur at varying rates depending on the freezing speed of the meat [13]. Freezing meat can impair its quality by denaturing proteins and aggregating them into larger masses. Both [14] and [15] found that this deterioration in quality persists even after thawing. This persistence is attributed to the formation of ice crystals during the freezing process, which can damage the structure of proteins, leading to their denaturation. Protein denaturation, in turn, alters their functional properties, affecting their ability to bind water, solubility, and three-dimensional structure. Notably, the influence of protein denaturation on the texture, flavor, and juiciness of meat persists even after the fish has been thawed. When assessing fish meat quality, it is essential to consider its fat content. When discussing the fat content of food, reference is made to the quantity of healthy fats it contains, a factor proven to benefit human health [16]. Fish meat loses quality when it oxidizes or is frozen and stored for extended periods [17]. The rate of meat spoilage is contingent on the release of fatty acids without interference from lipases responsible for breaking down fish proteins. [17] and [3] corroborated this fact. Moreover, the water content of meat affects its taste and texture after defrosting or refreezing. Freezing fish muscles alters their structure and composition, as indicated by histological analysis and chemical assessments.

By collecting data related to these aspects, the current study aims to demonstrate the effect of freezing on the muscles of *Sardinella aurita*. This introduction provides an overview of the primary factors that have led to the undertaking of this study on the impact of freezing on the quality of fish products in Algeria. It underscores the growing importance of food safety and product quality for consumers, as well as the challenges associated with preserving the freshness of fish products in a context where freezing has become commonplace.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

Histological evaluation was carried out on a total of 30 fresh samples of *Sardinella aurita*, obtained from El-Kala fishing port, Algeria, with a weight of about 111.25 g and a length of 25 cm and brought refrigerated to the Laboratory of Histology and Histopathology of the University of Batna 1 within 12 hours of being caught. All samples were individually wrapped in polyethylene bags and randomly divided into 6 groups; the first group with zero freeze-thaw cycle (T0 (fresh)), while the samples of the other five groups were subjected to freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  for different days (d) (4 d, 7 d, 11 d, 15 d, and 20 d) separated by thawing at  $4^{\circ}\text{C}$  for 12 hours to obtain samples with different freeze-thaw cycles, i.e., T1 (one freeze-thaw cycle), T2 (two freeze-thaw cycles), T3 (three freeze-thaw cycles), T4 (four freeze-thaw cycles), T5 (five freeze-thaw cycles). The microstructure of meat tissues was observed after thawing.

### Physicochemical properties

#### • pH measurement

The pH values were measured according to the technique described by Li et al. [18] and the samples were prepared by mixing 10 g of fish with 90 mL distilled water. The pH values were measured using an inoLab® digital pH meter (Xylem Analytics, WTW, Weilheim, Germany).

#### • Water activity (Aw)

Water activity (Aw) was measured with a Hygroscope Rotronic model BT-RS1.

#### • Color

A colorimeter (Konica Minolta CR-10, Japan) was used to evaluate the color changes due to freeze-thaw cycles. To ensure a comprehensive representation, as reported by Ali et al. [19], measurements included brightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ), and yellowness ( $b^*$ ) and they were recorded at three distinct locations on the surface of each of the six fish samples.

#### • Protein solubility

One gram of fish sample underwent homogenization using a Wiggins D-500 homogenizer (Straubenhardt, Germany) and treated as described by Choi et al. [20]. The homogenized sample was then mixed with 20 mL of ice-cold KI/potassium phosphate and left at a temperature of  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. Afterward, the mixture underwent centrifugation (B. Braun Sigma 2K15 Centrifuge, Germany) (2,000 G) at  $4^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Following this, a combination of 2 mL of the supernatant and 8 mL of a biuret solution was prepared and added. The absorbance of this solution was subsequently measured at a wavelength of 540 nm with a spectrophotometer (Shimadzu UV 120-01, Japan).

### Water holding capacity

#### • Moisture content (%)

The water content of various commodities was largely assessed through oven drying method, and represent the difference between the initial weight of samples (10 g) and their subsequent weight after oven drying at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 d as reported by Avinee et al. [21].

To assess how well samples retain water, we measured thawing loss, centrifugation loss, and cooking loss, with some minor changes to the methods reported by Zhu et al. [22]. Specifically, we modified the assessment of centrifugation loss by using 2 g samples instead of the 10 g mentioned by Zhu et al. [22]. Additionally, in the evaluation of cooking loss, we standardized the sample weight to 5 g.

#### • Thawing loss (%)

After the meat had thawed, the liquid in the package was poured out, and the samples of meat were wiped down with paper towels and weighed again. The freezing loss was measured as a percentage of the difference between the amount of weight lost before and after freezing.

#### • Centrifugation loss (%)

Two grams of fish samples, enclosed in filter paper, were loaded into a centrifuge tube and subjected to centrifugation at 210 G at 4°C for 10 min. The weight difference between the samples before and after centrifugation was used to calculate the centrifugation loss.

#### • Cooking loss (%)

To figure out how much food was lost during cooking, 5 g of samples were measured, wrapped in heat-resistant foil paper, and put in a water bath at 80°C for 30 min. The internal temperature was not measured, but based on an earlier study [23], it was estimated that it would take 30 min to reach the best internal temperature of 75 to 80°C. Samples are left out to dry and then weighed.

#### Histological and morphometric analysis

After preliminary microscopic examination of hematoxylin and eosin (H&E) stained sections, five hot spot areas of the samples were selected at low power magnification and measurements were made at 100X using a free software, ImageJ (version 1.52a). These measurements included average area of vacuoles, average area of myofibers containing vacuoles, and the ratio of total vacuole area to cell area were calculated to perform quantitative analysis of vacuoles with freeze-thaw cycles.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed on the observed values by the application of variance (ANOVA) using SPSS software version 26 (IBM SPSS Statistics v26). Comparison of means was performed using the Tukey method. The difference is considered statistically significant when  $P < 0.05$  and considered nonsignificant when  $P > 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Physicochemical properties

The freezing-thawing cycles appear to have an effect ( $P < 0.05$ ) on the pH of *Sardinella aurita* samples (TABLE I). After several cycles, the pH showed a downward trend, followed by a significant increase in the fifth cycle. This may indicate changes in the chemical or microbiological composition of the fish due to the repeated freezing-thawing process.

The elevation in volatile basic components is what causes the pH to increase during storage. The latter acknowledges earlier research presented [18, 24]. The development of ice crystals at -20°C may give rise to the release of intracellular components, resulting in the highest pH value observed in sample T5. Similar findings have been reported by other authors [24, 25, 26]. pH values of fish can be influenced by various factors, including species, size, season, water composition, during location, stress levels during fishing, and muscle type [18].

The water activity values indicate a gradual decrease in water availability in sardinella samples over the freezing-thawing cycles (T0:  $0.911 \pm 0.009$ , T4:  $0.899 \pm 0.01$ ), with some minor variations (TABLE I). This reduction may be attributed to water loss during the freezing-thawing process. Monitoring water activity is important as it can impact the microbiological stability and texture of food products. The variations in water activity are related to fluid migration and ice crystallization [27]. Significant differences ( $P < 0.001$ ) in water activity were observed in the abdominal and dorsal muscles of carp after freezing [1]. This study highlights a decrease in water activity after the first freezing, followed by an increase after the second freezing,

TABLE I  
Changes in physicochemical and water-holding properties of *Sardinella aurita* subjected to multiple freeze-thaw cycles

Traits	T0	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Physicochemical properties</b>						
pH	$6.23 \pm 0.10^a$	$6.17 \pm 0.08^a$	$6.20 \pm 0.10^a$	$6.15 \pm 0.10^a$	$6.19 \pm 0.10^a$	$6.47 \pm 0.10^b$
Water activity	$0.911 \pm 0.009^a$	$0.909 \pm 0.005^a$	$0.903 \pm 0.010^a$	$0.900 \pm 0.010^a$	$0.899 \pm 0.010^a$	$0.920 \pm 0.010^a$
L* value (lightness)	$63.51 \pm 11.01^c$	$58.77 \pm 11.18^{bc}$	$45.61 \pm 16.49^{abc}$	$42.48 \pm 38.53^{abc}$	$38.53 \pm 15.50^{ab}$	$33.64 \pm 15.63^c$
a* value (redness)	$-9.27 \pm 2.82^a$	$-8.17 \pm 2.82^{ab}$	$-7.90 \pm 2.70^{ab}$	$-6.80 \pm 2.37^{abc}$	$-5.80 \pm 2.76^{bc}$	$-5.05 \pm 2.56^c$
b* value (yellowness)	$26.74 \pm 3.06^c$	$25.48 \pm 3.06^{bc}$	$21.36 \pm 5.51^{abc}$	$20.00 \pm 5.48^{abc}$	$18.94 \pm 5.76^{ab}$	$17.28 \pm 5.87^a$
Protein solubility (mg/g)	$15.99 \pm 1.28^a$	$14.58 \pm 0.43^{ab}$	$13.64 \pm 0.84^b$	$12.7 \pm 1.25^{bc}$	$11.23 \pm 1.25^c$	$8.88 \pm 0.80^d$
<b>Water-holding properties</b>						
Moisture content (%)	$78.68 \pm 1.23^b$	$78.10 \pm 1.97^b$	$76.90 \pm 1.97^b$	$74.70 \pm 0.60^a$	$74.08 \pm 1.28^a$	$73.18 \pm 1.34^a$
Thawing loss (%)		$0.78 \pm 0.27^a$	$1.35 \pm 0.49^{bc}$	$1.54 \pm 0.69^{bc}$	$2.12 \pm 0.67^{cd}$	$3.28 \pm 1.04^d$
Centrifugation loss (%)	$8.64 \pm 0.70^a$	$10.20 \pm 3.09^a$	$15.84 \pm 1.87^b$	$17.98 \pm 1.59^{bc}$	$19.68 \pm 1.77^{bc}$	$20.00 \pm 1.58^c$
Cooking loss (%)	$13.72 \pm 2.30^a$	$15.28 \pm 0.40^{ab}$	$19.00 \pm 20.4^{bc}$	$20.40 \pm 1.70^c$	$21.20 \pm 1.30^c$	$22.22 \pm 1.69^c$

Note: T0: fresh meat; T1: one freeze-thaw cycle; T2: two freeze-thaw cycles; T3: three freeze-thaw cycles; T4: four freeze-thaw cycles; T5: five freeze-thaw cycles. Data are given as mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 5$ ). Means within a row with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

regardless of the muscle type (dorsal or ventral). In contrast, our own results demonstrate a decrease in water activity over the first four cycles of freezing–thawing, followed by an increase in the fifth cycle. These variations could be attributed to specificities related to the types of fish studied and experimental conditions.

The colorimetry results reveal that sardinella samples subjected to freezing–thawing cycles undergo significant color changes (TABLE I). Brightness progressively decreases, indicating a darkening of the samples. The values of the (a\*) component (redness) show significant variations, indicating a gradual decrease from T0 to T5, while the yellow hue (b\*) slightly increases. Uncertainty varies among samples, which may reflect measurement variability. These color changes can have significant implications for the quality and perception of the final product.

Proteins in sardinellas exhibit a gradual decrease in solubility following freezing–thaw cycles (TABLE I). This reduction in solubility is likely due to the effect of freezing and thawing on the protein's structure. The decrease in protein solubility may potentially affect the texture and quality of the final product. In a study conducted by Careche and his team [28] significant drops in the solubility of soluble proteins were observed in cod filets at both  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-30^{\circ}\text{C}$ , with a more pronounced decrease at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Water-holding capacity

The results show variability in the moisture content of sardinella samples subjected to freezing–thawing cycles. Initially, at T0 (fresh fish), the average moisture content was 78.68%, indicating a substantial presence of water in the samples. However, after the first two cycles (T1 and T2), while the moisture content remained relatively high, a slight non-significant reduction was observed compared to T0. The significant variation occurred from the third cycle (T3) onwards, where the moisture content started to decrease significantly, reaching 74.7% at T3 and 74.08% at T4. This downward trend continued with the fifth cycle (T5), where the moisture content reached 73.18%. (TABLE I). These variations may be influenced by freezing, thawing, and storage processes, as well as other environmental factors. According to other studies [29], the inability of muscle fibers to absorb water during thawing is the reason for the loss of water content after freezing. The melting of ice crystals positioned between muscle fibers is thought to be the source of this water. The effect of freeze–thaw cycles on *Sardinella aurita* water content is substantial ( $P < 0.05$ ).

The thawing loss, measured in percentage, progressively increases as the samples undergo more freezing–thawing cycles (TABLE I). At T1, the thawing loss is 0.78% with an uncertainty of  $\pm 0.27\%$ . This loss increases at T2, T3, T4, and reaches 3.28% at T5. This trend indicates that the samples lose water during the thawing process.

The centrifugation loss, also measured in percentage, significantly increases as the samples undergo freezing–thawing cycles (TABLE I). At T0, the centrifugation loss is 8.64% with an uncertainty of  $\pm 0.7\%$ . This loss increases at T1, T2, T3, T4, reaching 20% at T5. This trend indicates that the samples have progressively more difficulty retaining water during the process.

The cooking loss, also measured in percentage, significantly increases with freezing–thawing cycles (TABLE I). At T0, the cooking loss is 13.72% with an uncertainty of  $\pm 2.3\%$ . This loss increases at T1, T2, T3, T4, reaching 22.22% at T5. This trend indicates that the samples lose a significant amount of water during cooking, which can affect the quality of the product.

#### Histological analysis

Central and peripheral muscle fibers remained unchanged. No muscle bundles or muscle fibers appeared partially or completely fragmented (FIG. 1a). Instead, cross-sliced muscle fibers appeared polygonal in shape. Lyu et al. [30] found that fish muscle fibers in bundles have a polygonal shape and appear uniform when non-frozen. Strateva [1] noted that the carp muscle fibers lack torn bits when positioned uniformly. Dehydrated muscle fibers were observed with reduced morphological changes. Discarded muscle fibers with complete disruption of shape were also observed. Contracted muscle fibers were observed to be more abundant than fibers that maintained their integrity or completely disrupted in shape (FIG. 1b) When ice crystals form in the outside space, new osmotic pressure variations arise. Dehydration of muscle fibers can be seen via visual observation of reduced muscle volume. Strateva [1] determined that muscle fibers diminish in size due to osmotic processes and ice in the extracellular spaces. As a result of both of these impacts, a perpetual stream of water moves from the most internal region of muscle fibers to the outermost perimeters. Interstitial protein material in the form of a distinct basophilic granular substance is evident between muscle fibers (FIGS. 1c, 1d, 1e, 1f). A similar substance has been found in Carp and Merluccius fish [1, 31]. This protein-based substance is found in the intercellular space of these fish. Deformed muscle tissue merged into one figure as it was severely dehydrated and degenerated. This appeared to be the result of losing the ability to contact, which caused

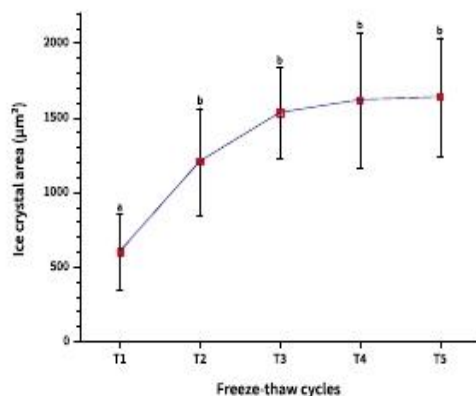


**FIGURE 1.** Muscle histology of *Sardinella aurita* subjected to different freeze–thaw cycles. (H&E, 100 $\times$ ). a: T0(fresh meat); b: T1(one freeze–thaw cycle); c: T2(two freeze–thaw cycles); d: T3(three freeze–thaw cycles); e: T4(four freeze–thaw cycles); f: T5(five freeze–thaw cycles). 1. perimysium internum; 2. skeletal muscle fibers with normal histostructure; 3. shrunken skeletal muscle fibers; 4. completely destructed skeletal muscle fibers; 5. skeletal muscle fibers with broken central and retained peripheral part; 6. interstitial protein material; 7. vacuoles; 8. Endomysium

the tissue to appear stiff (FIG. 1c). The size of cracks in the frozen material made it unlikely that crack patterns lined up with muscle fibers and bunched muscles. Kiani and Sun [9] found that large frozen crystals produced larger cracks. Additionally, the protein and vacuoles between the muscle fibers blurred their edges and contours. Freezing and thawing processes reduced significantly the amount of skeletal muscle tissue. Furthermore, the size and number of open spaces increased dramatically filling more areas (FIG. 1d, 1e, 1f)

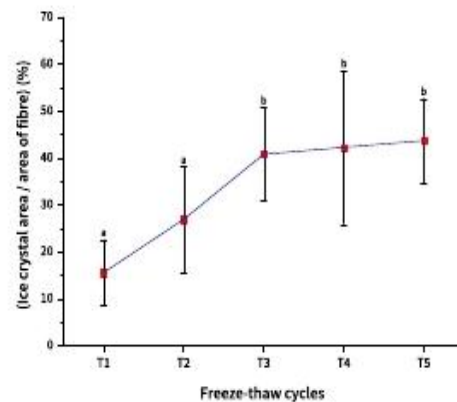
### Histomorphometric analysis

Quantitative analysis of ice crystal sizes (FIG. 2) and volumes was performed by calculating the ratio of the size or volume of a fish's ice crystals to the fish's cell surface area (FIG. 3). However, this was difficult for one part of the analysis; since some fish were thawed and some fibers were disrupted (T4 and T5). Calculating fish cell surface areas showed to be much easier than calculating ice crystal surface areas. Although there was significant difference ( $P < 0.05$ ) between first (603,63  $\mu\text{m}^2$ ) and fifth cycles (3954,18  $\mu\text{m}^2$ ), the trend remained the same a significant increase in cell area with the first cycle followed



**FIGURE 2.** Mean area of ice crystals to different freeze-thaw cycles. T1: one freeze-thaw cycle; T2: two freeze-thaw cycles; T3: three freeze-thaw cycles, T4: four freeze-thaw cycles, T5: five freeze-thaw cycles. Different letters show a statistically significant difference ( $P < 0.05$ )

by a larger increase in cell area with subsequent cycles. Furthermore, all samples demonstrated the same trend. When ice is stored frozen, its volume and size recrystallize. This process was well explained by Jiang et al. [32], during subsequent storage, small ice crystals will melt and grow into larger ones. This causes light melting of large crystals that can then grow again [33]. Ice damage to muscle fibers causes increased extracellular migration of water and thawing losses. Jiang et al. [32] stated that this led to increased protein denaturation when ice crystals form. Also, increased solute in the remaining water leads to further protein destruction, according to Kaale et al. [34].



**FIGURE 3.** Ratio of the ice crystal surface to the cell surface. T1: one freeze-thaw cycle; T2: two freeze-thaw cycles; T3: three freeze-thaw cycles, T4: four freeze-thaw cycles, T5: five freeze-thaw cycles. Different letters show a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ).

### CONCLUSIONS

To summarize, this extensive investigation into the impact of freeze-thaw cycles on *Sardinella aurita* samples has uncovered noteworthy alterations in physicochemical characteristics, water retention, color, and histological structure of the fish. These findings emphasize the significance of comprehending how freezing-thawing affects fish quality, especially within the context of the fishing and food processing industry, with a view to thwarting food fraud. pH measurements indicate changes in pH after multiple cycles. Initially, a downward trend was observed, followed by a significant increase in the fifth cycle. Additionally, water activity values show a gradual decrease in water availability in sardine samples over the freezing-thawing cycles, with some minor variations. Furthermore, there is a color changes, that are not noticeable to most consumers. Additionally, histological changes such as muscle fiber desiccation can exert an influence on the fish's texture. It is important to acknowledge that these results may be influenced by various factors, such as the size of the fish, seasonal fluctuations, and environmental conditions. As a result, further investigations could explore these aspects to gain a more profound understanding of the underlying mechanisms. In essence, this study offers valuable insights for professionals in the fishing and food processing sector, enabling them to make informed decisions regarding the management of seafood products subjected to freezing-thawing cycles. Such measures not only assure product quality and food safety but also serve as a deterrent against food fraud for the benefit of consumers.

### Conflict of interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] Strateva M, Penchev G, Stratev D. Histological, Physicochemical and Microbiological Changes in the Carp (*Cyprinus carpio*) Muscles after Freezing. J. Aquat. Food Prod. Technol. [Internet]. 2021; 30(3):323-337. doi: <https://doi.org/mpdj>

- [2] Ottavian M, Fasolato L, Facco P, Barolo M. Foodstuff authentication from spectral data: Toward a species-independent discrimination between fresh and frozen - thawed fish samples. *J. Food. Eng.* [Internet]. 2013; 119(4):765-775. doi: <https://doi.org/f5bjmc>
- [3] Prabhakar PK, Vatsa S, Srivastav PP, Pathak SS. A Comprehensive Review on Freshness of Fish and Assessment: Analytical Methods and Recent Innovations. *Food Res. Int.* [Internet]. 2020; 133:109157. doi: <https://doi.org/mpdk>
- [4] Bao Y, Wang K, Yang H, Regenstern JM, Ertbjerg P, Zhou P. Protein degradation of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) muscle during cold storage. *Food Chem.* [Internet]. 2019; 308:125576. doi: <https://doi.org/grtr4h>
- [5] Moriya K, Nakazawa N, Osako K, Okazaki E. Effect of subzero temperature treatment at -2°C before thawing on prevention of thaw rigor, biochemical changes and rate of ATP consumption in frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*). *LWT - Food Sci. Technol.* [Internet]. 2019; 114:108396. doi: <https://doi.org/gkdzbd>
- [6] Calanche J, Tomas A, Martinez S, Jover M, Alonso V, Roncalés P, Beltrán JA. Relation of quality and sensory perception with changes in free amino acids of thawed seabream (*Sparus aurata*). *Food Res. Intern.* [Internet]. 2019; 119:126-134. doi: <https://doi.org/mpfm>
- [7] Jiang Q, Nakazawa N, Hu Y, Osako K, Okazaki E. Microstructural modification and its effect on the quality attributes of frozen-thawed bigeye tuna (*Thunnus obesus*) meat during salting. *LWT - Food Sci. Technol.* [Internet]. 2019; 100:213-219. <https://doi.org/gkzxcf>
- [8] Anese M, Manzocco L, Panozzo A, Beraldo P, Foschia M, Nicoli MC. Effect of radiofrequency assisted freezing on meat microstructure and quality. *Food Res. Int.* [Internet]. 2012; 46(1):50-54. doi: <https://doi.org/fxqxc6>
- [9] Kiani H, Sun D. Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. *Trends Food Sci. Technol.* [Internet]. 2011; 22(8):407-426. doi: <https://doi.org/dq5rfg>
- [10] Zhu S, Ramaswamy HS, Simpson BK. Effect of high-pressure versus conventional thawing on color, drip loss and texture of Atlantic salmon frozen by different methods. *LWT - Food Sci. Technol.* [Internet]. 2004; 37:291-299. <https://doi.org/bmhxbx>
- [11] Gökoğlu N, Yerlikaya P. Freezing technology. In: Gökoğlu N, Yerlikaya P, editors. *Seafood chilling, refrigeration and freezing: Science and Technology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: Wiley & Sons; 2015. p. 163-185. doi: <https://doi.org/mpg9>
- [12] Zhang B, Cao H, Lin H, Deng S, Wu H. Insights into ice-growth inhibition by trehalose and alginate oligosaccharides in peeled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage. *Food Chem.* [Internet]. 2019; 278:482-490. doi: <https://doi.org/mphb>
- [13] Venugopal V, editor. *Seafood Processing: Adding Value Through Quick Freezing, Retortable Packaging and Cook-Chilling* [Internet]. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2005. 504 p. doi: <https://doi.org/bb9fh9>
- [14] Karami B, Moradi Y, Motalebi AA, Khajehrahimi AE. Effect of different freezing processes on the quality and histological changes of red tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Tilapia mosambicus*). *J. Fish Aquat. Sci.* [Internet]. 2018; 13(2):82-88. doi: <https://doi.org/mphh>
- [15] Lu X, Zhang Y, Xu B, Zhu L, Luo X. Protein degradation and structure changes of beef muscle during superchilled storage. *Meat Sci.* [Internet]. 2020; 168:108180. doi: <https://doi.org/mphi>
- [16] Ramalhosa MJ, Paiga P, Morais S, Alves MR, Delerue-Matos C, Oliveira MB. Lipid content of frozen fish: Comparison of different extraction methods and variability during freezing storage. *Food Chem.* [Internet]. 2012; 131(1):328-336. doi: <https://doi.org/c3ksq3>
- [17] Trigo M, Rodriguez A, Dovale G, Pastén A, Vega-Gálvez A, Aubourg SP. The effect of glazing based on saponin-free quinoa (*Chenopodium quinoa*) extract on the lipid quality of frozen fatty fish. *LWT - Food Sci. Technol.* [Internet]. 2018. 98:231-236. doi: <https://doi.org/gfm86b>
- [18] Li T, Li J, Hu W, Li X. Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chem.* [Internet]. 2013; 138(2-3):821-826. doi: <https://doi.org/f49jj4>
- [19] Ali S, Zhang W, Rajput N, Ammar M, Li C, Zhou G. Effect of multiple freeze - thaw cycles on the quality of chicken breast meat. *Food Chem.* [Internet]. 2015; 173:808-814. doi: <https://doi.org/j725>
- [20] Choi EJ, Park HW, Chung YB, Park SH, Kim JS, Chun HH. Effect of tempering methods on quality changes of pork loin frozen by cryogenic immersion. *Meat Sci.* [Internet]. 2017; 124:69-76. doi: <https://doi.org/gppq4h>
- [21] Avinee G, Charfi S, Stocker N, Gyde E, Hebert A, Mabilie MP, Sevestre H, Chatelain D. [Pathological analysis, an original way to study foodstuffs]. *Ann. Pathol.* [Internet]. 2010; 30:344-349. French. doi: <https://doi.org/dch6zm>
- [22] Zhu, MM, Peng, ZY, Lu, S, He, HJ, Kang, ZL, Ma, HJ, Wang, ZR. Physicochemical properties and protein denaturation of pork *Longissimus dorsi* muscle subjected to six microwave based thawing methods. *Foods.* [Internet]. 2020; 9(1):26. doi: <https://doi.org/j73j>
- [23] Sultana A, Nakanishi A, Roy BC, Mizunoya W, Tatsumi R, Ito T. Quality Improvement of Frozen and Chilled Beef biceps femoris with the Application of Salt-bicarbonate Solution. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* [Internet]. 2008; 21(6):903-911. doi: <https://doi.org/mphm>
- [24] Cai L, Wu X, Li X, Zhong K, Li Y, Li J. Effects of different freezing treatments on physicochemical responses and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fillets during refrigerated storage. *LWT - Food Sci. Technol.* [Internet]. 2014; 59(1):122-129. doi: <https://doi.org/mphn>
- [25] Jain D, Pathare PB, Manikantan MR. Evaluation of texture parameters of Rohu fish (*Labeo rohita*) during iced storage. [Internet]. 2007; 8(2):336-340. doi: <https://doi.org/b5pndc>
- [26] Emire SA, Gebremariam MM. Influence of frozen period on the proximate composition and microbiological quality of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *J. Food Process. Preserv.* [Internet]. 2010; 34(4):743-757. doi: <https://doi.org/fn5kzr>
- [27] He Q, Yang Z, Gong B, Wang J, Xiao K, Yang S. Quality Evaluation Focusing on Tissue Fractal Dimension and Chemical Changes for Frozen Tilapia with Treatment by Tangerine Peel Extract. *Sci. Rep.* 2017; 7:42202. doi: <https://doi.org/f9p5vr>

- [28] Careche M, Mazo M, Torrejon P, Tejada M. Importance of Frozen Storage Temperature in the Type of Aggregation of Myofibrillar Proteins in Cod (*Gadus morhua*) Fillets. *J. Agric. Food Chem.* [Internet]. 1998; 46(6):1539-1546. doi: <https://doi.org/dvnpqgb>
- [29] Truonghuynh HT, Li B, Zhu H, Guo Q, Li S. Freezing methods affect the characteristics of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*): use of cryogenic freezing for long-term storage. *Food Sci. Technol.* [Internet]. 2020; 40(Suppl. 2):429-435. doi: <https://doi.org/ghxcw8>
- [30] Lyu C, Ukpai G, Alexandru S, Rubinsky B. Isochoric and isobaric freezing of fish muscle. [Internet]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [Internet]. 2017; 485(2):279-283. doi: <https://doi.org/gkq8xr>
- [31] Tinacci L, Armani A, Guidi A, Nucera D, Shvartzman D, Miragliotta V, Coli A, Giannessi E, Stornelli MR, Fronte B, Di Iacovo F, Abramo F. Histological discrimination of fresh and frozen/thawed fish meat: European hake (*Merluccius merluccius*) as a possible model for white meat fish species. *Food Control.* [Internet]. 2018; 92:154-161. doi: <https://doi.org/gkq8xd>
- [32] Jiang Q, Yin T, Yang F, Yu D, Xu Y, Tie H, Gao P, Wang B, Xia W. Effect of freezing methods on quality changes of grass carp during frozen storage. *J. Food Process. Eng.* [Internet]. 2020; 43(11):e13539. doi: <https://doi.org/gj9v4d>
- [33] Payne SR, Sandford D, Harris A, Young OA. The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. *Meat Sci.* [Internet]. 1994; 37(3):429-438. doi: <https://doi.org/d3qk9s>
- [34] Kaale LD, Eikevik TM. Changes of proteins during superchilled storage of Atlantic salmon muscle (*Salmo salar*). *J. Food Sci. Technol.* [Internet]. 2016; 53(1):441-450. doi: <https://doi.org/f76xxf>

# **RÉSUMÉ**

## Résumé

Cette étude examine les effets de la réfrigération, de la congélation et des cycles de congélation-décongélation sur la qualité des poissons, en se concentrant spécifiquement sur la sardine (*Sardina pilchardus*) et la sardinelle (*Sardinella aurita*). Les résultats montrent que la réfrigération entraîne des variations dans les propriétés physicochimiques des poissons, telles que le pH et l'activité de l'eau, ce qui peut affecter leur fraîcheur. La congélation induit également des changements, notamment une diminution de la teneur en eau et de l'activité de l'eau, ainsi qu'une légère baisse du pH, ce qui peut altérer la qualité des poissons après décongélation. L'impact des cycles de congélation-décongélation sur les échantillons de la sardine (*Sardina pilchardus*) et la sardinelle (*Sardinella aurita*) a révélé des modifications significatives dans les caractéristiques physico-chimiques, la rétention d'eau, la couleur et la structure histologique du poisson. Ces résultats soulignent l'importance de comprendre comment la congélation-décongélation affecte la qualité du poisson, notamment dans le contexte de l'industrie de la pêche et de la transformation alimentaire, dans le but de prévenir la fraude alimentaire. Les observations obtenues indiquent des changements de pH après plusieurs cycles. Initialement, une tendance à la baisse a été observée, suivie d'une augmentation significative au cinquième cycle. De plus, les valeurs de l'activité de l'eau montrent une diminution progressive de la disponibilité en eau dans les échantillons de sardines au fil des cycles de congélation-décongélation, avec quelques variations mineures. En outre, il y a un déclin progressif de la couleur, bien que tous ces changements puissent être imperceptibles pour la majorité des consommateurs. De plus, des changements histologiques tels que la dessiccation des fibres musculaires peut influencer la texture du poisson. De telles mesures garantissent non seulement la qualité du produit et la sécurité alimentaire, mais servent également de moyen de dissuasion contre la fraude alimentaire au bénéfice des consommateurs.

**Mots clés :** Réfrigération, Congélation, Cycle de congélation-décongélation, Paramètres physico-chimiques, Microstructure, Poisson.

## المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى فحص تأثير التبريد والتجميد ودورات التجميد والذوبان على جودة الأسماك، مع التركيز بشكل خاص على السردين (*Sardina pilchardus*) والساردينيلا (*Sardinella aurita*). تشير النتائج إلى أن التبريد يؤدي إلى تغيرات في الخصائص الفيزيائية والكيميائية للأسماك، مثل الرقم الهيدروجيني (pH) ونشاط الماء، مما قد يؤثر على طراوة الأسماك. كما يسبب التجميد تغيرات، بما في ذلك انخفاض في محتوى الماء ونشاط الماء، بالإضافة إلى انخفاض طفيف في الرقم الهيدروجيني (pH)، مما يمكن أن يؤثر على جودة الأسماك بعد الذوبان. كما كشف تأثير دورات التجميد والذوبان على عينات السردين والساردينيلا عن تعديلات كبيرة في الخصائص الفيزيائية والكيميائية واحتفاظ الماء واللون والهيكلي النسيجي للأسماك. تؤكد هذه النتائج أهمية فهم كيفية تأثير التجميد والذوبان على جودة الأسماك، لا سيما في سياق صناعة الصيد وتحويل الأغذية، بهدف منع الغش الغذائي. تشير الملاحظات إلى تغيرات في الرقم الهيدروجيني (pH) بعد عدة دورات، حيث لوحظ في البداية انخفاضًا تليه زيادة كبيرة في الدورة الخامسة. بالإضافة إلى ذلك، تُظهر قيم نشاط الماء انخفاضًا تدريجيًا في توافر الماء في عينات السردين على مر الدورات، مع بعض التغيرات الطفيفة. وهناك أيضًا انخفاض تدريجي في اللون، على الرغم من أن هذه التغيرات قد لا تكون ملحوظة لمعظم المستهلكين. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تؤثر التغيرات النسيجية مثل جفاف الألياف العضلية على نسيج السمك. من المهم أن نعترف بأن هذه النتائج قد تكون مؤثرة بواسطة عوامل متنوعة، مثل حجم السمك والتقلبات الموسمية والظروف البيئية. تضمن هذه الإجراءات ليس فقط جودة المنتج وسلامة الغذاء، ولكنها تعمل أيضًا كوسيلة لردع الغش الغذائي لصالح المستهلكين.

**الكلمات الدالة:** تبريد، تجميد، دورة التجميد-الذوبان، المعلمات الفيزيائية والكيميائية، الهيكل الدقيق، السمك، علم أمراض الأنسجة

## Summary

This study examines the effects of refrigeration, freezing, and freeze-thaw cycles on fish quality, specifically focusing on sardines (*Sardina pilchardus*) and sardinellas (*Sardinella aurita*). The results demonstrate that refrigeration leads to variations in the physicochemical properties of fish, such as pH and water activity, which can impact their freshness. Freezing also induces changes, including a decrease in water content and activity, as well as a slight pH decrease, potentially altering fish quality after thawing. The impact of freeze-thaw cycles on samples of sardines and sardinellas revealed significant modifications in physicochemical characteristics, water retention, color, and histological structure of the fish. These findings emphasize the importance of understanding how freeze-thaw cycles affect fish quality, particularly in the context of the fishing and food processing industry, aiming to prevent food fraud. pH changes after multiple cycles were observed, initially showing a downward trend followed by a significant increase in the fifth cycle. Additionally, water activity values demonstrate a gradual decrease in water availability in sardine samples over freeze-thaw cycles, with some minor variations. Furthermore, there is a gradual decline in color, although these changes may be imperceptible to most consumers. Histological changes such as muscle fiber desiccation can also influence fish texture. It is important to acknowledge that these results may be influenced by various factors, such as fish size, seasonal fluctuations, and environmental conditions. Such measures not only ensure product quality and food safety but also serve as a deterrent against food fraud for the benefit of consumers.

**Keywords:** Freezing, Freeze-thaw cycle, Physicochemical parameters, Microstructure, Fish.