



HAL
open science

Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de Fenton en milieu mimétique de la viande

Khaled Oueslati

► **To cite this version:**

Khaled Oueslati. Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de Fenton en milieu mimétique de la viande. Ingénierie des aliments. Université Clermont Auvergne, 2017. Français. NNT: . tel-02785153

HAL Id: tel-02785153

<https://hal.inrae.fr/tel-02785153>

Submitted on 4 Jun 2020

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

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

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

D. U. N°2793

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre 712

Thèse

Présentée à l'Université CLERMONT AUVERGNE
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(SPÉCIALITÉ : SCIENCES DES ALIMENTS)

soutenue le 16 février 2017

KHALED OUESLATI

**Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres
oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la
viande**

Président : M. P. MICHAUD
Membres : Mme. M.E. CUVELIER
M. P. GATELLIER
M. A. KONDJAYAN
Rapporteurs : Mme. M. DELAMBALLERIE
Mme. X. MEYER

Centre de Recherches INRA Auvergne Rhône-Alpes
Unité de Recherches Qualité des Produits Animaux
Équipe Biochimie et Protéines du Muscle et Équipe Imagerie et Transferts
63 122 Saint-Genès Champanelle

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

D. U. N°2793

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre 712

Thèse

Présentée à l'Université CLERMONT AUVERGNE
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(SPÉCIALITÉ : SCIENCES DES ALIMENTS)

soutenue le 16 février 2017

KHALED OUESLATI

**Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres
oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la
viande**

Président : M. P. MICHAUD
Membres : Mme. M.E. CUVELIER
M. P. GATELLIER
M. A. KONDJAYAN
Rapporteurs : Mme. M. DELAMBALLERIE
Mme. X. MEYER

Centre de Recherches INRA Auvergne Rhône-Alpes
Unité de Recherches Qualité des Produits Animaux
Équipe Biochimie et Protéines du Muscle et Équipe Imagerie et Transferts
63 122 Saint-Genès Champanelle

« J'ai décidé d'être heureux car c'est bon pour ma santé »

VOLTAIRE

Cette thèse a été préparée au sein de L'Institut National de la Recherche Agronomique
(INRA), Centre Auvergne-Rhône-Alpes

INRA Site de Theix

63122 SAINT-GENÈS-CHAMPANELLE

L'auteur tient à remercier...

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne... Je tiens à remercier spécialement mon directeur de thèse Philippe Gatellier. Je vous remercie pour le temps et la patience que vous m'avez accordés tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions logistiques. Je garderai dans mon cœur votre générosité, votre compréhension et votre efficacité. Pour tout ce que vous m'avez donné, je vous remercie très sincèrement. Je tiens à remercier mon codirecteur de thèse Jean-Dominique Daudin d'avoir bien assuré la direction et l'encadrement de mes travaux de thèse. Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils. Je tiens à remercier mon codirecteur de thèse Alain Kondjoyan, à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et ses qualités humaines. Je remercie Mme Marie De Lamballerie et Mme Xue Meyer d'avoir accepté de rapporter cette thèse. Vos remarques pertinentes et vos conseils précieux m'ont beaucoup aidé à améliorer la qualité de ce travail. Soyez assurés de mon estime et de ma profonde gratitude. Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi à Mr Philippe Michaud pour avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance. Merci également à Mme Marie-Elisabeth Cuvelier qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

... **aux membres de l'équipe de Biochimie et Protéines du Muscle** où j'avais fait toute la partie expérimentale. J'adresse tout particulièrement mes remerciements à M^{me} *Véronique Santé-Lhoutellier*, responsable de cette équipe, pour m'avoir accueillie,

... à M^{me} *Claude Fereirra*, pour sa générosité, son aide et sa bonne humeur.

... à M. *Laurent Aubry*, pour sa gentillesse et sa sympathie et sa solidarité

... à M. *Thierry Sayd*, à M. *Didier Viala*, à Mme *Sylvie Blinet* et à M^{me} *Yvette Villatte* pour toute la gentillesse dont ils ont fait preuve.

... à M^{me} *Eliane Bachelard*, secrétaire de l'unité QuaPA, pour son aide administrative précieuse, pour le démarrage de la thèse

... **aux membres de l'équipe Imagerie et transfert** où j'avais fait de la modélisation. J'adresse tout particulièrement mes remerciements à Mr *Pierre Sylvain MYRADE*, responsable de cette

équipe, pour m'avoir accueillie, pour ses conseils précieux, son soutien, ses encouragements et pour avoir suivi de près ce travail tout au long de ces trois années.

... à M *Stéphane Portanguen*, pour sa gentillesse, son aide et sa bonne humeur.

... à M. *Raphael Favier*, pour sa sympathie et ses belles prises de photos

... à M. *Jason Sicard*, pour son aide et sa bonne humeur

... à Mme *Françoise Lassalas*, Mme *Mathilda serpollier* et Mme *Françoise Neyrial* pour votre aide et votre sympathie.

... à M. *Jean-Michel Auberger*, pour sa disponibilité.

... à mes amis que j'ai rencontrés à l'INRA

Anne Duconseille : reste comme tu es. J'ai beaucoup apprécié les échanges qu'on a eu ensemble et ton ouverture d'esprit

Aurélie Promeyrat : tu as été d'une générosité extraordinaire, Merci

Samuel Viet : tu as été plus fort que moi au Laser Game MAIS, avoue que je suis plus fort que toi au tennis

Vincenza Ferrara : la joie de vivre à l'italienne

Maeva Bouyer : tu as assuré avec brio l'organisation des journées des doctorants au sein de l'unité, bon courage pour la suite

... et aussi à *Audrey* la niçoise ! À *Mohamed*, à *Emilie*, à *Diane*, à *Camille*...

...A mes ami(e)s *Sinda*, *Ahlem*, *Salem*, *Khawla*, *Malek*, *Balkis*, *Chinti*, *Spiroo*, *Marwa*, *Amina*, *Dhouha*, *Rahma*, *Sallouha*, *Seif*...

...A ma famille : mon père *Lotfi*, ma mère *Houda* et mon frère *Mehdi*...

Table des matières

<i>Introduction générale.....</i>	<i>1</i>
<i>I. Etude bibliographique.....</i>	<i>5</i>
I.1 Le muscle-la structure musculaire.....	5
I.1.1 Les muscles squelettiques.....	5
I.1.2 Transformation du muscle en viande.....	6
I.1.3 Composition et valeur nutritionnelle de la viande.....	11
I.1.4 Composition de la viande transformée : exemple des charcuteries.....	21
I.2 Les radicaux libres.....	22
I.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	22
I.2.2 Détection de l'anion superoxyde.....	26
I.2.3 Détection du radical hydroxyle.....	30
I.3 Dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	31
I.3.1 Modifications des protéines.....	32
I.3.2 Modification des lipides.....	34
I.4 Les antioxydants.....	37
I.4.1 Les antioxydants endogènes enzymatiques.....	37
I.4.2 Les antioxydants non enzymatiques.....	39
I.5 Effets des traitements technologiques sur l'oxydation en lien avec la qualité de la viande	44
I.5.1 Les traitements technologiques à basse température.....	45
I.5.2 Effets de la cuisson sur les phénomènes oxydatifs dans la viande.....	47
I.6 Exemples de modèles d'étude utilisés pour la compréhension des mécanismes oxydatifs dans les aliments.....	48
<i>II. Matériels & Méthodes.....</i>	<i>51</i>
II.1 Construction du modèle mimétique de la viande.....	52
II.1.1 Préparation du tampon d'incubation.....	52
II.1.2 Concentration en oxydants.....	52
II.1.3 Choix des sondes.....	53
II.1.4 Conditions de conservation et de chauffage du milieu.....	54
II.1.5 Détermination des concentrations en antioxydants.....	54
II.1.6 Variation du pH et ajout de sel (NaCl).....	56
II.2 Mesures des oxydations dans un milieu mimétique du système digestif.....	59

II.2.1	Protocole expérimental	59
II.2.2	Digestion <i>in vitro</i>	59
II.2.3	Mesures d'oxydation des lipides et des protéines.....	59
II.2.4	Mesure de la protéolyse	60
III. Développement d'un modèle mathématique stœchio-cinétique.....		62
III.1	Introduction	62
III.1.1	Système Fenton en solutions aqueuses	63
III.1.2	Le schéma réactionnel des sondes	66
III.1.3	Schémas réactionnels des antioxydants (AO).....	69
III.2	Calcul des cinétiques chimiques	71
III.2.1	Principes	71
III.2.2	Incidence des conditions physicochimiques sur les constantes réactionnelles	74
III.3	Complexation, précipitation et réactivité du fer	77
III.3.1	Impact de la complexation dans l'eau sur la chimie de Fenton	77
III.3.2	Influence de la présence des ions sulfate et phosphate	83
III.3.3	Conclusions relatives aux coefficients de réactivité des Fe II et Fe III.....	86
III.4	Valeurs les plus probables des constantes de réaction k_{ref} et des énergies d'activation E_a	87
IV. Résultats.....		90
IV.1	Analyse de l'effet des réactants, de l'état du fer et de l'ajout d'antioxydants sur la formation des radicaux libres par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de viande : mesure des cinétiques au moyen de sondes chimiques	91
IV.1.1	Introduction	93
IV.1.2	Matériels et méthodes	97
IV.1.3	Résultats et discussion	100
IV.1.4	Conclusion.....	105
IV.2	Analyse de l'effet des réactants, de l'état du fer, et de l'ajout d'antioxydants sur la formation des radicaux libres par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de viande : simulation du système réactionnel au moyen d'un modèle stœchio-cinétique.....	112
IV.2.1	Introduction	114
IV.2.2	Systèmes réactionnels mis en jeu.....	115
IV.2.3	Effet du pH sur l'état des réactants	117
IV.2.4	Modélisation des systèmes réactionnels	119
IV.2.5	Résultats et interprétations.....	120

IV.2.6	Conclusion.....	124
IV.3	Effets du chlorure et du pH sur la production des radicaux libres issus du système Fenton dans la viande	137
IV.3.1	Introduction générale.....	137
IV.3.2	Conditions expérimentales.....	137
IV.3.3	Résultats et discussion.....	137
IV.3.4	Conclusion.....	143
IV.4	Evaluation de l'impact du système Fenton sur la digestion de la viande in vitro dans un modèle gastro-intestinal (Oueslati <i>et al.</i>, 2016)	145
V.	<i>Discussion générale</i>	<i>154</i>
	<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>162</i>
	<i>Annexe 1</i>	<i>185</i>
	<i>Annexe 2</i>	<i>188</i>
	<i>Annexe 3</i>	<i>191</i>
	<i>Annexe 4</i>	<i>194</i>

Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la viande

Résumé : La maîtrise de la qualité des produits carnés transformés (conservés, marinés, cuits, salés, digérés...) nécessite une meilleure compréhension des mécanismes responsables des phénomènes oxydatifs et des lois cinétiques qui les régissent. Au cours des processus oxydatifs, la phase d'initiation des oxydations est capitale. Cette phase se caractérise par la vitesse à laquelle l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène réagissent avec le fer dont la viande est plus ou moins riche selon l'espèce. Les radicaux libres, principalement superoxyde ($O_2^{\circ-}$) et hydroxyle (OH°) conduisent à l'oxydation des lipides et des protéines de la viande. Ce travail s'appuie en alternance sur des expérimentations avec un milieu modèle bien contrôlé et des sondes spécifiques permettant de caractériser la production radicalaire, et sur des simulations de calculs avec un modèle stœchio-cinétique basé sur un ensemble de réactions élémentaires et de réactions bilans permettant d'évaluer l'incidence i) de chacun des paramètres du système réactionnel (constante réactionnelle k , énergie d'activation E_a , réactivité du fer P) ii) de la concentration en réactants (Fer, H_2O_2 , chlorure et antioxydants iii) des conditions environnementales (température, pH et force ionique) sur les cinétiques de production des radicaux libres. Les résultats expérimentaux montrent : (1) un effet synergique des oxydants et de la température sur les oxydations (2) une incidence importante des contre ions et du pH sur les complexes du fer et les niveaux d'oxydation (3) un important effet de la nature des oxydants et des antioxydants sur l'oxydation. Les constantes de vitesse controversées et les énergies d'activation de certaines réactions ainsi que les coefficients de réactivité du fer ont été ajustés localement un par un. Les prédictions du modèle stœchio-cinétique reproduisent des tendances expérimentales, exceptés pour des concentrations élevées en réactants, pour des températures extrêmes et certains antioxydants. Une optimisation globale des valeurs des k , des E_a et de la réactivité du fer pourrait améliorer les résultats prédictifs.

Mots clés : fer non héminique, oxydation, radicaux libres, constante de vitesse, réactivité du fer, énergie d'activation, modélisation, viande transformée

Characterization and modeling of oxygenated free radicals production by Fenton chemistry in a meat mimetics medium

Abstract: Control of meat quality during meat processes (storage, cooking, curing, digestion) requires a better understanding of the mechanisms responsible of the oxidative phenomena and of the kinetic laws that govern them. The initiation stage of oxidation is crucial and characterized by the rate of reaction of oxygen and hydrogen peroxide with iron; this latter compound is more or less rich depending on muscles, animals and species. Superoxide radical ($O_2^{\circ-}$) and hydroxyl radical (OH°) are produced and initiate the cascade of reactions implicated in protein and lipid oxidations. To investigate the impact of the physicochemical parameters on the free radicals production our trials were carried out with a mimetic model of meat using two specific probes (nitroblue tetrazolium and terephthalate) and a stoichio-kinetic mathematical model composed of interactive chemical reactions. This approach enables to measure many production kinetics of $O_2^{\circ-}$ and OH° and to assess unknown kinetic parameters (rate constant and activation energy and iron reactivity) by comparison of calculations to measurements. The experimental results show: (1) a synergistic effect of oxidants and temperature on oxidations (2) a significant effect of counter ions and pH on iron complexes and oxidation levels (3) a significant effect of oxidants and antioxidants on oxidation. Controversial rate constants and activation energies of some reactions as well as iron reactivity coefficients were adjusted. The predictions of the stoichio-kinetic model reproduce experimental trends except for high reactants concentrations, for extreme temperatures and for some antioxidants. A global optimization of k , E_a and iron reactivities values could improve predictive results.

Keywords: iron, oxidation, free radicals, rate constants, modelling, iron reactivity, energy activation, meat process

Communications à des congrès Internationaux

1. **Oueslati, K.**, Daudin, J.D., & Gatellier, P. (2013). Evaluation of free radical's production in transformed meat in different physiochemical conditions. 15èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, 4-5 Novembre 2014, Clermont-Ferrand, France. (Communication par affiche).
2. **Oueslati K.**, Promeprat A., Daudin J-D., & Gatellier P. (2015) Analysis of free radical production in meat in the physicochemical conditions of storage and cooking. 61st International Congress of Meat Science and Technology, 23-28 Août 2015, Clermont-Ferrand, France. (Communication par affiche).
3. **Oueslati, K.**, Daudin, J.D., & Gatellier, P. (2016). Effect of antioxidants on free radical's production in transformed meat during cooking and storage. 18th World Congress of Food Science and Technology, 21-25 Août 2016, Dublin, Irlande. (Communication par affiche).

Article accepté ou en préparation

1. **Oueslati, K.**, de La Pomelie, D., Sante-Lhoutellier, V., & Gatellier, P. (2016). Impact of the Fenton process in meat digestion as assessed using an in vitro gastro-intestinal model. *Food Chemistry*, 209, 43-49. (accepté)
2. **Oueslati, K.**, Daudin, J.D., & Gatellier, P. (2017a). Analyse de l'effet des réactants, de l'état du fer et de l'ajout d'antioxydants sur la formation des radicaux libres par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de viande : mesure des cinétiques au moyen de sondes chimiques (en préparation pour publication dans food chemistry)
3. **Oueslati, K.**, Gatellier, P., Daudin, J.D., & Kondjayan, A . (2017b). Analyse de l'effet des réactants, de l'état du fer, et de l'ajout d'antioxydants sur la formation des radicaux libres par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de viande : simulation du système réactionnel au moyen d'un modèle stoechio-cinétique (en préparation pour publication dans food chemistry)

Abréviations

[X], ref	La concentration de référence du composé X
[X], t	Concentration du composé X au cours du temps
[X], t ₀	Concentration initiale du composé X
A	Déhydroascorbate
A ²⁻	Dianion ascorbate
AA	Acides Aminés
AAA	Acides Aminés Aromatiques
ABS	différence d'absorbance
ADIV	Association pour le développement de l'industrie de la viande
AG	Acide Gras
AGI	Acides Gras Insaturés
AGMI	Acides Gras Mono-Insaturés
AGPI	Acides Gras Poly-Insaturés
AGS	Acides Gras Saturés
AH ⁻	Ascorbate
AH ^o et A ^{o-}	Radicaux ascorbyles
AH ₂	Acide ascorbique
AMP	Adénosine-5'-Monophosphate
AMPd	Adénosine -5'-Monophosphate désaminase
ANC	Apport Nutritionnel Conseillé
ANOVA	ANalysis Of VAriance
AO	Antioxydant
Ar	Constante d'Arrhenius
ATP	Adénosine-5'-Triphosphate
BPM	Biochimie et Protéines du Muscle
Cat	Catalase
CEPIA	Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture
CIV	Centre d'Information des Viandes
CoupleRad	Selon, le pH, les radicaux perhydroxydes ou superoxydes
CP	Composé perdu qui n'interfère pas avec le système étudié
Cr	Créatine
Cu	Cuivre
D	Dalton

D	Dalton
DF	Diformazan
DO	Densité Optique
E_a	Énergie d'activation
EDO	Equations aux Dérivées Ordinaires
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FARE	Fractionnement des AgroRessources et Environnement
Fe II	Fer ferreux complexé et non complexé
Fe III	Fer ferrique complexé et non complexé
Fe(III)-Cl ₃	Chlorure de fer
Fe(III)-EDTA	<i>Fer ferrique complexé par l'acide éthylène diamine tétra-acétique</i>
Fe ²⁺	ion ferreux
Fe ³⁺	ion ferrique
FH	Fer héminique
Fluo, ref	Intensité de la fluorescence à la concentration de référence
Fluo, t	Intensité de la fluorescence au cours du temps
g	gramme
GPx	Glutathion Peroxidase
GS°	Radical thiyle
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfide
h	heure
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HO°	Radical hydroxyle
HO ₂ ⁻	Radical perhydroxyle
HTP	Hydroxyterephthalate
INCA	Institut National Du Cancer
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
J	Joule
K	Degré Kelvin
<i>k</i>	Constante de vitesse d'une réaction / constante réactionnelle
l	Litre
L°	Radical alkyle
LDL	Lipoprotéines de basse densité
L-DOPA	L-dihydroxyphénylalanine
LH	Lipides insaturés

LOO°	Radical peroxyde
LOOH	Hydroperoxydes
L-TOPA	L-trihydroxyphénylalanine
M	Molaire
Mb-Fe ³⁺	Metmyoglobine
MDA	Malondialdéhyde
MF	Monoformazan
min	minute
MM	Masse Molaire
n	Nombre de répétition d'une mesure ou d'une expérience
NADH	Nicotinamide Adénine Nucléotide Réduit
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate
NBT	NitroBlue Tetrazolium
nm	nano mètre
O ₂	Oxygène
O ₂ ^{°-}	Radical superoxyde
<i>p.m</i>	<i>Post mortem</i>
P2	Réactivité du Fer II
P3	Réactivité du Fer III
PCr	Phosphocréatine
PG	Potentiel Glycolytique
pH	potentiel hydrogène
pHu	pH ultime
PI	Point Isoélectrique
pKa	Constante d'acidité
PL	Phospholipides
PRE	Pouvoir de Rétention d'Eau
QuaPA	Qualité des Produits Animaux
R	Constante des gaz parfait (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
R2	Coefficient de Régression
RMSE	Root Mean Square Error
RO°	Radical alkoxyde
ROO°	Radical peroxyde
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
Rx	Réaction numéro x
s	seconde
SEM	Standard Error of the Mean ou Erreur standard de la moyenne

SOD	Super Oxyde Dismutase
Staboxal	Stabilité Oxydative des Aliments
T	Température (°C)
t_{fin}	Durée d'observation (s)
TP	Téréphtalate
Δt	Intervalle de temps (s)
ϵ	Coefficient d'extinction ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
λ	Longueur d'onde (nm)

Liste des figures

Figure 1 : Structure globale du muscle squelettique.....	6
Figure 2 : Evolution de la dureté du muscle post mortem au cours du temps (tiré de Ouali, 1991).....	7
Figure 3 : Réactions de synthèse de l'ATP (tiré de Monin, 1988)	9
Figure 4 : Teneurs en fer total dans les tissus musculaire et abats issus de différentes espèces animales.....	15
Figure 5 : Structure 3D de la myoglobine	17
Figure 6 : Structure de l'hème (Bastide <i>et al.</i> , 2011)	17
Figure 7 : Etats d'oxydation du fer héminique	18
Figure 8 : Libération du fer héminique à partir de la myoglobine sous l'effet de la température	19
Figure 9 : Mécanismes plausibles par lesquels l'oxydation des protéines affecte les qualités technologiques et sensorielles de la viande (Estévez, 2011).....	33
Figure 10 : Schéma simplifié montrant l'interdépendance des oxydations lipidiques et protéiques	37
Figure 11 : Effets de la force ionique sur la constante de vitesse de la réaction d'oxydation du Fe II en Fe III par le H ₂ O ₂ dans l'eau de mer à pH 6 et à différentes températures	46
Figure 12 : Schéma représentatif du modèle mimétique de la viande utilisé au cours de la thèse.....	58
Figure 13 : Réactions impliquées dans le cycle Redox du fer.....	63
Figure 14 : Réactions entre les radicaux libres.....	64
Figure 15 : Réactions impliquées dans le cycle Redox du fer revu par K.Oueslati	65
Figure 16 : Diagramme de prédominance du Couple (HO ₂ [°] /O ₂ ^{°-}) (tiré de Promeyrat, 2013)	66
Figure 17 : Schéma réactionnel du NBT avec le radical superoxyde (Bielski, 1980) (a) Schéma réactionnel simplifié du NBT(b).....	67
Figure 18 : Schéma réactionnel du Téréphtalate réagissant avec le radical hydroxyle (tiré de Fang, 1996).....	69
Figure 19 : Schéma réactionnel de la vitamine C (tiré de Promeyrat, 2013)	71
Figure 20 : Variation de la constante réactionnelle de la réaction de dismutation du radical superoxyde (R18) en fonction du pH à température ambiante.....	76

Figure 21 : Concentration en log des différentes formes de Fe(II) dans un milieu aqueux très dilué ($[\text{Fe(II)}] = 10^3 \text{ M}$)	78
Figure 22 : Contribution de chaque complexe du Fe II dans la vitesse d'oxydation du Fe II par l' O_2 et H_2O_2 dans l'eau de mer ($[\text{O}_2] = 210 \mu\text{M}$, $[\text{Fe}^{2+}]_{t_0} = 250 \text{ nM}$) avec $[\text{H}_2\text{O}_2]_{t_0}$ égales à 275 nM et 50 nM respectivement (Santana-Casiano <i>et al.</i> , 2006)	79
Figure 23 : Complexation du Fe III dans une solution saline à 0,7 M de NaCl à 25°C (Millero, 2001).....	80
Figure 24 : Complexation du Fe III dans l'eau de mer à 25°C (Millero, 2001).....	80
Figure 25 : Effet du pH et de la concentration initiale en Fe III sur la solubilité du Fe III dans l'eau de mer à 25°C (Millero, 2001)	81
Figure 26 : Dosage du Fer soluble à différentes concentrations de Fer (25°C, tampon phosphate 40 mM, pH 6).....	82
Figure 27: Vitesse de formation du radical hydroxyle suite à l'oxydation de trois différents oxydes de fer en fonction du ratio surface du fer précipité/ H_2O_2 à pH = 4 (tiré de Kwan <i>et al.</i> , 2002).....	83
Figure 28 : Spéciation de l'acide phosphorique en fonction du pH en solution aqueuse (tiré d'Essington, 2015)	86
Figure 29 : Chimie de Fenton.....	106
Figure 30: Mesure de l'effet de la température sur la production des radicaux libres ; (a) formazan ($\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$, pas H_2O_2) et (b) HTP ($\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$, $\text{H}_2\text{O}_2 = 200 \mu\text{M}$)	107
Figure 31 : Mesure de l'effet de la concentration initiale en FeSO_4 sur la production des radicaux libres ; (a) formazan (température 60°C et pas H_2O_2) et (b) HTP (température 60°C et $\text{H}_2\text{O}_2 = 200 \mu\text{M}$).....	107
Figure 32 : Mesure de l'effet de la concentration initiale en H_2O_2 sur la production des radicaux libres ; (a) formazan (température = 60°C et $\text{FeSO}_4 200 \mu\text{M}$) et (b) HTP (température = 60°C et $\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$).....	108
Figure 33 : Mesure de la vitesse de formation du HTP calculée à partir des cinétiques des figures 31, 32 et 33 en fonction de la température (a), de la concentration initiale en fer (b) et de la concentration initiale en H_2O_2 (c).....	108
Figure 34 : Calcul des concentrations des complexes du Fe II en fonction du pH avec le logiciel Minteq (Gustafsson, 2001) pour un tampon phosphate 40 mM contenant 200 μM de FeSO_4)	129

Figure 35 : Ecart quadratique moyen, calculé par le modèle stoechio-cinétique, entre les concentrations mesurées et calculées à 0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes, pour toutes les conditions expérimentales du Tableau 13 du chapitre II pour différentes valeurs du couple P2/P3	130
Figure 36 : Comparaison entre les concentrations en HTP mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la concentration initiale en fer (60°C, H ₂ O ₂ = 200 µM).....	131
Figure 37 : Comparaison entre les concentrations en HTP mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la concentration initiale en H ₂ O ₂ (60°C, FeSO ₄ = 200 µM).....	131
Figure 38 : Comparaison entre les concentrations en HTP mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la température (FeSO ₄ = H ₂ O ₂ = 200 µM)	132
Figure 39 : Comparaison entre les concentrations en formazan mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la température (FeSO ₄ = 200 µM, sans H ₂ O ₂).....	132
Figure 40 : Comparaison entre les concentrations en formazan mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la concentration initiale en fer (60°C, sans H ₂ O ₂).....	133
Figure 41 : Mesure de la production de formazan en fonction du pH à 37°C (tampon phosphate, FeSO ₄ = 50 µM, sans H ₂ O ₂)	138
Figure 42 : Calcul de la vitesse de production du radical superoxyde sur 30 minutes à différents pH (tampon phosphate, FeSO ₄ = 50 µM, sans H ₂ O ₂ , 37°C).....	139
Figure 43 : Calcul des proportions d'O ₂ ^{•-} réagissant soit avec la sonde NBT par les réactions (R30 et R31) soit avec le Fe II par la R5.....	139
Figure 44 : Mesure de la production du HTP en fonction du pH à 4 et 37°C (tampon phosphate, FeSO ₄ = H ₂ O ₂ = 50 µM)	140
Figure 45 : Cinétique de formation du HTP en fonction de la concentration initiale en NaCl (tampon phosphate, FeSO ₄ = H ₂ O ₂ = 200 µM à 60°C)	141
Figure 46 : Cinétique de formation du formazan en fonction de la concentration initiale en NaCl (tampon phosphate, FeSO ₄ = 200 µM, sans H ₂ O ₂ à 60°C).....	142
Figure 47 : Organisation du fichier d'entrée du programme de calcul.	185
Figure 48 : Organigramme du programme Matlab® qui a été construit pour effectuer des calculs de simulation.	186
Figure 49 : variation de la valeur de la constante réactionnelle k_5 en fonction du pH	189
Figure 50 : variation de la valeur de la constante réactionnelle k_6 en fonction du pH	190
Figure 51 : Etude de sensibilité du modèle aux paramètres P2 et P3 vis à vis de la formation du formazan à deux températures (4 et 60°C).....	192

Figure 52 : Etude de sensibilité du modèle aux paramètres P2 et P3 vis à vis de la formation du HTP à deux températures (4 et 60°C)	193
Figure 53 : Courbes de calibration de la fluorescence.....	196
Figure 54 : Cinétique du Ratio= (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer) à des concentrations initiales en FeSO ₄ égales à 200 et 600 μM (25°C) à pH 3.....	199
Figure 55 : Relation entre le Ratio= (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer) et les concentrations en fer insoluble à pH 6 pour différentes concentrations initiales en FeSO ₄ (50, 200, 400 et 600 μM) à 25°C.....	200
Figure 56 : Cinétique de formation du fer insoluble pour des concentrations initiales en FeSO ₄ variables (de 50 à 600 μM) (25°C, pH6).....	201
Figure 57 : Cinétique du Ratio = (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer) en fonction de la concentration initiale en FeSO ₄	202
Figure 58 : Cinétique du Ratio= (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer) en fonction de la température (FeSO ₄ =200 μM)	203
Figure 59 : Ajustement par concentration en fer en utilisant les valeurs moyennes du Ratio= (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer)	204

Liste des tableaux

Tableau 1 : Pouvoir tampon dans certains muscles de plusieurs espèces animales	10
Tableau 2 : Composition moyenne en acides aminés de la viande de différentes espèces animales.....	12
Tableau 3 : Composition moyenne en acides gras de la viande de différentes espèces	13
Tableau 4 : Apport énergétique moyen de la viande de différentes espèces animales.....	14
Tableau 5 : Composition moyenne en vitamines, minéraux et oligo-éléments de la viande	14
Tableau 6 : Teneur en fer héminique en $\mu\text{M/g}$ de viande et de charcuterie (tiré de Sinha <i>et al.</i> , 1998 ; Cross <i>et al.</i> , 2012)	16
Tableau 7 : Principales inadéquations des sondes de piégeage des radicaux superoxydes avec les milieux mimétiques de la viande et du système digestif	27
Tableau 8 : Coefficients d'absorbance du Monoformazan (MF)	29
Tableau 9 : Activité antioxydante de la glutathion peroxydase (GPx), dans diverses viandes	39
Tableau 10 : Teneur en carnosine en mg pour 100 g de muscles de diverses espèces.....	41
Tableau 11 : Stabilité thermique des antioxydants endogènes	43
Tableau 12 : Exemple de variabilité des modèles statiques <i>in vitro</i> appliqués à l'étude de digestion de produits laitiers (Hur <i>et al.</i> , 2009 ; Dupont <i>et al.</i> , 2010)	49
Tableau 13 : Plan expérimental des cinétiques de formation des radicaux superoxydes et hydroxyles dans le milieu mimétique de base de la viande	53
Tableau 14 : Teneur en antioxydants dans la viande.....	56
Tableau 15: conditions d'utilisation des sondes à trois différents pH (3,5 ; 5 et 6).	57
Tableau 16 : Teneurs en sulfate de différents types de viandes (Florin <i>et al.</i> , 1993).....	84
Tableau 17 : Principales réactions de l'ion sulfate et de ses complexes dans la chimie de Fenton (tiré de De Laat <i>et al.</i> , 2004)	85
Tableau 18 : Valeurs des constantes de vitesses des réactions du radical hydroxyle avec différents anions (Kochany & Lipczynska-Kochany, 1992).....	86
Tableau 19 : Plan expérimental des cinétiques de formation des radicaux superoxydes et hydroxyles dans un milieu mimétique basique de la viande	106

Tableau 20: Mesure de l'effet promoteur ou inhibiteur des AO, exprimé en % à 30 minutes pour les essais à hautes températures (45 et 60°C) et à 20 heures pour les essais à basses températures (4 et 10°C) (n=4)	109
Tableau 21 : Synthèse des constantes de vitesse des réactions k et des énergies d'activation (E_a), sélectionnées pour le modèle mathématique. k exprimé en $M^{-1}.s^{-1}$ ou en s^{-1} . (E_a) est exprimée en kJ.....	126
Tableau 22 : Proportions de précipitation du Fe II et du Fe III en fonction du pH du milieu (phosphate= 40mM, 200 μ M de FeII ou de Fe III, 25°C) calculées avec le logiciel Minteq (Gustafsson, 2001)	129
Tableau 23 : Résultats calculés et mesurés des effets promoteur ou inhibiteur des AO, exprimé en % par rapport au témoin sans AO à 30 minutes pour les essais à haute température (60°C) et à 20 heures pour les essais à basse température (4 °C)	133
Tableau 24 : Calcul de l'effet de la température sur les concentrations en complexes de fer dans une solution aqueuse simple de FeSO ₄ à 50 μ M à trois différents pH (3,5; 5 et 6,5). Calcul fait avec Minteq (Gustafsson, 2001)	141
Tableau 25 : Valeurs des paramètres (a, b, c) : résultats des ajustements par concentration en fer (μ M) avec la formule : $R=a*(temps)^b+c$	204

Introduction générale

Mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre du projet STABOXAL (STABILité Oxydative des ALiments), coordonné par Jean Dominique-Daudin (Directeur de recherches-INRA-Theix). Les référents pour l'Unité Mixte de Recherche Ingénierie Procédés Aliments (GENIAL) et l'Unité de Recherche et l'unité QuaPA sont respectivement Marie-Elisabeth Cuvellier et Philippe Gatellier. Le projet SABOXAL était financé par l'Institut Carnot Qualiment.

- Contexte et enjeux économiques et sociétaux de STABOXAL

Comprendre, quantifier et modéliser les mécanismes oxydatifs au sein des aliments dans le but d'améliorer leur stabilité oxydative, c'est contribuer à préserver leurs qualités sensorielles et nutritionnelles, et à réduire le gaspillage en évitant les pertes tout au long des circuits de distribution. Ceci répond, d'une part, à l'attente des consommateurs de produits nutritionnellement sains et appétants, et d'autre part, à une exigence de développement durable. De ce point de vue, rappelons que l'ambition des autorités Européennes est de réduire de 50 % les pertes et les gaspillages alimentaires annuels à l'horizon 2025, actuellement estimé à 190 kg/personne (Anonyme, 2012 et 2013). Au niveau mondial, diviser par deux les pertes et gaspillages le long de la chaîne alimentaire permettrait d'économiser une quantité de ressources alimentaires équivalente à 25% de la production agricole actuelle (Esnouf *et al.*, 2011).

Depuis longtemps, de nombreux travaux sont menés en vue de caractériser les systèmes oxydatifs au sein des aliments. Les efforts sont surtout concentrés sur les méthodes et techniques expérimentales. Ils apportent une compréhension de plus en plus fine des mécanismes impliqués. Toutefois, très peu de ces travaux sont dirigés vers la modélisation des cinétiques des réactions pour des schémas réactionnels qui sont souvent très complexes. Or, la modélisation permet à la fois de tester des hypothèses sur les mécanismes mis en jeu et de prédire l'effet des procédés de transformation sur la qualité des produits.

- Objectifs de STABOXAL

Les objectifs du projet sont l'amélioration de notre compréhension des mécanismes oxydatifs pour les modéliser, et la construction d'un outil mathématique unique de simulation des réactions d'oxydation des aliments qui permettra de capitaliser les connaissances acquises en biochimie des aliments mais aussi en chimie hors du domaine alimentaire : dégradation des lignines (projet LignoXyl, UMR FARE de Reims).

- Problématiques et objectifs de de la thèse

Dans cette thèse, nous nous intéressons à la viande et aux produits carnés. En effet, les procédés de transformation (conservation, cuisson, salaison, digestion) permettent de préserver et/ou d'améliorer certaines qualités des produits animaux mais peuvent conduire aussi à l'oxydation des lipides et des protéines avec un impact négatif sur les qualités sensorielles (Haak *et al.*, 2006) et nutritionnelles (Gatellier & Santé-Lhoutellier, 2009) des produits. La maîtrise de la qualité des produits carnés nécessite donc une meilleure compréhension des mécanismes oxydatifs et des lois cinétiques qui les régissent. Au cours de l'oxydation, la phase d'initiation des réactions est capitale. Cette phase se caractérise par la vitesse avec laquelle l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène, en interaction avec le fer (dont la viande est plus ou moins riche selon l'espèce), se transforment en radicaux libres, principalement en radical superoxyde (O_2°) et en radical hydroxyle (OH°). L'objectif de la thèse est de créer un modèle mathématique qui permet d'analyser le système réactionnel impliqué dans la phase d'initiation et de prédire l'évolution de la production des radicaux libres dans les produits carnés.

Cette approche s'appuie en alternance sur des expérimentations dans un milieu modèle bien contrôlé, et des calculs de simulation basés sur un modèle mathématique stoechio-cinétique qui permet d'évaluer l'incidence de chacun des paramètres du système réactionnel (constante réactionnelle k , énergie d'activation E_a , réactivité du fer), et des conditions environnementales (concentration des réactants, température, pH et force ionique), sur les cinétiques de production des radicaux libres. Ce travail de modélisation de la phase d'initiation des oxydations dans la viande est novateur et s'inscrit dans la continuité du travail de modélisation des phénomènes d'oxydation et de dénaturation thermique des protéines carnées lors au chauffage réalisé par Aurélie Promeyrat dans le cadre de sa thèse (2013).

Dans ce manuscrit, les caractéristiques de la viande et les principaux phénomènes oxydatifs qui se déroulent dans la viande et les produits carnés sont décrits dans la partie bibliographique (chapitre I). Le chapitre II est consacré à la présentation du milieu mimétique de la viande et des protocoles expérimentaux utilisés. Le développement du modèle stoechio-cinétique est détaillé dans le chapitre III. Le chapitre IV permet de comparer les résultats expérimentaux aux valeurs simulés par le modèle stoechio-cinétique. Deux incursions sont faites pour observer l'effet de procédés particuliers (salage, marinage) ou de la digestion sur la production des radicaux libres. Le manuscrit se termine par une discussion sur les performances et les limites du modèle actuel quant à la prédiction des radicaux libres dans le milieu mimétique de la viande.

Des perspectives sont données quant à l'extension potentielle du modèle à la conservation de tranches de viande puis à leur digestion.

Bibliographie

I. Etude bibliographique

I.1 Le muscle-la structure musculaire

D'après la définition du Larousse, un muscle est un organe capable de se contracter et d'assurer le mouvement ou la résistance aux forces extérieures. On en distingue trois types : les muscles squelettiques, les muscles lisses et le muscle cardiaque (appelé myocarde). Les trois types de muscle jouent chacun un rôle dans la physiologie animale. Dans cette étude, je m'intéresse au muscle squelettique. De quoi est constitué le muscle squelettique ?

I.1.1 Les muscles squelettiques

Le muscle constitue en moyenne 40% du poids corporel total. Le muscle squelettique de mammifère (Figure 1) a généralement la forme d'un fuseau aux extrémités duquel se trouvent les tendons qui assurent l'attachement du muscle à l'os. Les tendons sont formés de tissu conjonctif (collagène) et vont permettre d'assurer le mouvement en relayant le message musculaire aux parties osseuses. Le muscle est constitué de fibres ou cellules musculaires (75 à 92% du volume musculaire) entourées d'une membrane, l'endomysium. Ces fibres sont assemblées en faisceaux (myofibrilles, longues structures filamenteuses alignées) maintenus par le périmysium, eux-mêmes ceint par l'épimysium. Les fibres musculaires sont dites des cellules géantes (longues et fines) puisque leurs tailles peuvent varier de 10 à 100 μm . De plus, ce sont des cellules plurinucléées dont les noyaux sont localisés en périphérie. Elles résultent de la fusion de milliers de myoblastes (cellules souches responsables de la différenciation musculaire).

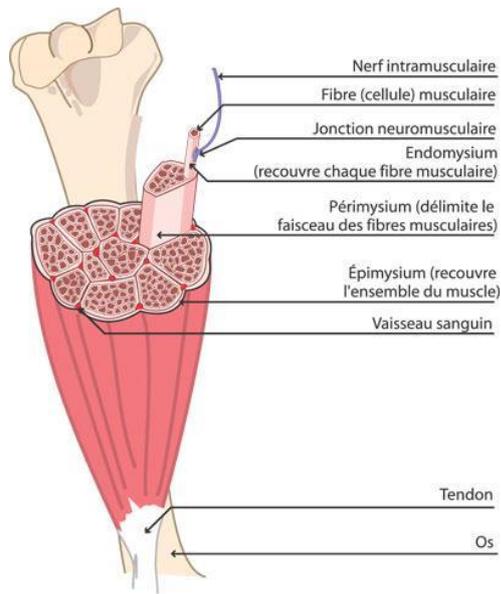


Figure 1 : Structure globale du muscle squelettique

La viande est le résultat de l'évolution post mortem du tissu musculaire squelettique (ou strié) et du tissu adipeux. La connaissance de la structure de ces tissus est indispensable à la compréhension des mécanismes responsables du déterminisme des qualités de la viande.

I.1.2 Transformation du muscle en viande

Au cours de sa transformation en viande, le muscle squelettique passe successivement par trois états différents (Figure 2) qui sont l'état pantelant, l'état rigide (rigor mortis) et l'état mûré.

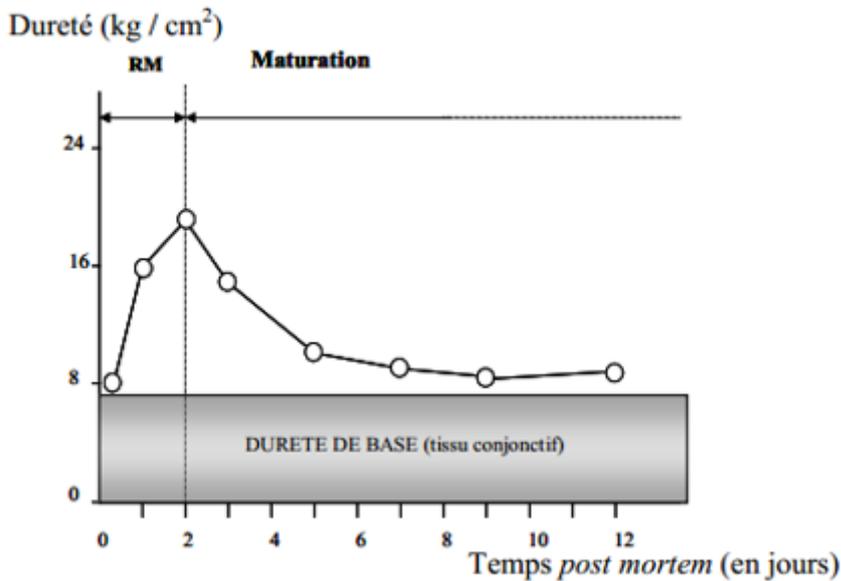


Figure 2 : Evolution de la dureté du muscle post mortem au cours du temps (tiré de Ouali, 1991)

I.1.2.1 Etat pantelant

Dans les secondes qui suivent l'abattage, l'animal se trouve dans un état pantelant. Cet état se traduit par des contractions persistantes de la musculature, probablement causées par des excitations nerveuses. Sa durée coïncide en effet avec la durée de survie du système nerveux et n'excède pas 20 à 30 minutes. Sur le plan biochimique, cette phase n'est pas encore bien caractérisée. De plus, les modifications que subit la structure musculaire pendant cette période ainsi que leurs conséquences sur le déroulement des phases ultérieures sont, sinon totalement inconnues, tout au moins très mal connues.

I.1.2.2 Modifications et transformations biochimiques pendant la rigor

L'abattage de l'animal entraîne l'arrêt de la circulation sanguine et prive la cellule musculaire de nutriments et d'oxygène (anoxie). Seuls les mécanismes anaérobies continuent de fonctionner : il en résulte des modifications du métabolisme qui présentent des répercussions sur la structure même du tissu musculaire (Lawrie, 1966).

Réactions biochimiques

D'après l'étude sur les conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande menée par Ouali. (1991), l'état rigide est l'aboutissement de la phase d'installation de la rigidité cadavérique ou rigor mortis. Après l'abattage, du fait de l'arrêt de la circulation sanguine, le

muscle se trouve privé d'oxygène. La synthèse d'ATP, composé essentiel à la survie de la cellule, qui, du vivant de l'animal, est assurée par la respiration, va désormais être moins efficace. Cette synthèse d'ATP repose alors essentiellement sur la dégradation de la phosphocréatine PCr dont les stocks sont limités puis du glycogène qui est la principale forme de réserves glucidiques du tissu musculaire. Le taux d'ATP reste à peu près constant tant que la concentration de PCr est relativement élevée. Dès que celle-ci devient insuffisante pour compenser la disparition de l'ATP, la concentration de ce dernier décroît et la rigidité cadavérique s'installe progressivement, la production d'ATP à partir du glycogène (glycolyse) ne permettant pas, à elle seule, de contrebalancer son hydrolyse. En effet, l'ATP qui fournit l'énergie au muscle lors de la contraction joue également le rôle de plastifiant puisque c'est lui qui permet au muscle de se relaxer. En son absence, il est aisé de comprendre que le muscle va perdre ses propriétés d'élasticité et devenir rigide. L'hydrolyse de l'ATP libère des protons dans le milieu cellulaire à raison d'un proton par molécule d'acide lactique produite par la glycolyse. (Figure 3). Le muscle s'acidifie et le pH décroît pour atteindre, chez des animaux en bon état physiologique, des valeurs finales (pH final ou pH ultime) comprises entre 5,4 et 6,0 selon le type de muscle. Le pH final est ainsi plus élevé pour les muscles rouges à contraction lente en raison de l'inactivation, lorsque le pH est inférieur à 6,0, des ATPases qui sont à l'origine de cette acidification. La glycolyse s'arrêtera donc soit quand le pH ultime est atteint (cas normal), soit par épuisement prématuré des réserves de glycogène anormalement basses au moment de l'abattage. La cinétique de ces processus, tous de nature enzymatique, dépendra (a) de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP qui règle la vitesse de l'ensemble des autres réactions y compris la vitesse de chute du pH, (b) du niveau des réserves énergétiques au moment de la mort (ces réserves étant essentiellement constituées de glycogène, le pH ultime de la viande sera déterminé par le taux de glycogène musculaire à l'abattage (Monin 1988)) (c) comme tous ces phénomènes sont enzymatiques, il paraît enfin évident que la température ou, plus exactement, les conditions de première réfrigération (conditions de réfrigération dans les 24 à 36 premières heures qui suivent l'abattage) vont jouer un rôle primordial dans la définition de la cinétique d'installation de la rigidité cadavérique. En d'autres termes, la vitesse de chute du pH augmentera avec la vitesse de contraction des muscles et avec la température tandis que son amplitude sera, pour un muscle donné, principalement fonction du taux de glycogène au moment de l'abattage.

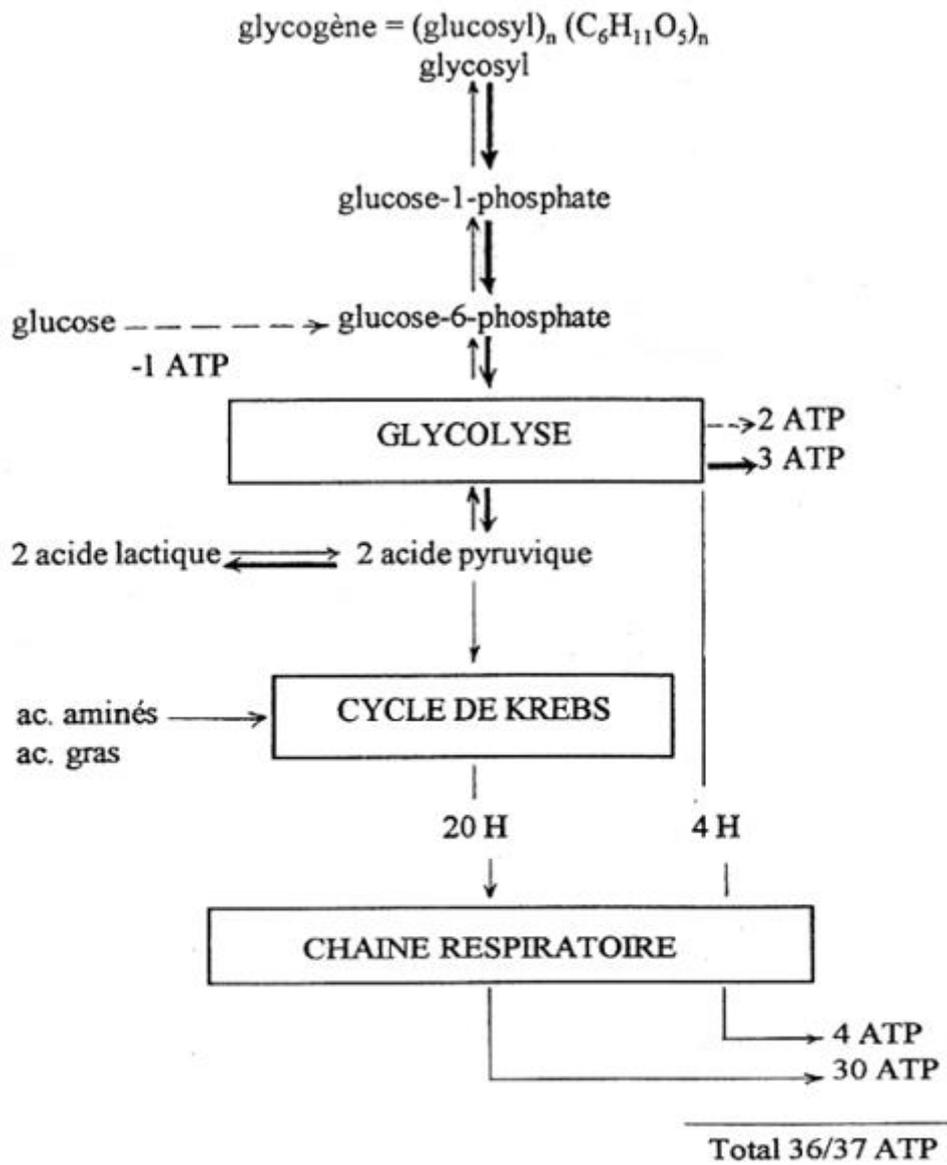


Figure 3 : Réactions de synthèse de l'ATP (tiré de Monin, 1988)

Le pouvoir tampon

Nombreux sont les facteurs qui influencent la chute du pH dans le muscle durant la rigor. On distingue des facteurs extrinsèques et intrinsèques dont le pouvoir tampon du tissu. Celui-ci se définit comme la capacité du tissu à résister aux changements du pH quand une quantité d'acide ou de base est ajoutée. Il s'exprime en $\text{mmol H}^+ \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{pH}^{-1}$. Le Tableau 1 montre les valeurs du pouvoir tampon dans certains muscles de différentes espèces animales (porcs, veaux et poulets). Chez les volailles, en particulier chez le poulet (Van Laack *et al.*, 2000), de même que chez le porc (Van Laack & Kauffman, 1999), le muscle pectoral ainsi que le muscle *Longissimus lumborum* (porc) peuvent accumuler la même quantité d'acide lactique avec un pH ultime différent. Ce phénomène peut être expliqué par la variation du pouvoir tampon de la viande entre ces deux espèces (Van Laack *et al.*, 2001). Celui-ci varie en fonction des caractéristiques métaboliques du muscle ; il est plus élevé dans les muscles blancs (glycolytiques) que dans les muscles rouges (oxydatifs et oxydo-glycolytiques) (Rao & Gault, 1989 ; Puolanne & Kivikari, 2000). Les principaux composés qui affectent le pouvoir tampon de la viande sont 1- le phosphate inorganique, 2- l'histidylimidazole (résidu des protéines myofibrillaires) et 3- les dipeptides (carnosines et anserine) (Kivikari, 1996). La différence de pouvoir tampon entre le muscle blanc et le muscle rouge serait liée à la différence de concentration de l'histidine qui est plus importante dans les fibres blanches que dans les fibres rouges (Olsman & Slump, 1981). Dans le muscle du porc, Sayre *et al.* (1963) rapportent que le pouvoir tampon augmente avec le temps post mortem. Par contre, chez le bovin, Honikel & Hamm (1974) cités par Kyla-Puhju *et al.* (2004) trouvent que le pouvoir tampon est indépendant du temps écoulé post mortem. Dans une étude sur la qualité de la viande de dinde, Molette *et al.* (2003) indiquent que le pouvoir tampon est maximal à 3 h post mortem, il diminue entre 3 h et 6 h post mortem et reste constant jusqu'à 24 h post mortem.

Tableau 1 : Pouvoir tampon dans certains muscles de plusieurs espèces animales

$5.5 < \text{pH} < 7.0$	Pouvoir tampon (en $\text{mmole H}^+ \cdot \text{pH}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)			
	<i>m. longissimus</i>	<i>m. triceps brachii</i>	Muscle pectoral	Muscles de la cuisse
Porcs	52	45	-	-
Veaux	51	48	-	-
Poulets	-	-	58	41

I.1.2.3 La maturation

La maturation permet l'attendrissage de la viande et résulte de la dégradation de certains éléments de la fibre musculaire (la rupture des stries Z et l'allongement des sarcomères) ou du tissu conjonctif par deux groupes de protéases (les protéinases neutres et les protéines lysosomiales) et vraisemblablement des mécanismes non enzymatiques dépendant du calcium (Liu *et al.*, 1994 ; Taylor *et al.*, 1995 ; Takahashi, 1996 ; Shreurs, 1997). La maturation de la viande de poulet est plus rapide que celle des mammifères, en particulier celle des bovins et des ovins qui durent plusieurs semaines. Shreurs (1997) rapporte que la maturation de la viande de poulet est efficace puisque qu'en moins de 24 heures la tendreté finale est atteinte. La forte activité protéolytique qui caractérise les muscles de poulets explique en partie la vitesse de maturation élevée de cette espèce (Blanchard & Mantle, 1996). L'évolution de la maturation est fortement liée à l'effet animal, au type musculaire et à l'environnement (la température). Ainsi la vitesse de maturation est supérieure dans les muscles blancs et lorsque la température est élevée (Berri & Jehl, 2001).

I.1.3 Composition et valeur nutritionnelle de la viande

La composition chimique du muscle est très variable entre les animaux, chez un même animal et d'un muscle à l'autre. Toutefois, la viande a pour principal intérêt nutritionnel les apports en protéines, notamment en acides aminés indispensables, en fer héminique qui est la forme la plus assimilable du fer, et en vitamine B12 essentiellement dans les viandes de ruminants.

I.1.3.1 Apport protéique

Les viandes renferment en moyenne 20 % de protéines. Ces protéines sont composées essentiellement de myosine, myoalbumine et de collagène. Il s'agit, pour la myosine et la myoalbumine, de protéines de qualité comportant tous les acides aminés indispensables ce qui confère aux viandes un bon coefficient d'efficacité protidique. Les morceaux de 2^e et 3^e catégorie¹ sont plus riches en tissus conjonctifs (élastine et collagène surtout). Le collagène, pauvre en tryptophane et en acides aminés soufrés, diminue la valeur biologique des viandes qui en sont riches. Il en est de même pour l'élastine dont l'équilibre en acides aminés indispensables est médiocre. Les viandes apportent d'autre part une petite quantité de substances azotées non protéiques (purines entre autres). La teneur moyenne en protéines varie

¹ La 1^{ère} catégorie représente les morceaux à cuisson courte : filet, escalope, bifteck, côte...

de 17 à 22% selon l'espèce. Le Tableau 2 met en évidence l'aspect qualitatif des protéines dans les viandes issues de différentes espèces animales.

Tableau 2 : Composition moyenne en acides aminés de la viande de différentes espèces animales

Source	ANC	Lapin						Porc		Veau et Taurillon		Poulet	
	AFSSA [2007]	Combes [2004]		Gigaud [2006]				Dalle Zotte [2004]					
Unité	mg/kg/jr	g/100 g	% ANC*	g/100 g	% ANC*	g/100 g	% ANC*	g/100 g	% ANC*	g/100 g	% ANC*	g/100 g	% ANC*
Arginine		1,12		1,21		1,3		0,97		1,23		1,22	
Histidine	11	0,52	67,5	0,53	68,8	0,56	72,7	0,49	63,6	0,59	76,6	0,52	67,5
Isoleucine	18	0,91	72,2	0,86	68,3	0,92	73	0,77	61,1	0,93	73,8	0,91	72,2
Leucine	39	1,8	65,9	1,51	55,3	1,64	60,1	1,2	44	1,57	57,5	1,6	58,6
Lysine	30	1,84	87,6	1,6	76,2	1,78	84,8	1,29	61,4	1,69	80,5	1,66	79
Méthionine		0,54		0,52		0,55							
Méthionine et cystine	15	1,1	104,8	0,75	71,4	0,77	73,3	0,6	57,1	0,74	70,5	0,77	73,3
Phénylalanine		0,84		0,72		0,8		0,63		0,8		0,73	
Tryptophane	27	0,1	84,7		72,5		87,8	0,2	72,5	0,72	116,4	0,21	84,7
Tyrosine		0,66		0,65		0,86		0,54		0,68		0,66	
Thréonine	16	1,11	99,1	0,85	75,9	0,92	82,1	0,74	66,1	0,85	75,9	0,85	75,9
Valine	18	0,98	77,8	0,94	74,6	1	79,4	0,81	64,3	1,02	81	0,89	70,6

---- *Acides aminés indispensables*

---- *Acides aminés conditionnellement indispensables : acides aminés indispensables pour des populations particulières (prématurés, individu en période de stress...) (Martin, 2001) * pour un homme adulte de 70 kg*

I.1.3.2 Apport lipidique

La teneur en matières grasses des viandes varie selon l'espèce, l'état d'engraissement de l'animal et le morceau considéré. Les matières grasses se trouvent à la surface de la carcasse (graisses de couverture), autour des muscles ou à l'intérieur du muscle (marbré, persillé). Compte tenu de ces considérations une viande peut contenir 2 à 30 % de graisses (Tableau 3). Les viandes les plus maigres (< 10 %) sont le lapin, le cheval, le veau, le poulet et la dinde (sans peau). Parmi les viandes les plus grasses (10 à 30 %) on trouve certains morceaux de bœuf et de porc ainsi que l'agneau, l'oie et le canard. Ces différences entre espèces restent relatives car il est toujours possible de choisir des morceaux très maigres (filet de porc, filet de canard sans la peau...). Le gibier est considéré comme viande maigre (~5 %). Les lipides des viandes sont constitués principalement d'acides gras saturés et monoinsaturés. Leur composition varie cependant en fonction du type de viande considéré. Les volailles représentent globalement une bonne source d'acides gras mono et polyinsaturés (Tableau 3). Toutes les viandes, mêmes maigres sont sources de cholestérol.

Tableau 3 : Composition moyenne en acides gras de la viande de différentes espèces

Viande	Lapin		Porc		Taurillon		Veau		Poulet	
Unité	g/100 g		% d'acides gras	g/100 g						
Source	Gigaud (2006)		Dalle Zotte (2004)	Calculé*						
	Lapin non dégraissé	Lapin dégraissé								
Acides gras saturés	5,13	3,55	37	3,23	39,5	3,55	38,9	1,56	32	2,1
Acides gras monoinsaturés	4,19	4,34	44,4	3,87	42,4	3,82	34,4	1,38	41	2,7
Acides gras polyinsaturés, dont :	2,98	2,5	18,5	1,57	9,5	3,61	15,2	0,6	25,1	1,66
acide linoléique	2,5	2,2	14,3	1,25	6,3	0,57	12,4	0,5	20,1	1,33
acide α -linoléique	0,32	0,27	0,55	0,05	0,91	0,08	0,42	0,017	0,49	0,03
acide linoléique/acide α -linoléique	7,8	8,1	32,5	25	9,47	7,12	36,6	29,4	18	44
ANC en acide α -linoléique couverts par 100 g de viande (%)	16	13,5		2,5		4		0,85		1,5

* calculé à partir des données de Dalle Zotte (2004) : calcul approximatif à partir de la teneur lipidique moyenne de chaque viande (porc : 8,73 g /100 g ; taurillon : 9 g/100 g ; veau : 4 g/100 g ; poulet : 6,6 g/100 g) et des quantités d'acides gras en % d'acides gras totaux
 ANC : Apports Nutritionnels Conseillés

I.1.3.3 Apport glucidique

La teneur glucidique des viandes est tout à fait négligeable : elles contiennent environ 1% de glucides, principalement sous forme de glycogène. Cette quantité minime de glycogène présente dans le muscle est hydrolysée naturellement après l'abattage de l'animal et ne se retrouve donc pas dans la viande au moment de la consommation.

I.1.3.4 Apport énergétique

La teneur en lipides influence directement la valeur énergétique d'un aliment. Les parties les plus maigres du poulet et du porc semblent peu énergétiques contrairement à plusieurs morceaux du porc et du bœuf (Tableau 4).

Tableau 4 : Apport énergétique moyen de la viande de différentes espèces animales

	Lapin	Bœuf	Poulet	Porc	
Source	Combes (2004)	Gigaud et Combes (2007)(a)			Ciquel 2008
Apport énergétique (kcal/100 g)	muscle LL : 144,3 côtes : 199 râble : 229,9	faux-filet : 210,5	blanc : 116,8 cuisse avec peau : 199	filet maigre : 122,3	rôti : 146 côte : 175 travers : 234 poitrine : 252

I.1.3.5 Vitamines, minéraux et oligo-éléments

➤ *Apports en minéraux et oligo-éléments*

Une grande variété de minéraux et d'oligo-éléments sont présents dans le muscle (Tableau 5). Indépendamment du taux de fer, les teneurs en minéraux et oligo-éléments des viandes issues de différentes espèces sont relativement proches. Les produits carnés sont aussi une source alimentaire importante de zinc, sauf pour la viande de lapin.

Etant donné l'importance de la concentration du fer dans la viande et de son rôle majeur dans le déroulement des phénomènes d'oxydation, un paragraphe détaillé lui a été consacré.

Tableau 5 : Composition moyenne en vitamines, minéraux et oligo-éléments de la viande

Source	Unité	ANC	AJR*	Lapin				Porc	Taurillon	Veau	Poulet
				Dalle Zotte (2004)	Gigaud (2006)	Ciquel (2008)	Combes (2004)				
Vitamine B1	mg	1,3	1,1	0,18	0,04-0,1	0,04	0,08	0,38-1,12	0,07-0,1	0,06-0,15	0,06-0,12
Vitamine B2	mg	1,6	1,4	0,09-0,12	0,18-0,21	0,18	0,12	0,1-0,18	0,11-0,24	0,14-0,26	0,12-0,22
Vitamine B3	mg	14	16	3-4	10,4-9	10,4	9,6	4-4,8	4,2-5,3	5,9-6,3	4,7-13
Vitamine B5	mg	5	6		1,1-0,5	1,1	0,6				
Vitamine B6	mg	1,8	1,4	0,43-0,59	0,18-0,13	0,18	0,34	0,5-0,62	0,37-0,55	0,49-0,65	0,23-0,51
Vitamine B8	µg	50	50		7-9		0,7				
Vitamine B9	µg	300	200	10	←2-←2.1	←20	5	1	5-24	14-23	8-14
Vitamine B12	µg	2,4	2,5		2,9-2,2	2,9	6,8				
Vitamine E	mg	12	12	0,01-0,4	1,47-1,12		0,19	0-0,11	0,09-0,2	0,17-0,26	0,13-0,17
Calcium	mg	900	800	2,7-9,3	20	22,3	16	7-8	10-11	9-14	11-19
Cuivre	mg	2	1			0,06	0,33				
Fer	mg	9	14	1,1-1,3		0,7	1,4	1,4-1,7	1,8-2,3	0,8-2,3	0,6-2,0
Magnésium	mg	420	375		22,6-21,8	26,3	24				
Phosphore	mg	750	700	222-230	200	162	277	158-223	168-175	170-214	180-200
Potassium	mg	585	2000	428-431	360-340	318	364	300-370	330-360	260-360	260-330
Sélénium	µg	60	55		90-73	90	77				
Sodium	mg	3 200		37-47	46,9-63,2	107	49	59-76	51-89	83-89	60-89
Zinc	mg	12	10	0,7-1,3		1,27	0,69				

- Teneur en fer dans la viande

D'un point de vue nutritionnel, la fraction minérale des viandes est connue pour sa richesse en fer. Le fer héminique intervient principalement dans la constitution (i) de la myoglobine, (ii) mais aussi de l'hémoglobine, un pigment respiratoire des globules rouges qui assurent les échanges gazeux avec le milieu extérieur, et (iii) de quelques enzymes (Soucheyre, 2008). La forme non héminique, qui représente seulement 25 à 35% du fer total dans le tissu musculaire, est localisée dans les protéines de transport (la transferrine) et, en plus grande proportion, dans les protéines de stockage comme la ferritine. La teneur en fer de la viande est très variable selon les espèces. Cette variabilité permet de distinguer les viandes blanches comme le poulet, la dinde et le lapin, ayant un taux de fer de 0,3 à 4 mg / 100 g de viande (Anderson & Fitzgerald, 2010), des viandes les plus rouges, telles que le bœuf ou la viande chevaline, où le taux de fer va jusqu'à 5 mg pour 100 g de viande (Bauchart & Gandermer, 2010) (Figure 4).

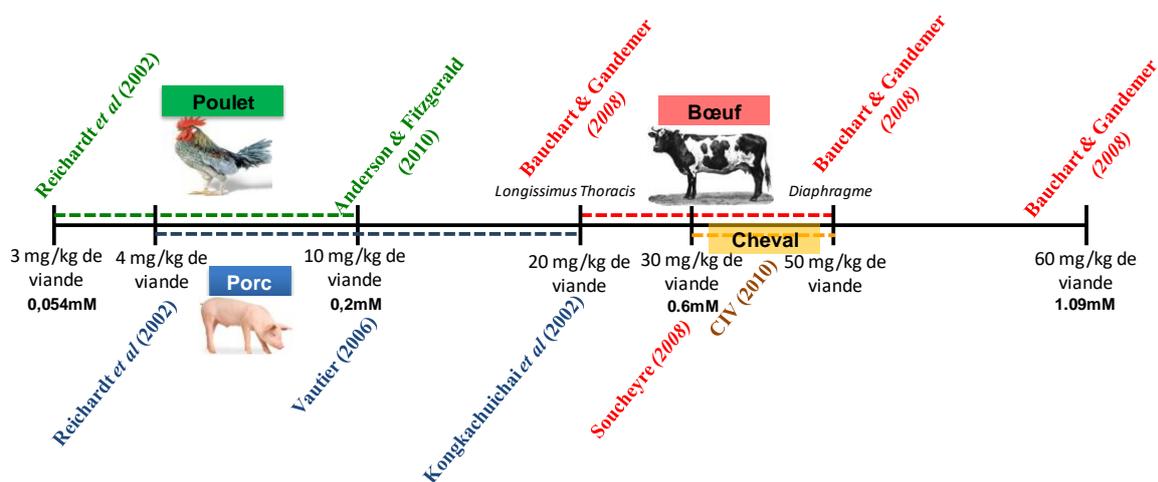


Figure 4 : Teneurs en fer total dans les tissus musculaire et abats issus de différentes espèces animales

La teneur en fer héminique est dépendante du taux de myoglobine dans le muscle et ce dernier est lié au type métabolique des fibres. En 2012, Cross et al. ont développé une méthode analytique afin de quantifier les différentes formes de fer présentes dans différents morceaux et ont ainsi pu mettre au point une base de données sur les quantités de fer héminique (FH) présentes dans les produits à base de viande (Cross *et al.*, 2012). Les teneurs de FH présentes dans différents type de morceaux de viande et de charcuteries sont présentés dans le Tableau 6. Comme nous pouvons le voir dans ce tableau, la viande de porc, considérée dans les études épidémiologiques comme viande rouge, est, selon les morceaux, moins riche en fer héminique que le poulet, considéré lui comme une viande blanche. Ainsi, le classement en viande rouge

ou blanche utilisé dans les études épidémiologiques se réfère plutôt au type de viande, la viande de boucherie étant considérée comme rouge et la volaille comme blanche.

Tableau 6 : Teneur en fer héminique en $\mu\text{M/g}$ de viande et de charcuterie (tiré de Sinha *et al.*, 1998 ; Cross *et al.*, 2012)

<i>Type de viande</i>	<i>Teneur en fer héminique ($\mu\text{g/g}$)</i>
<i>Steak de bœuf (Longe)</i>	9,3
<i>Rôti de bœuf (Rond de gîte)</i>	8,3
<i>Steak haché (15% matière grasse)</i>	10,3
<i>Porc (Côtelette)</i>	3,5
<i>Poulet (Cuisse)</i>	5,1
<i>Poulet (Blanc)</i>	2,4
<i>Jambon blanc</i>	7,6
<i>Hot dog</i>	6
<i>Bacon</i>	4,9

- Focus sur le fer héminique

Chez les mammifères, l'hème est inclus dans les hémoprotéines comme l'hémoglobine ou la myoglobine (Figure 5). Ces hémoprotéines sont indispensables au stockage et au transport de l'oxygène dans l'organisme. La myoglobine (transporteur de l'oxygène dans le muscle) est le principal pigment responsable de la couleur de la viande. C'est une chromoprotéine constituée :

- d'un groupement héminique l'hème composé d'un noyau porphyrine renfermant en son centre un atome de fer (Figure 6). La capacité de l'atome de fer à changer d'état d'oxydation en fait un catalyseur biologique polyvalent qui peut être impliqué dans les réactions d'oxydation, de transfert d'électron, et qui peut fournir de l'oxygène aux cellules.
- d'une protéine : la globine.

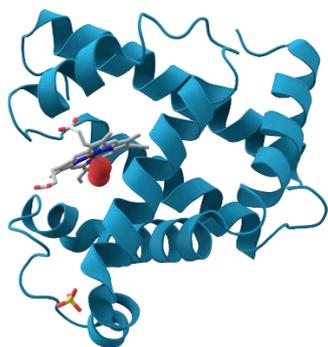


Figure 5 : Structure 3D de la myoglobine

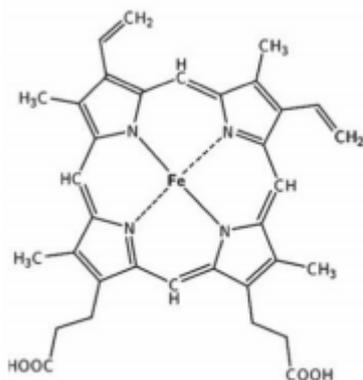


Figure 6 : Structure de l'hème (Bastide *et al.*, 2011)

La viande rouge est la source alimentaire la plus riche en fer héminique lequel est mieux absorbé lors de la digestion que le fer non héminique (Layrisse *et al.*, 1969 ; Carpenter and Mahoney, 1992).

L'intensité de la couleur rouge de la viande renseigne sur sa teneur en pigment héminique. Ainsi, plus la viande est rouge, plus elle renferme de fer héminique. La viande rouge crue est riche en oxymyoglobine et en oxyhémoglobine sur la surface du muscle et en deoxymyoglobine et en déoxyhémoglobine à l'intérieur du muscle. Le fer héminique peut prendre deux états d'oxydoréduction. La forme réduite correspond au pigment du muscle en profondeur et à celui de la viande conservée sous vide. Au contact de l'air et du froid, la myoglobine se combine avec l'oxygène formant ainsi l'oxymyoglobine, de couleur rouge vif. Cette teinte de la viande est synonyme de fraîcheur et donc recherchée par le consommateur. Au-delà d'un certain délai influencé par les propriétés intrinsèques de la viande (pH, potentiel d'oxydoréduction, ...) la couche d'oxymyoglobine disparaît au profit de la metmyoglobine de couleur brune. L'atome de fer est alors sous forme ferrique (Fe^{3+}) (Figure 7). Dans la viande rouge cuite, la myoglobine

et l'hémoglobine « résiduelle » sont dénaturées et forment les hémichromes et les hémochromes. Les hémichromes sont les formes oxydées des hémoprotéines dénaturées et sont responsables de la couleur brune des viandes et des charcuteries cuites. Les hémochromes sont les formes réduites des hémoprotéines dénaturées et sont responsables de la couleur rose intérieure des viandes rouges et des charcuteries cuites (Tappel *et al.*, 2007). Dans les charcuteries nitritées, contrairement à la viande rouge, l'hème est sous forme nitrosylé en raison de l'ajout de nitrites qui se retrouvent principalement sous forme d'ions nitrites NO_2^- . L'ajout d'acide ascorbique, afin d'éviter la formation de nitrosamines cancérigènes, va favoriser les réactions de nitrosylation et donc former un pontage entre les ions nitrites et l'atome de fer de l'hème ce qui aboutit à la formation d'hème nitrosylé (Pegg and Shahidi, 2000).

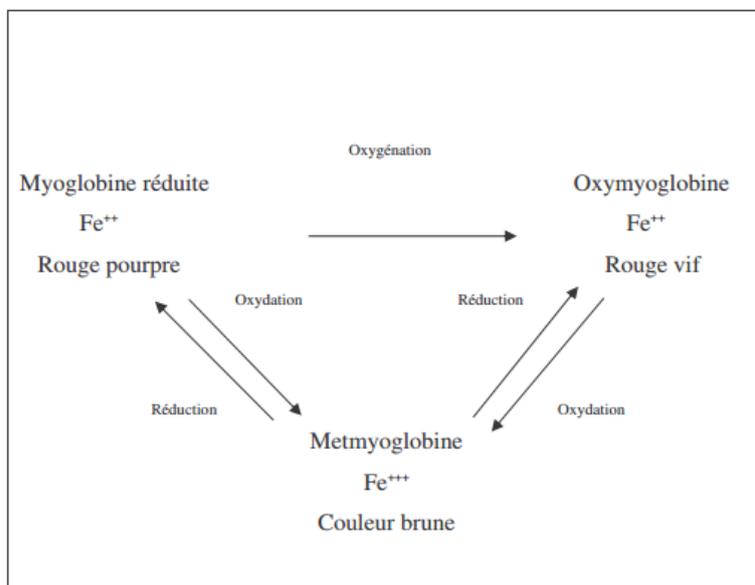


Figure 7 : Etats d'oxydation du fer héminique

- **Conversion du fer héminique en fer non héminique**

Des travaux ont montré que le fer héminique peut se transformer en fer non héminique durant les traitements à la chaleur (Lombardi-Boccia *et al.*, 2002 ; Kongkachuichai *et al.*, 2002 ; Purchas *et al.*, 2003). La diminution de la teneur en fer héminique serait dû au fait qu'il est dégradé à haute température et converti en fer non héminique. De plus, le traitement thermique des viandes favoriserait la conversion du fer soluble en fer insoluble, le fer soluble étant plus biodisponible que le fer insoluble tout comme le fer héminique comparé au fer non héminique (Purchas *et al.*, 2003) (Figure 8).

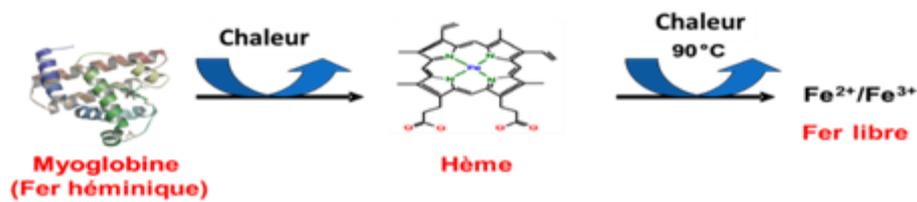


Figure 8 : Libération du fer héminique à partir de la myoglobine sous l'effet de la température

Ainsi, la cuisson de la viande induit :

- La conversion du fer héminique en fer non héminique par clivage oxydatif de l'hème,
- La conversion du fer héminique soluble en insoluble par dénaturation thermique de la globine,
- La conversion du fer ferreux (Fe²⁺) en fer ferrique (Fe³⁺).

Ces évolutions sont d'autant plus intenses que la température et le temps du traitement thermique appliqué à la viande augmentent (Martinez-Torres *et al.*, 1986 ; Purchas *et al.*, 2003).

- Absorption du fer non héminique et héminique lors de la digestion des viandes

Le fer non héminique est libéré des complexes auxquels il est lié dans les aliments par les sécrétions gastriques (sécrétion peptique, HCl). Une fois libéré, il entre dans un pool gastrique où il peut être réduit, chélaté ou rendu insoluble. Les composés ferreux (Fe²⁺) sont mieux absorbés que les composés ferriques (Fe³⁺) car le fer divalent forme facilement des chélates solubles en milieu légèrement basique. Le fer trivalent n'est soluble qu'à pH 5 ; il peut alors se complexer à certains peptides et polysaccharides qui peuvent être ensuite absorbés. Le Fe³⁺ peut aussi être réduit en Fe²⁺. Le fer ferrique, qui n'est ni réduit ni chélaté, forme des complexes insolubles et est peu ou pas absorbé. Le fer bivalent ainsi obtenu est transféré au cytoplasme par l'intermédiaire de certains transporteurs transmembranaires de cations bivalents (DMT1 : "divalent metal transporter 1") (Herberg & Galan, 1989). Une fois libéré, le fer est absorbé au niveau du duodénum-jéjunum et transporté au niveau de la moelle et du foie où il est stocké et utilisé par les jeunes hématies de la moelle hématopoïétique pour la formation de l'hémoglobine.

L'absorption du fer héminique n'est pas influencée par le pH et peu influencée par les sécrétions gastriques. Contrairement au fer non héminique, le fer héminique n'est pas capté par les

récepteurs de la bordure en brosse de la muqueuse intestinale. Le mécanisme d'absorption n'est pas connu, mais l'endocytose semble jouer un rôle prépondérant. On ne sait pas précisément si c'est l'hème seul ou sous forme complexée avec la globine qui pénètre dans la cellule. Une fois dans l'entérocyte, le fer est extrait du noyau porphyrinique de l'hème par des oxygénases puis suit le même chemin que le fer absorbé sous forme ionique.

- Biodisponibilité du fer non héminique et héminique

La biodisponibilité du fer dans l'organisme humain est influencée par des facteurs diététiques et des facteurs individuels. Plus que la quantité totale de fer présent dans l'alimentation, c'est surtout la quantité de fer assimilable qui constitue le facteur déterminant pour couvrir les besoins. En effet, diverses études impliquant des aliments marqués au fer radioactif (^{55}Fe , ^{59}Fe) ont mis en évidence que l'absorption moyenne de fer chez des sujets en bonne santé est très variable d'un aliment à l'autre (Hercberg & Galan, 1989). Ces différences s'expliquent par la forme sous laquelle le fer est apporté par les aliments : fer héminique ou fer non héminique. On constate donc que la biodisponibilité de ces deux formes de fer varie en fonction des aliments dans lesquels elles se retrouvent. En tenant compte de la différence existant entre les deux types de fer alimentaire, il est clair que le consommateur devrait donc s'attacher à la biodisponibilité du fer héminique influencée par les facteurs alimentaires comme le pH et la composition de la sécrétion digestive et d'autres constituants du repas.

- Les apports quotidiens conseillés en fer

Pour faire face à ses besoins en fer, l'organisme doit trouver dans son alimentation la quantité de fer nécessaire. Le fer est présent en quantité variable dans de nombreux aliments, mais seule une fraction du fer consommé est réellement absorbée. Donc, les apports "réels" en fer dépendent de la teneur en fer de l'alimentation, mais également de la biodisponibilité de ce fer. Les apports doivent tenir compte d'une absorption intestinale faible, de 5 à 30 % selon la forme alimentaire du fer (très grossièrement 5% pour le fer non héminique et 30% pour le fer héminique).

➤ *Fraction vitaminique*

Les vitamines sont des constituants organiques subdivisés en deux grandes familles : les hydrosolubles (groupe B et C) et les liposolubles (A, D, E et K1). La majorité des vitamines de la viande appartiennent au groupe B (Tableau 5). La viande bovine apporte de 3,7 à 5,8 mg/100

g de vitamine B₃ ou niacine, 0,15 à 0,51mg/100 g de vitamine B₆ ou pyridoxine et 1,2 à 7,2µg/100 g de vitamine B₁₂ (Tableau 5). 100 g de viande de lapin apportent en moyenne des quantités tout à fait significatives de :

- vitamine B₃ : 21 % à 74 % des ANC en vitamine B₃ couverts,
- vitamine B₁₂ : 121 à 283 % des ANC en vitamine B₁₂ couverts.

I.1.4 Composition de la viande transformée : exemple des charcuteries

A l'origine, la charcuterie est une méthode de conservation de la viande. Toute charcuterie fait l'objet d'une salaison avec un mélange de sel et de nitrate de potassium, ou de sel et de nitrite de sodium. Les charcuteries contiennent 10 à 20 % de protéines. Les jambons cuits ou secs en sont les plus riches. Cette catégorie d'aliments se caractérise surtout par sa richesse en lipides : 20 à 35 % pour les saucisses, saucissons cuits, pâté de foie et 35 à 40 % pour les rillettes, saucissons secs et salamis. Seuls les jambons débarrassés de leurs graisses contiennent moins de 10 % de lipides. La composition de ces lipides se rapproche de celle des graisses animales.

La viande est une source importante de fer. Son oxydation entraîne la formation de radicaux libres. Le paragraphe I.2 décrit les principaux radicaux libres produits suite à l'oxydation du fer non héminique, forme à laquelle on s'intéresse dans cette thèse. Les mécanismes d'oxydation de ce fer non héminique seront détaillés dans la partie III.1.1.

I.2 Les radicaux libres

D'après Larousse médical, les radicaux libres sont des molécules présentes dans certaines cellules et possédant en périphérie un électron célibataire (isolé et se libérant facilement). Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent dans les milieux biologiques l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc. Ils proviennent de l'action de rayonnements producteurs d'énergie (lumière, rayons X) et de réactions biochimiques sur l'oxygène. Ils seraient très toxiques pour les cellules s'il n'existait des substances chargées de les neutraliser (catalase, glutathion, etc.).

De par leur très grande réactivité, les radicaux libres sont fortement impliqués dans la dégradation oxydative des aliments avec des répercussions aux niveaux des qualités sensorielles et nutritionnelles des produits. D'un point de vue médical, certains phénomènes de vieillissement et maladies (athérosclérose) pourraient être par l'accumulation des radicaux libres dans l'organisme.

I.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle (OH^{\cdot}), monoxyde d'azote (NO^{\cdot}),...), et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Novelli, 1997). Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. La probabilité entre ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré. Si cette instabilité est modérée, la probabilité d'accepter un second électron est grande et, dans ce cas, le radical libre ne présente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydoréduction classique. Si au contraire cette instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré à une autre molécule. Plus cette instabilité est grande, moins la réaction est spécifique. En d'autres termes, l'électron passe sur une molécule non prévue à cet effet. Parmi ces molécules, certaines deviennent très réactives vis-à-vis de l'oxygène et subissent une oxydation définitive. Pour autant, le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas et l'électron libre peut passer sur d'autres molécules, entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique. Pour arrêter cette réaction en chaîne, certaines

molécules sont capables de céder un de leurs électrons. La molécule radicalaire acceptant ce second électron perd son caractère radicalaire. En revanche, la molécule ayant perdu un seul électron devient radicalaire et peut théoriquement générer une nouvelle réaction en chaîne. Toutefois, si cette nouvelle espèce radicalaire est relativement stable, elle va avoir le temps de compléter sa réaction d'oxydoréduction, soit en se régénérant (en regagnant un électron) soit en s'oxydant (en perdant un deuxième électron). En impliquant un électron libre dans une réaction d'oxydoréduction classique, ces molécules diminuent les phénomènes d'oxydation en chaîne et sont qualifiées de piègeurs de radicaux (scavenger dans la littérature internationale). Alternativement, deux radicaux libres peuvent réagir entre eux pour mettre fin au processus radicalaire. C'est notamment les cas entre deux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou entre le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) ; la première réaction engendrant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la seconde du peroxynitrite ($ONOO^-$). Contrairement aux réactions impliquant des piègeurs, ces réactions produisent des molécules toxiques au même titre que les radicaux libres dont elles dérivent et ne participent pas à la lutte contre le stress oxydatif (Fontaine, 2001).

I.2.1.1 Origine des espèces réactives de l'oxygène

Paradoxe de l' O_2

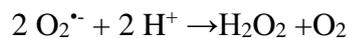
L'oxygène est indispensable au fonctionnement cellulaire mais est la source d'espèces réactives qui peuvent oxyder des macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides. Cependant, ces espèces réactives sont également des produits essentiels au fonctionnement cellulaire ; elles seraient impliquées dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée et agiraient comme second messager (Droge, 2002). Dans la cellule, il existe donc un équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et leur élimination. Le stress oxydant est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur de la production d'espèces réactives qui conduit à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels. Ce déséquilibre pro/antioxydant peut avoir une origine exogène : molécule oxydante comme l' O_2 , ou une origine endogène telle que des dysfonctionnements de certaines sources de production ou des systèmes d'élimination.

I.2.1.2 Production endogène des radicaux libres

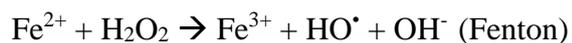
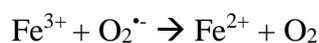
➤ *Le radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$*

Dans les produits carnés, la production d' $O_2^{\cdot-}$ provient principalement de l'oxydation de la myoglobine. L'hémoglobine et la myoglobine sont des transporteurs d'oxygène qui le lient au

niveau du Fe^{2+} de leur hème. Une délocalisation électronique sur l'oxygène peut conduire à la formation de $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de met-hémoglobine (hème- Fe^{3+}) ne pouvant plus lier l'oxygène (Nagababu *et al.*, 2004). Si cet anion est libéré dans un milieu protoné, il subit une dismutation, phénomène au cours duquel l'anion $\text{O}_2^{\cdot-}$ cède son électron célibataire à un autre anion superoxyde qui devient l'anion O_2^- ; ce dernier réagit alors avec les protons du milieu pour donner le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Bien que $\text{O}_2^{\cdot-}$ puisse être à la fois oxydant ($\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$: + 900 mV/ENH) et réducteur ($\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$: - 160 mV/ENH) (Pierre et Fontecave, 1999), il est généralement considéré comme peu réactif chimiquement vis-à-vis des systèmes biologique (Bielski et Richter, 1977). A concentration physiologique, estimée à environ 10^{-10} M, l'anion superoxyde ne réagit pas en général avec les acides aminés des protéines à moins qu'elles n'aient un groupement thiol accessible. Dans ce cas, il peut alors oxyder le groupement thiol et modifier sa fonctionnalité (Imlay, 2003). Le superoxyde peut néanmoins oxyder certains sucres et créer des composés dicarbonylés réactifs avec les groupes amino des protéines et de l'ADN (Okado-Matsumoto et Fridovich, 2000). Cependant, en solution aqueuse il est très instable et tend à se dismuter spontanément et rapidement.



En milieu acide, $\text{O}_2^{\cdot-}$ se protone pour donner le radical $\text{HO}_2 \cdot$ ($\text{pK}_a = 4,8$). Le radical $\text{HO}_2 \cdot$ est beaucoup plus réactif que $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Gebicki et Bielski, 1981). Cependant sa réactivité biologique est très limitée car $\text{HO}_2 \cdot$ n'est présent qu'en très faible quantité à pH physiologique. Pendant longtemps la toxicité du superoxyde a été associée à sa capacité à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , favorisant ainsi la réaction de Fenton et la formation du radical d'hydroxyle $\text{HO} \cdot$ qui est très toxique (Halliwell et Gutteridge, 1986). Le bilan de cette réaction est rapporté sous le nom de Haber-Weiss :



Cependant, même si *in vitro* l'anion superoxyde peut être réducteur de Fe^{3+} , *in vivo*, compte tenu des concentrations en fer et superoxyde, cette réaction est beaucoup trop lente pour effectivement pouvoir se dérouler (Imlay, 2003).

➤ *Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2*

L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène H_2O_2) est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse plus facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. H_2O_2 est un oxydant puissant, le couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}^\bullet$ possède un potentiel d'oxydoréduction de + 460 mV/ENH. Le peroxyde d'hydrogène qui est une molécule neutre peut diffuser et conduire à la formation de radicaux libres loin de son lieu de formation. H_2O_2 peut se déprotoner pour donner l'anion hydroperoxyde (HO_2^-) (pKa 11,8) et l'ion peroxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) (pKa >14). Cependant ces espèces ne sont pas produites à pH physiologique. La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle OH^\bullet en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction dite de Fenton) ou Cu^{2+} .



Deux sources sont à l'origine de la production de ces peroxydes dans la viande :

- I. l'oxydation de la myoglobine produit un radical superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) qui est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène,
- II. l'oxydation du glucose produit, aussi, un radical superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) qui se dismute en peroxyde d'hydrogène ;

En présence d'oxygène, la myoglobine s'oxyde facilement pendant la maturation de la viande. Selon une estimation à partir des concentrations en fer héminique présents dans la viande de porc (comprises entre 0,3 à 0,6 mg pour 100 g (Vautier, 2006)) et dans la viande bovine (de 1,6 à 2,5 mg pour 100 g (Soucheyre, 2008)), l'oxydation totale de la myoglobine peut produire au maximum entre 50 μM de peroxyde d'hydrogène pour une viande blanche et 450 μM pour une viande rouge : la viande blanche a une plus faible concentration en myoglobine.

De plus, la production de peroxyde d'hydrogène à partir de l'oxydation totale du glucose d'une viande contenant 0,05% de glucose (Lawrie & Ledward, 2006) peut être estimée à environ 2800 μM . Notons que cette production est difficile à estimer, car elle dépend de la quantité de glycogène non transformé en acide lactique *post mortem* et de l'oxydation du glucose qui est influencée par la présence de métaux.

➤ *Le radical hydroxyle HO[•]*

HO[•] est donc généré essentiellement à partir de H₂O₂ via la réaction de Fenton (Wink et coll, 1994). Le couple HO[•] /OH possède un potentiel d'oxydoréduction de + 1,2 V/ENH et une demi-vie en milieu biologique, d'environ 10⁻⁹ s à 37 °C (Pryor, 1986). Le radical hydroxyle est très réactif. C'est le plus puissant oxydant qui puisse être généré au sein des cellules. Il réagit instantanément de façon non sélective, aux limites de la vitesse de diffusion, avec toutes les macromolécules biologiques, sucres, acides aminés, phospholipides, nucléotides, ainsi qu'avec les acides organiques (Valentine et coll, 1998). Il est donc extrêmement toxique pour la cellule. En général, il réagit par arrachement d'un atome d'hydrogène d'une liaison C-H, conduisant à la formation concomitante d'un radical organique. Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis de matériaux biologiques, il est très oxydant. Il peut initier une peroxydation lipidique (Gutteridge, 1995) qui pourra se propager en chaîne. C'est le radical le plus dangereux pour l'organisme.

Afin de détecter les radicaux libres produits dans le milieu mimétique de la viande, plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature dont la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). L'avantage d'une telle méthode est qu'elle est utilisable en milieu turbide, néanmoins, l'instrumentation RPE n'est pas universellement répandue dans les laboratoires de par son coût élevé, et sa sensibilité limitée en milieu biologique. De plus, cette méthode est applicable lorsque les radicaux libres sont produits en quantités relativement élevées. Dans une étude de comparaison entre deux méthodes de détection d'EROs (la RPE et la Microscopie confocale), dans des cultures cellulaires et des mitochondries isolées, d'autres inconvénients de la RPE ont été cités tel que la délicate interprétation des spectres (Kuznetsov *et al.*, 2011). Pour l'étude des cinétiques dans un milieu simple, la méthode des sondes est plus adéquate.

I.2.2 Détection de l'anion superoxyde

I.2.2.1 Choix de la méthode

Les milieux mimétiques utilisés dans cette thèse sont des milieux aqueux à base de tampon phosphate. Les conditions physico-chimiques (température, pH, concentrations des réactants) ont été modifiées pour mimer certains procédés : conservation cuisson, salage, marinade, digestion. Les sondes sont généralement utilisées comme indicateur non quantitatif (Auclair, 1985). Certaines sondes sont incompatibles avec nos milieux expérimentaux. L'Epinephrine est, par exemple, peu soluble en milieu aqueux. La Ferricytochrome est instable à la chaleur (Tableau 7). Toutefois, l'utilisation d'une sonde est très répandue en biologie (Armstrong &

Whiteman, 2007 ; Fridovich, 1997 ; Gomes, Fernandes, & Lima, 2005 ; Tarpey, Wink, & Grisham, 2004). Dans cette étude, on a choisi le NitroBlueTetrazolium (NBT).

Tableau 7 : Principales inadéquations des sondes de piégeage des radicaux superoxydes avec les milieux mimétiques de la viande et du système digestif

<i>Sondes</i>	<i>Inconvénients</i>
<i>Ferricytochrome</i>	libération du fer à forte température (>70°C) (Witmer, 2012)
<i>Epinephrine/adrénaline</i>	Peu soluble dans l'eau
<i>Hydroxylamine</i>	Oxydation de cette sonde indépendamment des superoxydes (Moews Jr & Audrieth, 1959)
<i>Pyrogallol</i>	Signal pas très stable émis par le produit formé (Deeble <i>et al.</i> , 1988)
<i>Carbonate</i>	La luminescence est difficilement quantifiable ***
<i>Bilirubine</i>	Sa réaction avec le radical superoxyde n'est pas bien identifiée et sa spécificité de la bilirubine pour les superoxydes est inconnue Peu soluble dans l'eau (Witmer, 2012)

I.2.2.2 Choix d'une sonde : Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

Le choix du NBT s'est basé sur plusieurs critères. En effet, cette sonde est très bien décrite dans la littérature et est très utilisée en biologie. Le NBT est soluble dans l'eau, stable thermiquement, spécifique des radicaux superoxydes et le mécanisme de la réaction entre l'anion ($O_2^{\circ-}$) et le NBT est connu. La réduction du NBT par l' $O_2^{\circ-}$ mène à la formation du Monoformazan (MF) et/ou du Di-formazan (DF). Ceci dépend du ratio NBT/ $O_2^{\circ-}$ (Liu *et al.*, 2009). Le coefficient d'extinction (ϵ) du MF le plus cité dans la littérature est égal à 12,8 mM⁻¹

$^1\text{cm}^{-1}$. Le tableau ci-dessous (Tableau 8) est une synthèse des Coefficients d'absorbance du formazan cités dans la littérature. Le coefficient d'extinction (ϵ) du DF est deux fois plus grand que celui du MF. La somme des MF et DF mesurée sera calculée dans la suite de la thèse et appelée formazan. La sonde NBT sera présentée en détail est dans la partie III.1.2.

Tableau 8 : Coefficients d'absorbance du Monoformazan (MF) indiqués dans la littérature

<i>Auteurs</i>	<i>Conditions</i>	<i>Milieu biologique</i>	<i>Valeurs</i>
<i>Rouet et al., 2005</i>	pH= 7,8 Absorbance= 530 nm	Fraction de cellules végétales	12,8 mM ⁻¹ cm ⁻¹
<i>Rouet et al., 2005</i>	pH= 6,25 Absorbance= 530 nm	Fraction de cellules végétales	12,8 mM ⁻¹ cm ⁻¹
<i>Tewari et al., 2005</i>	pH= 7,6 Absorbance= 510 nm T= 25°C formazan extrait par la pyridine	Tissu végétale	11,0 mM ⁻¹ cm ⁻¹
<i>Tewari et al., 2005</i>	pH= 7,4 Absorbance= 530 nm	Tissu végétale	12,8 mM ⁻¹ cm ⁻¹
<i>Van Gestelen et al., 1997</i>	pH= 7,4 Absorbance= 530 nm	Plant plasma membranes	12,8 mM ⁻¹ cm ⁻¹
<i>Tewari et al., 2005</i>	pH= 7,4 Absorbance= 530 nm formazan formé à partir de l'autoxydation du d,1-L-FH ₄	Tissu végétale (feuille)	12,8 mM ⁻¹ cm ⁻¹
<i>Thayer, 1990</i> <i>C. Auclair, & Voisin, E., 1985</i>	T= 37°C Absorbance= 560 nm pH= 9,8	Myocytes cardiaques	16,5 mM ⁻¹ cm ⁻¹

I.2.3 Détection du radical hydroxyle

I.2.3.1 Choix de la méthode

Les radicaux hydroxyles (HO^\bullet) sont très réactifs et leur durée de vie est extrêmement courte (n'excédant pas le dixième de microseconde). La méthode indirecte de détection des radicaux consiste à piéger le radical étudié par une sonde pour former un produit stable et quantifiable par fluorescence. Une bonne sonde doit satisfaire les conditions suivantes :

- La concentration en produit final doit être proportionnelle à la quantité de HO^\bullet formée.
- La sélectivité vis-à-vis de HO^\bullet doit être la plus grande possible, et l'ensemble des réactions avec les autres espèces réactives susceptibles d'accompagner HO^\bullet doit être bien établi.
- Le produit final étudié doit être stable chimiquement pour pouvoir être observé sur des temps longs.

De nombreux articles rapportent l'utilisation de sondes nécessitant différentes techniques spectroscopiques. Cependant, il est très difficile d'établir une échelle de sensibilité pour ces techniques car leurs limites sont rarement précisées par les auteurs. La mesure de sensibilité requiert de connaître la quantité de radical hydroxyle formé, ce qui est possible par radiolyse, mais pas lorsqu'il est produit par la réaction de Fenton, utilisée dans nos expériences. La détection via l'utilisation des sondes nous est apparue comme particulièrement intéressante car elle constitue une technique sensible et maîtrisée dans notre laboratoire. On distingue des sondes par absorption et des sondes par fluorescence. Parmi les sondes par absorption, il y'a : Le désoxyribose : le radical hydroxyle réagit avec ce dernier pour donner un composé qui lui-même réagit avec l'acide thiobarbiturique pour donner un composé dérivé du malondialdéhyde, absorbant à 532 nm (Aruoma, 1994). Cette méthode lourde ne permet pas un suivi en direct des réactions radicalaires Cette méthode a été aujourd'hui supplantée par l'utilisation de 4-nitrophénol (Singh & Hider, 1988), puis de l'acide salicylique (Cheng, Jen, & Tsai, 2002). Le salicylate est connu pour avoir une affinité importante pour le Fe III, ce qui peut poser problème lors de nos expériences où le radical hydroxyle est obtenu par la réaction de Fenton (Kaur, 1994). La phénylalanine a été proposée comme alternative à l'acide salicylique car elle montrait moins d'activité biologique, mais a l'inconvénient d'avoir une vitesse de réaction plus faible avec HO^\bullet ($2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \text{ s}^{-1}$). (Kaur, 1994 ; Sun *et al.*, 1993 ; Biondi *et al.*, 2006)

Différentes sondes de fluorescence ont été décrites dans la littérature, notamment :

- L'acide benzoïque qui réagit avec le radical hydroxyle pour former l'acide salicylique ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$) a une bonne sensibilité car permet en solution aqueuse de mesurer

des doses faibles (0,05 Gy, soit 14 nmoles.dm⁻³ de HO[•]), l'inconvénient majeur étant la formation de plusieurs produits de substitution (ortho, méta, para) avec des constantes réactionnelles différentes ce qui rend l'analyse difficile.

I.2.3.2 Choix d'une sonde : le téréphtalate (TP)

Le téréphtalate (TP) a été retenu pour les raisons suivantes : l'addition de HO[•] sur l'une des quatre positions aromatiques non substituées de l'acide téréphtalique conduit à un seul produit de substitution, le 2-hydroxytéréphtalate fluorescent ($\lambda_{exc} = 315$ nm et $\lambda_{em} = 425$ nm) (Šnyrychová & Hideg, 2008). La sensibilité du système, précisée par les auteurs, est très bonne car permet de mesurer des doses très faibles (soit 3 nmoles.dm⁻³ de HO[•]). Il constitue une bonne sonde du radical hydroxyle (Qu, Kirschenbaum, & Borish, 2000; W. A. Armstrong, 1963) ayant notamment été utilisée pour mettre ce dernier en évidence au cours d'études sur l'ADN (C. Bohne, 2005). L'acide téréphtalique est caractérisé par une bonne solubilité en milieu aqueux et une bonne stabilité thermique. Cette sonde n'est pourtant pas exempte de critiques : l'acide téréphtalique réagissait également avec le radical superoxyde (Novak, 1995). D'autre part, contrairement à ce qui est dit dans plusieurs références bibliographiques, le schéma réactionnel du TP avec (HO[•]) est complexe. En effet, plusieurs réactions élémentaires mènent à la formation du (HTP) (Fang, Mark, & Sonntag (von), 1996).

Toutes les informations relatives au schéma réactionnel du TP et aux constantes de vitesses seront détaillées dans la partie IV.2.1.

I.3 Dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Un effet seuil a été identifié pour caractériser l'influence des phénomènes radicalaires sur la qualité des viandes, ces phénomènes présentant d'abord une intensité modérée induisant un effet bénéfique sur la flaveur des aliments sans danger particulier pour la santé du consommateur. La production excessive d'ERO provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. Il faut savoir que la peroxydation des lipides est l'un des premiers mécanismes de dégradation de la qualité des viandes qui peut se manifester par la détérioration de la flaveur, la texture, la valeur nutritionnelle associée à la production de composés toxiques mais également la couleur.

Cette question de la stabilité oxydative et qualités des viandes a été détaillée dans le livre de Dominique Bauchart (2010) qui a servi de référence dans la rédaction des paragraphes suivants.

I.3.1 Modifications des protéines

L'oxydation des protéines de la viande, lors de la transformation, conduit à une perte de biodisponibilité des acides aminés, soit par dénaturation chimique de ces composés, soit par diminution de la digestibilité des protéines (Gatellier et Santé-Lhoutellier, 2009). Ce phénomène, lorsqu'il touche les acides aminés essentiels, va impacter de manière négative la valeur nutritionnelle des viandes. La diminution de la vitesse de digestibilité des protéines, liée à leur oxydation et à leur agrégation, peut aussi avoir des conséquences négatives en termes de santé humaine. Il a été en effet démontré, dans plusieurs études, que l'accumulation et la fermentation dans le gros côlon de protéines non digérées dans l'intestin grêle pouvaient conduire à la formation de produits de type phénols potentiellement mutagènes (Evenepoel *et al.*, 1998).

I.3.1.1 Mécanismes biochimiques de l'oxydation des protéines et produits d'oxydation formés

Oxydation des acides aminés basiques : Les acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine) qui présentent des fonctions amines (NH ou NH₂) sur leurs chaînes latérales sont particulièrement sensibles aux attaques radicalaires. En présence de métaux, ils subissent une désamination oxydative conduisant à la formation d'un groupement carbonyle (Stadtman, 1990). Ces acides aminés basiques étant des acides aminés essentiels, la formation des groupements carbonyles entraîne une perte importante de la qualité nutritionnelle des viandes. D'autre part ces groupements carbonyles peuvent réagir avec des fonctions amines non oxydées de la lysine pour former des liaisons imines (-HC=N-). Ces liaisons imines, lorsqu'elles se forment entre des chaînes peptidiques différentes, peuvent conduire à l'agrégation des protéines.

Oxydation des acides aminés aromatiques : Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) sont aussi très sensibles à l'oxydation, en subissant des réactions d'hydroxylation sur leurs noyaux aromatiques. La phénylalanine et la tyrosine peuvent être oxydées en L-dihydroxyphénylalanine (L- DOPA) ou L-trihydroxyphénylalanine (L-TOPA), ces deux produits d'oxydation étant potentiellement des composés mutagènes (Husain et Hadi, 1995). L'oxydation de deux tyrosines voisines peut conduire aussi à la formation de dityrosine

(Morzel *et al.*, 2006). La dityrosine, quand elle se forme à partir de deux chaînes peptidiques différentes, est un facteur important d'agrégation des protéines. Le tryptophane est oxydé en hydroxytryptophane. Les métabolites de l'hydroxytryptophane (hydroxyindole et hydroxykinurénine), formés en milieu très oxydant, présentent une activité mutagénique élevée (Hashizume *et al.*, 1991). Enfin, la perte de ces acides aminés essentiels par oxydation conduit aussi à une dégradation de la valeur nutritionnelle des viandes.

Oxydation de la cystéine : L'oxydation de la cystéine conduit à la formation de ponts disulfures qui participent aussi à l'agrégation des protéines (Morzel *et al.*, 2006).

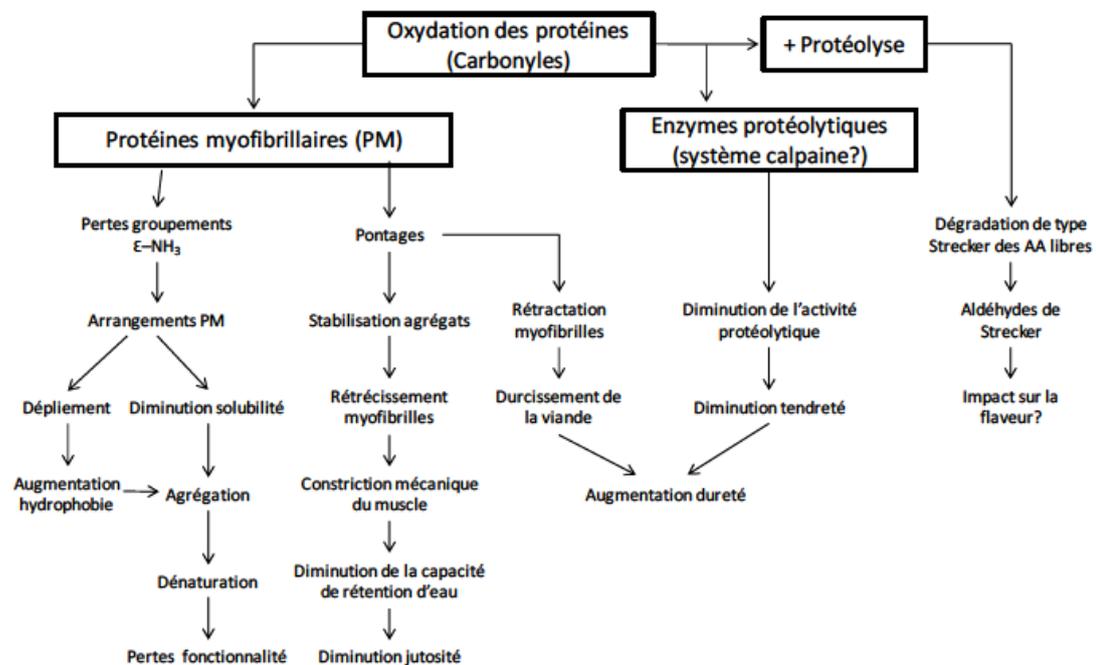


Figure 9 : Mécanismes plausibles par lesquels l'oxydation des protéines affecte les qualités technologiques et sensorielles de la viande (Estévez, 2011)

I.3.1.2 Agrégation protéique

Au cours des traitements technologiques et notamment thermiques, les protéines sont modifiées au niveau structural (dénaturation) et au niveau biochimique (oxydation). Ces modifications peuvent donner lieu à de nouvelles interactions de types protéines-protéines, protéines-lipides ou encore protéines-sucres menant ainsi à des phénomènes d'agrégation, comme le montre Estévez *et al.* (2011), et qui sont illustrés sur la Figure 9.

Si l'impact des procédés technologiques sur les modifications physicochimiques des protéines semble indéniable, les conséquences en termes de nutrition, de digestibilité, de biodisponibilité restent difficiles à appréhender car multifactorielles. En effet, certaines modifications vont entraîner ou non des pertes de fonction des protéines. L'effet peut donc être soit bénéfique soit néfaste. Cela dépend notamment du procédé utilisé, de la composition en oxydants/antioxydants et de la capacité à limiter la dénaturation protéique. Par exemple, Liu et Xiong (2000) ont montré dans le cas où la myosine était oxydée, une augmentation de la protéolyse de la myosine était alors observée. Au contraire, une étude menée par Sun *et al.* (2011) a mis en évidence à partir de protéines myofibrillaires, qu'une température de 50°C n'influence pas la vitesse d'hydrolyse par la pepsine durant les trois premières heures. Concernant la digestion par la trypsine-chymotrypsine, ils ont observé une augmentation de la vitesse de protéolyse durant les 6 premières heures. Des travaux précédents rapportés par Gatellier et Santé-Lhoutellier (2009) avaient montré que la cuisson à 100°C pendant 10 ou 30 minutes réduisait la dégradabilité des protéines par les protéases du système digestif.

I.3.1.3 Changements chimiques de la viande et génération de composés toxiques

L'assimilation défectueuse des acides aminés, causée par les changements physicochimiques des protéines suite à une cuisson, et la réduction du taux de digestion des protéines pourraient avoir un impact négatif sur la santé humaine. Les protéines non hydrolysées par les protéases sont fermentées par la flore du colon en phénol et *p*-crésol qui sont des composés mutagènes impliqués dans le cancer du côlon (Evenepoel *et al.*, 1998).

I.3.2 Modification des lipides

La viande contenant également des lipides (2-6%), il est observé une oxydation/lipoperoxydation de ces derniers lors de la maturation (Renner, 2002) et de façon très importante lors des traitements thermiques. Les lipides ayant la plus grande réactivité avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont les acides gras insaturés et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés (AGPI). Ces derniers se trouvent plus particulièrement dans les membranes des muscles. Cette oxydation des lipides entraîne des défauts de qualité sensorielle et nutritionnelle des viandes. En effet, l'oxydation des lipides induit des défauts de saveur (rancissement), de couleur (décoloration), de texture et une perte de la valeur nutritionnelle du fait de l'apparition de nombreux composés (radicaux libres à courte durée de vie,

hydroperoxydes lipidiques labiles, aldéhydes, alcanes,...) dont certains potentiellement toxiques comme le malondialdéhyde (MDA) qui est mutagène et carcinogène et les hydroxyalkénals 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) et 4-HHE (4-hydroxy-2-hexenal) qui sont des produits de terminaison des AGPI ω 6 et AGPI ω 3 respectivement et qui sont cytotoxiques (Marnett, 2000). La dégradation des lipides se fait en 3 étapes (Figure 10):

I.3.2.1 L'initiation

Dans l'organisme vivant, il y a un équilibre entre le système pro-oxydant (substances réactives à l'oxygène) et le système antioxydant qui évolue dans le sens de l'oxydation après l'abattage et peut commencer à endommager les tissus. En présence d'un initiateur comme une ERO, les lipides insaturés (LH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre (L° , radical alkyle).



Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être aussi produit par des radiations ionisantes, des activateurs chimiques, des systèmes enzymatiques produisant des espèces réactives à l'oxygène, ou des ions métalliques.

I.3.2.2 La propagation

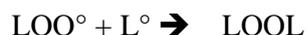
Les systèmes pro-oxydants prennent le dessus sur les systèmes antioxydants et il y a un relargage des ions métalliques, tels que le fer, contenu notamment dans la myoglobine qui va réagir avec des cofacteurs comme l'eau oxygénée pour augmenter le stress oxydatif. Les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et conduisent à des radicaux libres peroxydes instables (LOO°), qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes ($LOOH$) et des nouveaux radicaux alkyles (L°). Il est généralement admis que chaque radical alkyle (L°) peut être à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroperoxydes ($LOOH$) avant le démarrage de la phase de terminaison.



L'étape de propagation est augmentée à la suite des traitements thermiques.

I.3.2.3 La terminaison

Les radicaux formés réagissent entre eux pour former des dimères ou des polymères, ou se décomposent.



Ils génèrent alors de nombreux composés secondaires non radicalaires possédant des fonctions chimiques variées : des aldéhydes dont le MDA et les TBA-RS (Substances Réactives à l'Acide ThioBarbiturique), des 4-hydroxyalkénals (HHE/HNE), des alcanes...

Les différents composés produits lors de l'oxydation des lipides vont par la suite être impliqués notamment dans l'oxydation des protéines (Figure 10).

Plusieurs stratégies sont utilisées afin de limiter l'oxydation des lipides. La première consiste à optimiser la capacité antioxydante du muscle en apportant des antioxydants dans la ration des animaux (vitamine E, polyphénols, plantes aromatiques,...), notamment si cette ration est enrichie en acides gras polyinsaturés hautement réactifs à l'oxygène (Gobert *et al.*, 2010 ; Gatellier *et al.*, 2004, 2010). D'un point de vue technologique, il est possible de traiter directement la viande en apportant des antioxydants par imprégnation de la viande, par exemple dans les marinades, ou par simple dépôt en surface. Enfin, le mode de conditionnement des produits (sous vide ou atmosphère modifiée, opaque, température,...) va être déterminant pour limiter la propagation de la lipo-péroxydation du produit prêt à consommer.

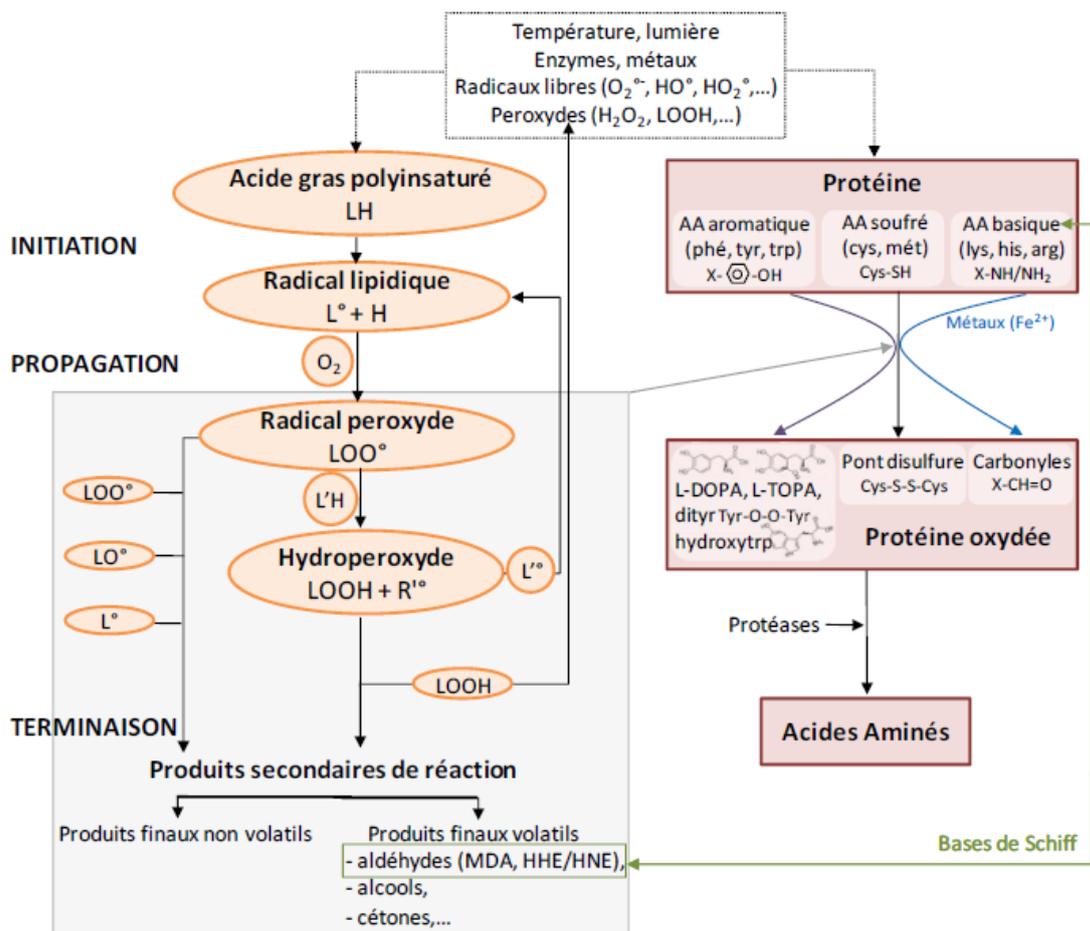


Figure 10 : Schéma simplifié montrant l'interdépendance des oxydations lipidiques et protéiques

AA: acide aminé, L-DOPA: L-dihydrophénylalanine; L-TOPA: L-trihydrophénylalanine, Dityr: dityrosine, hydroxytrp: hydroxytryptophane, MDA: malondialdéhyde, HHE: 4-hyd4-Hydroxy-2-nonenal. (adapté d'après Denys *et al.*, 2010; Gatellier & Santé-Lhoutellier, 2010; Lund *et al.*, 2011; Estévez, 2011; Stadtman & Berlett, 1997)

I.4 Les antioxydants

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation, et sont donc exogènes.

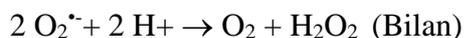
I.4.1 Les antioxydants endogènes enzymatiques

Pour contrôler la production permanente des ROS, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des ROS. Ces défenses permettent

de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ROS, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser

I.4.1.1 La superoxyde dismutase (SOD)

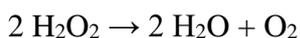
Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métallo-enzymes qui catalysent la détoxification du radical superoxyde (McCord et Fridovich, 1969 ; Jenney et coll, 1999 ; Lombard et coll, 2000). On retrouve les SODs chez pratiquement tous les organismes vivants en présence d'oxygène. Les SODs dismutent $O_2^{\bullet-}$, en H_2O_2 et O_2 (McCord et Fridovich, 1969, Fridovich, 1986). Il existe quatre types de SOD qui diffèrent par leur cofacteur métallique (Cu/Zn , Mn, Fe ou Ni) ainsi que par leur localisation cellulaire. Les SOD à Mn sont présentes dans le cytosol des bactéries, dans les mitochondries des organismes supérieurs, les chloroplastes et également dans le cytosol de certaines cellules eucaryotes (Keele et coll, 1970). Les SOD à Fe sont présentes chez les bactéries, chez certains protozoaires comme *Trypanosoma cruzi* (Temperton et coll, 1996) et quelques plantes (Yost et Fridovich, 1973). Les SODs à Cu/Zn se trouvent dans le cytoplasme, le noyau, les mitochondries, les lysosomes et les peroxysomes des cellules eucaryotes (Geller et Winge, 1982 ; Chang et coll, 1988) ainsi que dans le périplasma de certaines bactéries à gram négatif (Benov et coll, 1996). Les SOD à Ni ont été récemment découvertes dans le cytosol de bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* et chez des cyanobactéries (Youn et coll, 1996 ; Choudhury et coll, 1999 ; Palenik et coll, 2003). La dismutation du superoxyde catalysée par toutes les SODs peut être écrite par deux demi-réactions faisant intervenir $O_2^{\bullet-}$ à la fois comme réducteur et comme oxydant vis-à-vis du métal du site actif (M) (Klug et coll, 1972) :



Avec M = Cu, Mn ou Fe

I.4.1.2 La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie.



I.4.1.3 Le système glutathion peroxydase/ glutathion réductase (GPx/GR)

La glutathion peroxydase (GPx) est une protéine (contenant 4 atomes de sélénium dans son site actif) présente dans le cytosol, les mitochondries et la circulation sanguine. L'activité de cette enzyme dans les viandes de diverses espèces est reportée dans le Tableau 9. L'enzyme GPx est capable de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et les lipoperoxydes en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (Théron & Bonnefont-Rousselot, 2005).

Tableau 9 : Activité antioxydante de la glutathion peroxydase (GPx), dans diverses viandes

<i>Espèce</i>	<i>Muscle</i>	<i>Unités</i>	<i>Référence</i>
<i>Dinde</i>	<i>Sactorius</i>	201-220	Renerre <i>et al</i> (1999)
<i>Dinde</i>	<i>Pectoralis Major</i>	84-110	Renerre <i>et al</i> (1999)
<i>Agneau</i>	<i>Longissimus dorsi</i>	340	Santé-Lhoutellier <i>et al</i> (2008)
<i>Bœuf</i>	<i>Longissimus dorsi</i>	200	Gatellier <i>et al</i> (2004)
			Mercier <i>et al</i> (2001)

I.4.2 Les antioxydants non enzymatiques

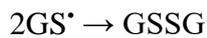
Les antioxydants sont des agents redox qui réagissent (effet scavenger) avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent les processus d'oxydation. Pendant ces réactions, les antioxydants s'oxydent en dérivés stables, ou persistent pendant un certain temps sous forme radicalaire. Ces formes radicalaires peuvent devenir des prooxydants. Comme évoqué précédemment, ces antioxydants se divisent en deux principales catégories, les endogènes (molécules issues de la biosynthèse), et les exogènes (vitamines, oligo-éléments, ou antioxydants de synthèse).

I.4.2.1 Les antioxydants endogènes

➤ *Glutathion (GSH)*

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants. Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire. Le glutathion est un tri-peptide (acide glutamique-cystéine-glycine) situé dans le cytosol et les mitochondries. Il peut chélater les ions cuivreux et ainsi limiter leur participation à la génération de radicaux libres par des réactions

de type Fenton. De plus, GSH est capable de réagir avec les radicaux hydroxyles (réaction ci-dessous), alkoxydes, peroxydes et des radicaux centrés sur le carbone (Halliwell & Gutteridge, 1990). Le radical thiyle (GS^\bullet) produit peut intervenir, s'il n'est pas neutralisé par auto-association (GSSG) (réaction ci-dessous), dans les processus d'oxydation, par des réactions avec l'oxygène qui conduisent à la formation d'un peroxyde ou de l'anion superoxyde (Thérond & Bonnefont-Rousselot, 2005). Le glutathion est aussi un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la glutathion peroxydase GPx (Thérond & Bonnefont-Rousselot, 2005).



➤ *Carnosine*

La carnosine est un dipeptide de l'histidine. La carnosine est présente dans de nombreux tissus chez les mammifères : le muscle, mais aussi le cerveau, le cœur, la peau et le foie. Les teneurs en carnosine sont plus élevées dans les muscles squelettiques (Tableau 10). Les concentrations en carnosine peuvent varier selon l'espèce animale (Purchas *et al.*, 2004), l'alimentation (Chan & Decker, 1994) et le typage des muscles. Le taux de carnosine est plus important dans les muscles squelettiques de métabolisme glycolytiques (α -white) (Aristoy & Toldra, 1998). En effet, grâce à son pouvoir tampon, elle peut neutraliser la production d'acide lactique dans les muscles où la glycolyse anaérobie est particulièrement active (Suzuki *et al.*, 2006). La carnosine présente des propriétés antioxydantes :

I. chélatant les métaux de transitions (fer, cuivre, zinc, cobalt) ;

II. en piégeant les radicaux libres centrés sur l'oxygène ;

III. et aux travers de réactions avec des éléments cellulaires toxiques comme le HNE (produit terminal d'oxydation des AGPI n-6) en empêchant la formation de AGE (Advanced Glycation End product : produits de la réaction de Maillard entre un groupe amine libre avec un groupement carbonyle) (Velez *et al.*, 2008). D'autres auteurs rapportent que la carnosine est un bon piègeur des radicaux hydroxyles et ne peut pas réagir avec le radical superoxyde ou encore le peroxyde d'hydrogène (Huang & Kuo, 2000).

Tableau 10 : Teneur en carnosine en mg pour 100 g de muscles de diverses espèces

<i>Espèce</i>	<i>Muscle</i>	<i>Teneur</i>	<i>Référence</i>
<i>Poulet</i>	Blanc	270	Decker <i>et al</i> (2000)
	Cuisse	50	Decker <i>et al</i> (2000)
<i>Porc</i>	Longe	528	Ngapo & Gariépy (2008)
	Jambon	449,5	Aristoy & Toldra (2004)
	Collier	186,4	Aristoy & Toldra (2004)
<i>Bœuf</i>	Longe	313	Aristoy & Toldra (2004)
	Longe	372,5	Aristoy & Toldra (2004)
	Collier	253,4	Aristoy & Toldra (2004)
	Jarret	396	Aristoy & Toldra (2004)
	<i>Semitendinosus</i>	452,6	Purchas <i>et al</i> (2004)
<i>Agneau</i>	<i>Longissimus</i>	491,1	Purchas <i>et al</i> (2004)
	<i>Lumburum</i>		
	<i>Semitendinosus</i>	356,7	Purchas <i>et al</i> (2004)
	<i>Triceps Brachii</i>	251,1	Purchas <i>et al</i> (2004)

I.4.2.2 Les antioxydants exogènes

➤ *La vitamine E ou α -tocophérol*

La vitamine E ou l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique, est un composé analogue de l' α -tocophérol. Il est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Il est choisi comme modèle d'antioxydant de l' α -tocophérol car il ne présente pas de chaîne aliphatique et ceci lui confère une solubilité adéquate dans les solutions lipophiles et hydrophiles (Cheng *et al.*, 2007). Les teneurs en tocophérols des viandes varient de 0,9 à 6,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Ces teneurs sont fortement influencées par l'alimentation et une éventuelle

supplémentation en vitamine E. Trefan *et al.* (2011) montrent une variation des teneurs en α -tocophérol de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de viande, pour une ration non supplémentée en vitamine E, à 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de viande, pour une ration enrichie en vitamine E à 60 IU.kg⁻¹ d'aliments.

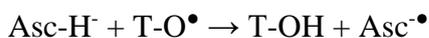
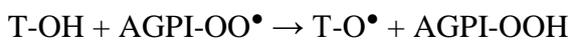
L' α -tocophérol est le principal antioxydant contenu dans les LDLs. Chaque particule LDL contient en moyenne de 6 à 12 molécules d' α -tocophérol. L' α -tocophérol est incorporé dans les particules de LDLs au cours de leur métabolisme, grâce à une protéine appelée (α -tocophérol transfer protein).

Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -TocH, qui est un inhibiteur de la propagation radicalaire, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2^\bullet , et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection. L' α -TocH, en cédant son hydrogène, se transforme lui-même en produit radicalaire mais de faible réactivité.

L' α -TocH peut réagir directement avec le radical initiateur, tel que le radical hydroxyle (HO^\bullet), inhibant ainsi la formation du radical RO_2^\bullet . La réaction de la vitamine E avec l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ est très lente et par conséquent peu probable. L' α -TocH n'est pas biosynthétisée. Elle est présente dans les huiles végétales, principalement dans l'huile de germe de blé, de tournesol, de soja, d'arachide ou d'olive. Elle se trouve aussi en moindre quantité dans les céréales, les amandes, les légumes verts, le beurre, la margarine, les poissons gras.

➤ *La vitamine C ou acide ascorbique*

L'anion ascorbate (forme présente dans le milieu physiologique) agit principalement en piégeant directement les ROS et/ou RNS (majoritairement l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le ONOO^-). Il est aussi capable de recycler l' α -tocophérol de façon à agir en synergie avec ce dernier dans la prévention de la peroxydation lipidique :



La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra- et extra-cellulaires (compartiments hydrophiles). Pour les pH des viandes, compris entre 5 et 7, l'ascorbate (AH^-) est la forme majoritaire. Dans la viande, la vitamine C est présente en faible quantité dans la viande (environ 2 mg pour 100 g de viande) par rapport aux fruits et légumes. Ses activités biologiques antioxydantes viennent de son potentiel réducteur puissant ($E^\circ = -0,29 \text{ V}$).

Remarque : Par interaction avec un radical lipidique R●, la vitamine E (T-OH) se transforme en un radical tocophéryle (T-O●). Ce dernier est régénéré en T-OH sous l'action de la vitamine C (Asc-H-) qui, à son tour, prend une forme radicalaire (Asc-●). Le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer la vitamine C en se transformant en un radical thyle (GS●) qui, par réaction avec lui-même, donne du glutathion oxydé (GSSG). L'activité des antioxydants décrite ci-dessus dépend de plusieurs paramètres (pH, T...). Le Tableau 11 regroupe les principales conclusions relatives à la stabilité thermique des AO endogènes.

Tableau 11 : Stabilité thermique des antioxydants endogènes

Antioxydants	Pertes	Conditions	Aliments	Références
<i>Catalase</i>	85%	60°C, bain marie ⁽¹⁾	Porc Bœuf	Mei <i>et al</i> (1994)
<i>Superoxyde dismutase</i>	78,7%	60°C, 30 minutes	Ail	Jianguo <i>et al</i> (2010)
	Stable	80°C, bain marie ⁽¹⁾	Porc Bœuf	Mei <i>et al</i> (1994)
<i>Glutathion peroxydase</i> <i>/ Glutathion réductase</i>	30 %	45°C, 120 minutes	Erythrocytes de mouton	Tarhan <i>et al</i> (2000)
	97%	80°C, bain marie ⁽¹⁾	Porc	Mei <i>et al</i> (1994)
	83%	80°C, bain marie ⁽¹⁾	Bœuf	Mei <i>et al</i> (1994)
<i>Carnosine</i>	30%	70°C, 90 minutes, bain marie	Agneau	Purchas <i>et al</i> (2004)

⁽¹⁾ Quand la température à cœur est atteinte, les échantillons sont refroidis dans la glace et analysés

D'autre part, plusieurs travaux ont été menés afin d'identifier l'effet de la chaleur sur la stabilité des vitamines antioxydantes. L'évolution de la vitamine C, par exemple, au cours des procédés de transformation a largement été étudiée dans divers produits à base de tomate. Etant donné sa forte sensibilité à la chaleur et à la lumière, la vitamine C est systématiquement dégradée par les procédés de transformation. Selon les conditions employées, les pertes sont plus ou moins importantes. La température, le pH et la durée du traitement sont les principaux paramètres influençant la dégradation de ce composé. D'après la littérature, la dégradation de la vitamine C dans les produits alimentaires suit une cinétique de pseudo-ordre 1. Les pertes varient énormément selon la structure et la composition de la matrice alimentaire et les conditions de procédés appliquées.

D'après la littérature, la vitamine E serait un composé relativement stable aux traitements subis par les produits alimentaires lors de la transformation, de la conservation et du chauffage. Une

étude réalisée sur quatre produits différents (jus, soupe, sauce et tomates en tranches), a suivi l'évolution de l' α -tocophérol au cours du temps lors de la cuisson de trois de ces produits et la préparation industrielle du jus. A la différence des deux autres études, la teneur a tendance à augmenter lors des traitements thermiques, sauf pour le jus dont la teneur en α -tocophérol est significativement affectée lors des étapes d'homogénéisation et de stérilisation.

➤ *Les polyphénols et caroténoïdes*

Les polyphénols et caroténoïdes sont des phytomicronutriments très courants dans les fruits et légumes. Malgré leurs structures très différentes, ils partagent un certain nombre de caractéristiques : une implication dans la couleur des fruits et légumes ; des propriétés antioxydantes ; des propriétés protectrices envers certaines maladies dégénératives tels des cancers et maladies cardiovasculaires. Les propriétés anti-oxydantes de ces molécules ont été particulièrement étudiées. En effet par leurs propriétés de capture de radicaux ou d'électrons et leur sensibilité à l'oxydation, ces molécules sont impliquées lors des phénomènes d'oxydation

I.5 Effets des traitements technologiques sur l'oxydation en lien avec la qualité de la viande

La qualité de la viande est déterminée par sa composition (part de viande maigre et de gras) et par ses qualités organoleptiques : apparence visuelle, odeur, jutosité, tendreté et saveur. Si la qualité nutritionnelle de la viande est objective, sa qualité organoleptique, telle qu'elle est perçue par le consommateur, est très fortement subjective. On s'intéresse ici essentiellement aux effets des traitements technologiques (cuisson, marinade, conservation et le salage...) sur la production des ERO lors de la phase d'initiation. L'oxydation du fer a d'un côté une implication sensorielle directe qui se traduit par un changement de la couleur de la viande (cas du fer héminique) et d'autre part des implications indirectes via la production des ERO (cas du fer non héminique et héminique). Les radicaux libres oxygénés, notamment (HO°), oxydent les lipides et les protéines de la viande. Les traitements technologiques des produits carnés peuvent être classés en deux catégories : (i) les transformations à basse température (congélation, réfrigération, séchage-fumage, découpe et hachage, salage et marinage) et (ii) les transformations à haute température (cuisson industrielle ou domestique, pasteurisation et stérilisation).

I.5.1 Les traitements technologiques à basse température

Les procédés mis en œuvre pour stabiliser les flores microbiennes pathogènes et d'altération permettent aussi de limiter l'oxydation des viandes (stockage réfrigéré et congélation).

Le stockage réfrigéré de la viande (4°C) : le mode de conditionnement peut avoir un effet sur la stabilité de la couleur de la viande rouge du fait de la pression en oxygène dans l'emballage. Par exemple, lors d'un conditionnement imperméable sous vide, où la pression en oxygène est faible, la myoglobine est sous forme réduite et la viande présente une couleur rouge pourpre. Si le taux d'oxygène résiduel est de 0,05%, la myoglobine s'oxyde et la couleur devient brune, ce qui induit un rejet d'achat de la part du consommateur. L'oxydation de la myoglobine entraîne une cascade de réactions qui induisent l'oxydation des lipides (Chaijan, 2008) et les produits d'oxydation de ces derniers agissent sur les protéines (Lund *et al.*, 2011). Dans le cas du conditionnement sous atmosphère modifiée (20 à 30% de CO₂ et 70 à 80% d'O₂), les concentrations élevées en oxygène permettent de garder le pigment de la myoglobine sous forme oxygénée de couleur rouge vif mais, avec des risques plus élevés d'oxydation des lipides et des protéines. L'amplitude des phénomènes oxydatifs lors de la conservation réfrigérée des viandes est relativement faible (Gatellier *et al.*, 2005 ; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008b ; 2008c). Ceci est dû à la présence d'un système antioxydant enzymatique (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase) et non enzymatique (vitamine E, glutathion) qui garde son efficacité plusieurs jours après la mort de l'animal (Gatellier *et al.*, 2004 ; Renner *et al.*, 1996).

La congélation permet des durées de conservation de plusieurs mois. Estévez (2011) indique dans sa revue que les protéines subissent des oxydations pendant le stockage congelé de la viande de porc, de bœuf, de volaille, de dinde et de nandou. A -18°C, aucune flore microbienne n'est active et ce sont les phénomènes oxydatifs, bien qu'extrêmement lents, qui limitent la durée de vie des produits carnés du fait du rancissement des matières grasses. De plus, la formation de cristaux de glace au moment de la congélation induit des modifications structurales des protéines qui ont pour conséquence une réduction du pouvoir de rétention en eau PRE qui se traduit par des exsudations lors de la décongélation.

Le hachage des viandes est couramment utilisé pour valoriser des muscles de faibles valeurs économiques ayant une forte teneur en collagène. Les contraintes mécaniques subies par la viande lors du hachage modifient l'orientation des fibres musculaires et des myofibrilles sans pour autant dénaturer les protéines myofibrillaires. Par contre, le hachage qui augmente considérablement la surface de contact avec l'oxygène favorise l'oxydation du fer avec la

formation des ERO et toutes les répercussions de ceux-ci sur les lipides et les protéines de la viande

Le salage

Le chlorure de sodium est l'un des ingrédients les plus utilisés dans les procédés de préparation des charcuteries du fait de la réduction de l'activité de l'eau et donc de l'amélioration de la stabilité microbienne. Il joue aussi un rôle déterminant sur la flaveur et la couleur. En Italie, la teneur en sel moyenne dans les produits de salaison les plus répandus oscille entre 3,3 g/100 g pour le salami de Milan et 4,9 g/100 g pour le jambon sec typique (en particulier le San Daniele et le Parme) (Parolari, 2005). Une orientation vers des produits de salaisons à teneur réduite en sel est en cours. En effet, le sodium contenu dans le sel peut avoir de multiples effets néfastes sur la santé. Le salage affecte la force ionique du milieu ce qui entraîne des modifications des vitesses d'oxydation et de réduction du fer. Dans l'étude de Millero *et al.* (1989), la valeur de la constante de vitesse de l'oxydation du Fe II par le peroxyde d'hydrogène à 25°C, diminue de 33,5% lorsque la force ionique passe de 0,1 M à 2,4 M. Néanmoins, seules quelques informations relatives aux effets du chlorure de sodium sur l'intensité d'oxydation du fer sont disponibles dans littérature (Figure 11).

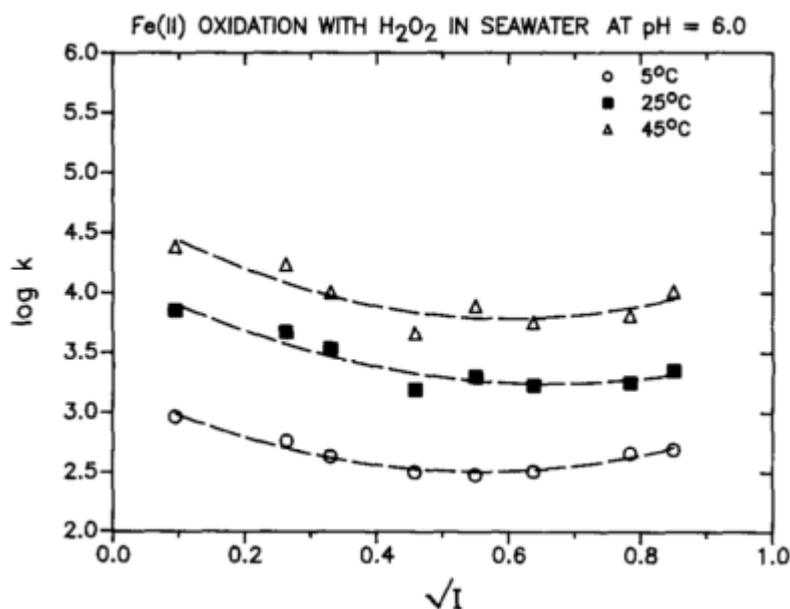


Figure 11 : Effets de la force ionique sur la constante de vitesse de la réaction d'oxydation du Fe II en Fe III par le H₂O₂ dans l'eau de mer à pH 6 et à différentes températures

Le marinage de la viande, ce procédé de marinage consiste à mettre en contact un aliment avec diverses préparations alimentaires et aromatiques ou “marinades”, traditionnellement à base de vin, vinaigre, jus ou pulpes de fruits ou d’extraits végétaux, de lait fermenté, de sel et d’huile (Bjorkroth, 2005; Oreskovich *et al.*, 1992). Une étude a montré une réduction de l’oxydation des lipides, due vraisemblablement à la présence de composés phénoliques antioxydants dans la sauce de soja et le vin rouge, et donc une diminution de la rancidité de la viande. (Kargiotou *et al.*, 2011). Ce procédé entraîne, selon une étude réalisée par Sharedeh *et al* (2011), une augmentation de la dénaturation des protéines et des oxydations avec la baisse du pH de la marinade. Ces phénomènes sont particulièrement marqués à pH 4,3. Ces phénomènes induisent une baisse potentielle de la qualité nutritionnelle du produit. Néanmoins, peu d’études se sont intéressées aux effets de la marinade sur l’oxydation du fer dans la viande.

I.5.2 Effets de la cuisson sur les phénomènes oxydatifs dans la viande

Lors de la cuisson, on observe un déséquilibre important entre les potentiels pro et antioxydants du muscle en faveur de l’oxydation. L’augmentation de la température entraîne une surproduction de radicaux libres oxygénés par activation de certains des mécanismes décrits ci-dessus avec, en parallèle, une dégradation rapide de la protection antioxydante. La combinaison de ces deux phénomènes conduit à une augmentation importante des oxydations lipidiques et protéiques de la viande. Lors de la cuisson de la viande, les enzymes antioxydantes, comme la plupart des protéines, perdent en effet rapidement leur activité au-dessus de 60 °C, et la vitamine E est dégradée à partir de 80 °C. Des interactions moléculaires sont aussi observées qui participent à la dégradation de la qualité des produits. Ainsi, les sucres réducteurs et les aldéhydes, issus de la peroxydation lipidique, peuvent réagir avec les protéines par l’intermédiaire des acides aminés basiques ou de la cystéine. Enfin, le type de cuisson, mais principalement le temps, influent sur la proportion de fer héminique converti en fer non héminique : elle serait de 10 à 50% respectivement pour des cuissons rapides (grillé, rôti) et lentes (bouilli), le maximum étant atteint pour des fritures longues. Cette conversion fer héminique /fer non héminique a des répercussions sur la production des ERO et par conséquent sur la qualité nutritionnelle et sensorielle de la viande.

I.6 Exemples de modèles d'étude utilisés pour la compréhension des mécanismes oxydatifs dans les aliments

Les "modèles d'aliments" sont définis comme des matrices génériques et simplifiées d'aliments ; le milieu, réactionnel ou non, est reconstruit dans le but d'étudier un ou plusieurs phénomènes interactifs en faisant varier des paramètres (composition et structure) de façon parfaitement contrôlée. La parfaite maîtrise du modèle expérimental peut permettre d'utiliser les mesures pour ajuster les constantes physiques ou chimiques des phénomènes dans un modèle mathématique du système. Ils existent aussi, des "modèles expérimentaux intermédiaires", plus complexes que les "modèles d'aliments" mais eux aussi développés spécifiquement pour analyser un ou plusieurs phénomènes.

Dans notre étude, le but est d'étudier la phase d'initiation de l'oxydation du fer dans la viande. Pour ce, il fallait un modèle mimétique basique sans matière organique afin d'éliminer les interactions entre les radicaux libres formés à l'issue du cycle oxydo-redox du fer et les lipides et protéines de la viande.

- **Exemple de modèles *in vitro* de la digestion**

Le choix d'un modèle expérimental de digestion dépend de nombreux facteurs notamment éthique, technique ou financier. En comparaison avec les modèles *in vivo*, les modèles de digestion *in vitro* présentent certains avantages : réduction des coûts, gain de temps, meilleures répétabilité et reproductibilité, limitation des contraintes éthiques. Deux types de modèles *in vitro* mimant le tractus digestif ont été développés : des modèles statiques et des modèles dynamiques. Les modèles de digestion statiques sont des modèles biochimiques simples mimant les conditions physico-chimiques digestives. Les modèles *in vitro* peuvent mimer deux grandes étapes de la digestion : l'estomac et l'intestin grêle. Ces différentes étapes peuvent être considérées seules ou en combinaison. Le Tableau 12 reprenant quelques études de digestion appliquées aux matrices laitières, souligne des paramètres utilisés.

Tableau 12 : Exemple de variabilité des modèles statiques *in vitro* appliqués à l'étude de digestion de produits laitiers (Hur *et al.*, 2009 ; Dupont *et al.*, 2010)

Objectif de l'étude	Nature des enzymes	Temps digestion (minutes)	pH	Référence
Digestion de lait bovin/caprin	Jus gastrique humain	30	2.5	Almaas <i>et al.</i> (2006)
	Jus duodénal humain	30	7.5	
Digestion de protéines de lait et lait maternel	Pepsine porcine	60	Descente en pH de pH=6.5 à pH=2 en 60min	Chatterton <i>et al.</i> (2004)
	ou jus gastrique (enfant)	60		
Digestion β -lactoglobuline	Pepsine porcine	120	2.5	Moreno <i>et al.</i> (2008)
	Trypsine porcine et chymotrypsine et sels biliaires	15	6.5	
Digestion protéines purifiées issues du lait (β -lactoglobuline) (β -caséine)	Pepsine porcine	60	pH=3(modèle enfant)	Dupont <i>et al.</i> (2010)
	Trypsine et chymotrypsine porcine et sels biliaires	30	pH=2.5 (modèle adulte) pH=6.5	

Pour résumer...

En sciences des aliments et en génie alimentaire, les "aliments modèles" et les "modèles d'aliments" sont utilisés depuis longtemps sans pour autant utiliser ces termes. Tous ces modèles expérimentaux ont pour finalité d'analyser un phénomène réactionnel, comportant souvent de nombreuses réactions chimiques et/ou un phénomène physique (de diffusion, de modification structurale....). La complexité du problème oriente le choix du type de modèle expérimental, mais souvent l'élaboration d'un modèle mathématique du système nécessite d'avoir recours à un ou des "modèles d'aliments" qui seuls permettent la simplification nécessaire pour isoler l'impact de nombreuses variables.

C'est cette voie que j'ai suivie pour modéliser la production des radicaux libres issus de l'oxydation du fer de la viande conservée et transformée et pour évaluer l'impact de ces radicaux sur l'oxydation des protéines et des lipides en m'appuyant sur le savoir-faire de mes deux équipes d'accueil : "Biochimie et Protéines du Muscle" et "Imagerie et Transferts".

Matériels et Méthodes

II. Matériels & Méthodes

Quelle démarche pour quantifier les oxydations dans la viande ?

La viande est un aliment extrêmement complexe de par son organisation structurale composée de plusieurs sous-ensembles, et de par sa composition en protéines, lipides, sucres, minéraux et oligoéléments. Après l'abattage de l'animal, la viande est conservée, puis dans la plupart des cas, la viande est consommée cuite. La succession des opérations technologiques permettant de fabriquer des produits carnés cuits met en jeu de nombreux processus physiques et chimiques qui conduisent à une grande variété de changements. Les modifications oxydatives sont initiées par la formation des radicaux libres issus de l'oxydation du fer et affectent principalement les composantes lipidiques et protéiques. Elles peuvent s'amplifier du fait des interactions protéine-lipide et protéine-sucres. L'importance de ces phénomènes physicochimiques interactifs dépend de plusieurs facteurs (T°C, pH...). Mais, la complexité du milieu viande et la variabilité animale font que les études décrites dans la littérature sur divers types de muscles, ne permettent ni d'identifier clairement l'impact relatif des conditions physico-chimiques et de la composition du produit sur les phénomènes oxydatifs en général et la phase d'initiation des oxydations en particulier, ni d'isoler un phénomène pour en étudier la cinétique. Pour répondre à ce problème, mes travaux expérimentaux se dérouleront dans un milieu simplifié mimétique de la viande. Il va permettre de quantifier la production des radicaux libres issus de l'oxydation du fer pour les conditions physicochimiques appliquées lors de la conservation et de la transformation de la viande. Les phénomènes d'oxydations se poursuivent dans le tube digestif après l'ingestion des viandes qui sont alors exposées à des phénomènes mécaniques et enzymatiques complexes. Les enzymes du tractus digestif, de la bouche à l'intestin, modifient chimiquement le produit et le transforment en nutriments. Les radicaux libres qui se forment tout au long du tractus digestif oxydent les protéines et les lipides de la viande. Pour évaluer l'impact de ces transformations, nous avons soumis un modèle mimétique de la viande aux conditions qui règnent dans le tractus digestif.

Le milieu aqueux utilisé pour étudier l'oxydation du fer lors de la transformation de la viande est basé sur celui mis au point par Aurélie Promeprat au cours de sa thèse. Il a été complexifié en rajoutant des antioxydants de différentes natures. Des myofibrilles ont ensuite été introduites pour mieux appréhender les phénomènes rencontrés au cours de la digestion des viandes.

Les méthodes chimiques développées pour doser les radicaux superoxydes et hydroxyles formés dans le milieu mimétique sont présentées dans ce chapitre. La méthode et les résultats relatifs à la calibration permettant de convertir la fluorescence de l'HTP en concentration sont décrits en annexe 4.

II.1 Construction du modèle mimétique de la viande

Le modèle mimétique de base utilisé est composé d'un tampon phosphate dont les caractéristiques physicochimiques (pH et force ionique) sont proches de celles de la viande. Les oxydants sont le fer non hémérique « libre » rajouté sous forme de FeSO_4 et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ceux-ci sont dissous dans le tampon à des concentrations variables. Le taux d'oxygène dissous dans le milieu est déterminé avec une sonde à oxygène (HACH-LANGE). La complexification se fait par l'ajout successif d'antioxydants. Pour chaque condition testée avec le modèle, quatre répétitions sont effectuées.

II.1.1 Préparation du tampon d'incubation

Nous avons utilisé un tampon phosphate de sodium 40 mM à pH 6. L'intérêt de l'utilisation de ce tampon est d'obtenir un pH et une force ionique (0.24 M) proches de ceux de la viande. Un pH de 6, est représentatif de celui de la viande cuite. En effet, le pH ultime de la viande crue, toutes espèces confondues, varie de 5,5 à 5,8 et ces valeurs augmentent à la cuisson d'environ 0,3 unité pH (Fletcher *et al.*, 2000).

II.1.2 Concentration en oxydants

Le peroxyde d'hydrogène : le tissu musculaire contient du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La concentration maximale en peroxyde d'hydrogène dans le modèle mimétique a été fixée à 2000 μM . Cette valeur correspondrait environ à une oxydation de 50% de la myoglobine d'une viande présentant une couleur intermédiaire (250 μM de H_2O_2), à une oxydation de 50% des AGPI (1050 μM de H_2O_2) et une oxydation de 20% du glucose (600 μM de H_2O_2). L'eau oxygénée du commerce à 30 % (8.82 M) a donc été diluée dans différents volumes de tampon phosphate pour obtenir des concentrations de 200 à 2000 μM .

Fer « libre » : les concentrations, en fer non héminique, utilisées pour le modèle mimétique tiennent compte des concentrations en fer héminique (représentant 65 à 75% du fer total, selon les espèces) et en fer non héminique. Nous utilisons du fer non héminique afin de tenir compte du fait qu'à hautes températures, une grande partie du fer héminique est transformé en fer « libre ». Le fer est ajouté dans le modèle mimétique à l'état ferreux (Fe(II)). Selon Gozzo (2001), utiliser du fer ferreux plutôt que du fer ferrique importe peu. Il a montré qu'en présence d'un large excès de peroxydes, comme ceci était le cas dans le modèle mimétique, quelle que soit la forme du fer de départ, il s'établit un cycle redox du fer mettant en jeu les trois formes : fer ferreux, fer ferrique et probablement du fer ferryle. Ce cycle montre, en excès de peroxydes, une production de radicaux libres quel que soit l'état du fer initial.

Le modèle mimétique est donc composé de fer, où quatre concentrations sont testées (50 ; 200 ; 400 et 600 μM) et de peroxyde d'hydrogène (0, 200, 1000, 2000 μM) (Tableau 13).

Tableau 13 : Plan expérimental des cinétiques de formation des radicaux superoxydes et hydroxyles dans le milieu mimétique de base de la viande

Composés et paramètres	TP (μM)	NBT (μM)	FeSO ₄ (μM)	H ₂ O ₂ (μM)	Température (°C)
radical superoxyde*	0	500*	200*	0	(4→75)
			(50→600)		60
radical hydroxyle**	1000**	0	200**	200**	(4→60)
			(50→600)		60
			200	(200→2000)	60

Les conditions standards : formazan* (200 μM de FeSO₄, T= 60°C ; HTP** (200 μM de FeSO₄, 200 μM d'H₂O₂, T= 60°C)

II.1.3 Choix des sondes

La sonde de détection des radicaux superoxydes (Nitro Blue Tetrazolium, NBT) est utilisée à la concentration de 500 μM et la sonde de détection des radicaux hydroxyles (téréphthalate) est

utilisée à la concentration de 1 mM. Ces concentrations en sondes sont en large excès par rapport aux radicaux formés dans le milieu mimétique de la viande. La réduction du NBT en formazan est suivie par absorbance à 530 nm (Auclair et Voisin, 1985). L'hydroxylation du téréphtalate en hydroxytéréphtalate est mesurée par fluorescence (émission à 420 nm après excitation à 340 nm) (Saran et Summer, 1999).

II.1.4 Conditions de conservation et de chauffage du milieu

Le milieu mimétique de la viande a été chauffé à 25, 30, 45, 60 et 75°C pendant 30 minutes. Quatre répétitions sont effectuées pour chaque condition. Le chauffage est effectué au bain à sec dans le cas de la détection des radicaux superoxydes et en utilisant le système peltier du fluorimètre dans le cas des radicaux hydroxyles. Ceci permet une répartition homogène de la chaleur tout au long du chauffage. La conservation se fait à la température de 4°C. L'abaissement de la température se fait en utilisant de la glace.

II.1.5 Détermination des concentrations en antioxydants

Le niveau de complexité du modèle mimétique est augmenté par l'ajout d'antioxydants au tampon phosphate composé de fer ferreux dans le cas où le radical superoxyde est à détecter. Le peroxyde d'hydrogène est rajouté au tampon phosphate contenant du fer ferreux dans le cas où le radical hydroxyle est à détecter. Trois catégories d'antioxydants sont testés : un antioxydant lipidique, le trolox C, un analogue hydrosoluble de la vitamine E (α -tocophérol), des antioxydants enzymatiques (superoxyde dismutase et catalase) et deux antioxydants peptidiques, la carnosine et le glutathion (Tableau 14). La glutathion peroxydase n'a pas été testée car notre modèle ne contenait pas de lipides susceptibles de produire des hydro-peroxydes lipidiques.

L'effet des antioxydants est testé à deux groupes de températures : basse température 4 et 10°C et hautes température 45°C et 60°C avec le modèle mimétique composé de tampon phosphate à 40 mM et pH6, de 200 μ M de fer ferreux et de 200 μ M de peroxyde d'hydrogène dans le cas où le radical hydroxyle est à détecter.

Les concentrations en vitamines C et E ajoutées dans le modèle mimétique complexe sont respectivement de 0,1 mM et 5 μ g.mL⁻¹ (soit 2,9 μ g.mL⁻¹ de Trolox C) (Decker *et al.*, 2000).

Les enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase et la catalase ont été choisies pour leurs capacités à piéger les radicaux libres en agissant en interaction. Les concentrations en enzymes antioxydantes ajoutées dans le modèle mimétique complexe sont celles trouvées par Young *et al* (2005) sur le muscle *Longissimus Thoracis* de porc (1 jour après l'abattage) et qui ont été converties en unité par millilitre : 240 U.mL⁻¹ de superoxyde dismutase et 640 U.mL⁻¹ de catalase. La carnosine (β -Ala-His) et le glutathion (GSH) ajoutées dans le modèle mimétique complexe pour tester leurs propriétés antioxydantes sur des protéines de la viande à des concentrations respectives de 20 mM et 0,85 mM. Le choix des doses physiologiques les plus élevées s'explique par la volonté de mieux observer l'effet de ces antioxydants.

Tableau 14 : Teneur en antioxydants dans la viande

Antioxydants	Concentrations dans le modèle	Références bibliographiques
Superoxyde dismutase (Cu-Zn SOD)	240 U.mL ⁻¹	Dans le muscle <i>Longissimus Thoracis</i> de porc (1 jour après l'abattage) Young <i>et al</i> (2005)
Catalase	640 U.mL ⁻¹	
Carnosine	20 mM	varient de 50 à 528 mg pour 100g de viande, soit de 2 mM à 24 mM
Glutathion	0,85 mM	0,40 à 0,85 mM (de viande de bœuf) Williams <i>et al</i> (2007)
α -tocophérol Trolox C	5 μ g.mL ⁻¹ (soit 2,9 μ g.mL ⁻¹ de trolox C qui est un analogue soluble de la vitamine E)	Variation des teneurs en α -tocophérol de 1 μ g.g ⁻¹ de viande, pour une ration non supplémentée en vitamine E, à 5 μ g.g ⁻¹ de viande, pour une ration enrichie en vitamine E à 60 IU.kg ⁻¹ d'aliments Trefan <i>et al</i> (2011).
Ascorbate	0,1 mM	La concentration en vitamine C dans la viande, toutes espèces confondues, est d'environ 0,11 mM Decker <i>et al</i> (2000)

II.1.6 Variation du pH et ajout de sel (NaCl)

Comme précédemment, les essais dédiés à l'analyse de la production du couple ($\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^\circ$) avec le formazan ont été faits sans ajout de peroxyde d'hydrogène et ceux concernant la production d' (HO°), avec le TP, avec une concentration en H_2O_2 initiale égale à celle du FeSO_4 . Deux séries d'essais ont été réalisées pour évaluer les effets respectifs du pH et de la concentration en chlorure de sodium.

Série pH

Le seuil de solubilité du TP à pH 3,5 est bas. Afin que la quantité de sonde ne soit pas limitante, les essais, à ce pH, ont dû être effectués avec une concentration en FeSO₄ réduite soit 50 µM. Trois pH (3,5 ; 5 et 6,5) ont permis de couvrir une gamme couvrant celle du pH de l'estomac, des viandes marinées et des viandes fraîches crues et cuites. Pour chaque pH, deux températures (4 ou 37°C) ont été testées, avec toujours trois répétitions. Les conditions d'utilisation des sondes sont présentées dans le Tableau 15.

Tableau 15: conditions d'utilisation des sondes à trois différents pH (3,5 ; 5 et 6).

Sondes	H₂O₂ µm	FeSO₄ µM
TP (1000 µM)	50	50
NBT (500 µM)	0	50

Série NaCl

Les essais ont été effectués avec 200 µM de FeSO₄ à pH 6 et à 60°C pour trois niveaux de concentrations en chlorure de sodium : (1) pas de NaCl comme dans les essais du paragraphe IV.1, (2) 15 mM de NaCl qui correspond à la concentration naturelle en ion Cl⁻ dans le tissu musculaire (Schivazappa *et al.*, 2002) et (3) 342 mM de NaCl pour mimer une charcuterie cuite à 2% de sel en masse. Les essais ont été répétés trois fois et les concentrations initiales des sondes étaient les mêmes que précédemment.

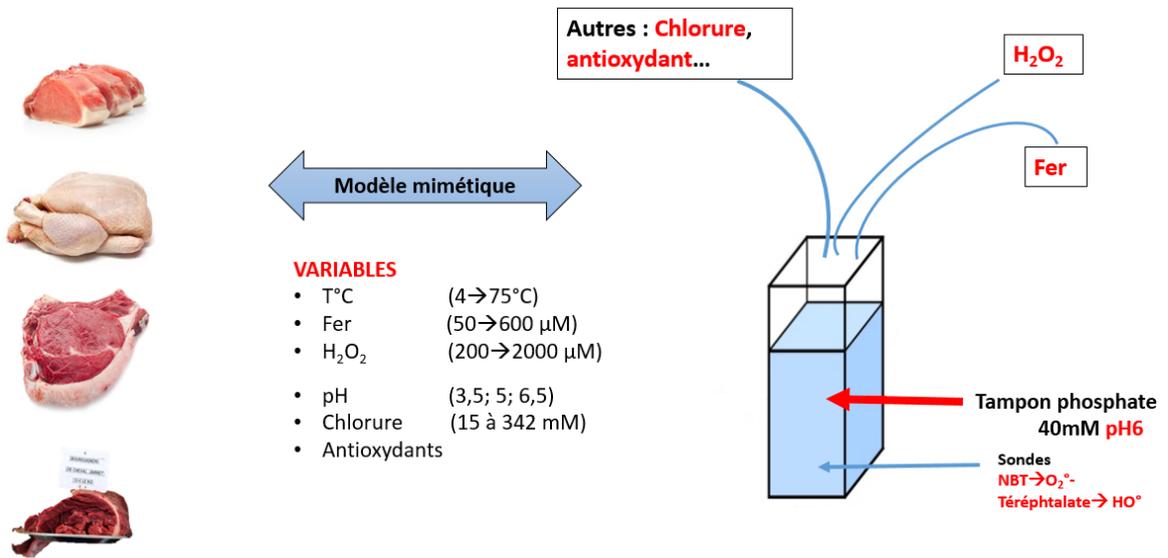


Figure 12 : Schéma représentatif du modèle mimétique de la viande utilisé au cours de la thèse

II.2 Mesures des oxydations dans un milieu mimétique du système digestif

II.2.1 Protocole expérimental

La production de radicaux libres a été évaluée à 37 ° C dans une solution saline de KCl / NaCl / CaCl₂ (2/120/6 mM), représentative de la composition saline du tractus digestif, supplémentée avec du phosphate de sodium 20 mM à différents pH (3,5 et 6,5). Toutes les cinétiques ont été évaluées pendant 2 h dans chaque phase. La concentration initiale d'oxygène dissous à cette température était de 210 ± 10 µM. Les oxydants (FeSO₄ et H₂O₂) ont été dissous dans ce milieu à deux concentrations (100 et 200 µM). L'effet des antioxydants a été testée en ajoutant un mélange de Trolox C de, β-carotène et divers polyphénols (acide caféique, la rutine, l'acide chlorogénique, la quercétine et). Chaque antioxydant a été ajouté à une concentration finale de 10 µM. La détection des radicaux superoxydes et hydroxyles s'est faite via les sondes NBT et TP décrites auparavant.

II.2.2 Digestion *in vitro*

Pour évaluer l'oxydation lors de la digestion, le modèle mimétique précédent a été complexé en ajoutant des myofibrilles extraites selon le procédé de Pietrzak *et al.*(1997). La concentration en protéines myofibrillaires a été évaluée par la méthode du biuret (Gornall, Bardawill, et David, 1949) et la concentration en lipides myofibrillaires a été évaluée par une extraction Folch (Folch, Lees & Sloane-Stanley, 1957), suivie par une mesure gravimétrique. Dans la phase gastrique, les concentrations des protéines myofibrillaires et des lipides sont 7,71 et 2,05 mg / mL, respectivement. La concentration finale de la pepsine est de 2 mg / ml. Dans la phase intestinale, les concentrations finales de la bile porcine et la pancréatine sont respectivement de 8,81 et 0,52 mg / ml. Les incubations ont été effectuées à 37 ° C sous agitation et la prise d'échantillons (Aliquotes) pour l'analyse biochimique s'est faite à différents temps d'incubation (0, 30, 60, 120, 150, 180 et 240 min).

II.2.3 Mesures d'oxydation des lipides et des protéines

L'oxydation des lipides a été mesurée par les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBA-RS) selon la méthode Lynch et Frei (1993). L'oxydation de la cystéine a été évaluée par la diminution des thiols libres. Les thiols libres ont été mesurées par une modification de la méthode d'Ellman en utilisant le 2,2'-dithiobis (5-nitropyridine) (DTNP) (Morzel, Gatellier,

Sayd, Renerre, et Laville, 2006). Les groupements carbonyles des protéines ont été mesurés par réaction avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) pour former des hydrazones de protéine selon le procédé d'Oliver Alin, Moerman, Goldstein, et Stadtman (1987).

II.2.4 **Mesure de la protéolyse**

Le niveau de la protéolyse a été déterminé par le marquage spécifique à la fluorescamine de la fonction α -amino du N-terminal des peptides et des acides aminés (Harkouss, Mirade & Gatellier 2012). L'indice de protéolyse est exprimé comme le rapport en pourcentage de la teneur en α -amino du N-terminal (en équivalent glycine) à la teneur en protéine totale.

Développement d'un modèle

mathématique

stoechio-cinétique

III. Développement d'un modèle mathématique stœchio-cinétique

III.1 Introduction

La modélisation mathématique des phénomènes complexes est utilisée dans divers domaines scientifiques tels que la chimie, la physique, les sciences de la vie (médecine, biologie...). Ces modèles, constitués d'équations reliant entre elles les variables décrivant le système, peuvent être utilisés dans plusieurs buts : (1) analyser le comportement du système complexe dans des situations difficiles à observer dans la pratique, (2) évaluer l'incidence respective des éléments déterminant le système en réduisant fortement le nombre d'expériences et (3) rechercher un optimum de fonctionnement en fonction des contraintes pratiques.

Un modèle stœchio-cinétique a été développé pendant la thèse d'Aurélien Promeprat (2013) pour modéliser les mécanismes à l'origine des modifications des protéines lors du chauffage du tissu musculaire. Ce modèle inclue dans une première étape la chimie de Fenton, puis les attaques radicalaires des acides aminés et la dénaturation thermique des protéines. Les simulations numériques ont été faites en ajustant certaines valeurs des constantes réactionnelles k et des énergies d'activation (E_a) de la chimie de Fenton, et d'autres relatives aux voies réactionnelles subséquentes, par comparaison des calculs aux mesures de production de carbonyles issus de l'oxydation des protéines myofibrillaires. En outre, il s'était révélé nécessaire d'introduire un facteur de proportionnalité, inférieur à 1, entre la concentration totale en fer et celle réagissant réellement dans la chimie de Fenton. Mon travail est focalisé sur l'étape critique de la production des radicaux libres pour réviser ces ajustements. Il devait aussi ajouter des éléments permettant de tenir compte de la variation du pH. Dès le début de mes travaux j'ai constaté que les prédictions faites avec le jeu de paramètres proposés précédemment étaient en désaccord avec mes mesures de production de formazan et d'HTP.

Ce chapitre synthétise les conclusions d'une étude bibliographique qui a permis de :

- réviser le schéma réactionnel de la chimie de Fenton, et proposer ceux relatifs aux sondes NBT et TP et aux antioxydants,
- cerner les valeurs des k et E_a les plus incertaines des réactions du système Fenton,
- ajouter au modèle précédent des fonctions pour tenir compte de la dépendance des constantes k de certaines réactions au pH,
- introduire le concept de réactivité du fer en s'appuyant sur les études relatives à la complexation et à la précipitation du fer en solutions aqueuses.

III.1.1 Système Fenton en solutions aqueuses

Nous ne reviendrons pas en détail sur les nombreux travaux fondamentaux qui ont été menés au cours du 20^{ème} siècle depuis les travaux initiateurs de Fenton (1894) et Haber et Weiss (1934) sur la chimie de Fenton. La synthèse de Promeyrat (2013) montre que ce système implique un nombre important de réactions élémentaires : le schéma réactionnel tiré de cette synthèse, quand on néglige les photo-réactions et les réactions marginales impliquant le fer ferriyle, est présenté en Figure 13.

Les radicaux superoxydes et hydroxyle sont produits respectivement à partir des décompositions de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène catalysées par des sels ferreux. Le radical hydroxyle est beaucoup plus réactif que le radical superoxyde ; c'est le responsable de la dégradation des composés organiques et inorganiques. La chimie de Fenton est d'ailleurs exploitée dans plusieurs domaines tels que le traitement des déchets, notamment ceux associés à l'industrie du textile, des eaux usées, des effluents toxiques non biodégradables et des pesticides (Esteves *et al.*, 2016 ; Zhao *et al.*, 2016). Ce système réactionnel est aussi très important dans les systèmes biologiques (Shaeib *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2016). Toutefois, ces études ont été menées dans des conditions différentes de celles de la viande : pH, force ionique, composition du milieu...

La construction d'un modèle stœchio-cinétique nécessite de numéroté les réactions. Nous avons conservé et la numérotation proposée dans la thèse d'Aurélien Promeyrat (2013) (Figure 13,

Figure 14).

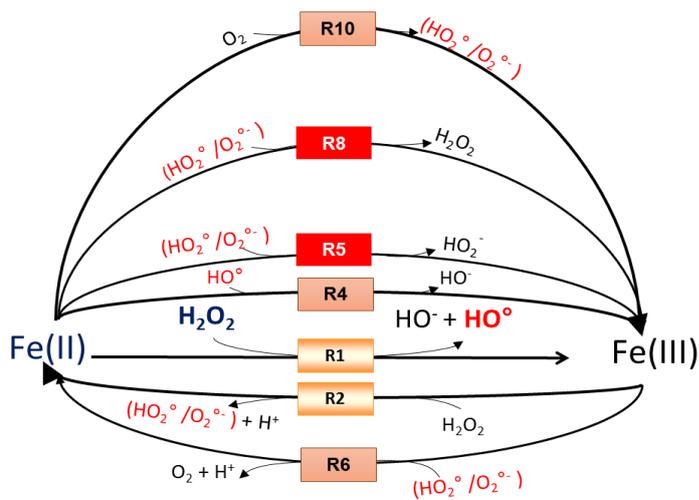


Figure 13 : Réactions impliquées dans le cycle Redox du fer, R : réaction

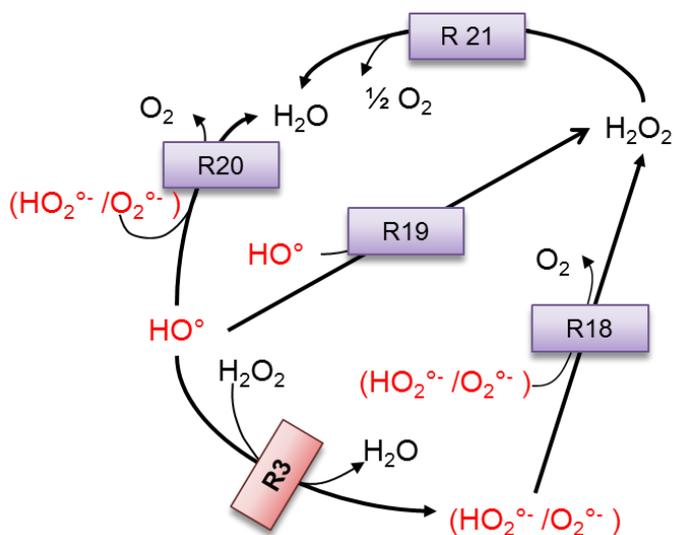


Figure 14 : Réactions entre les radicaux libres

La réaction R1 est au centre sur système réactionnel ; elle est d'ailleurs souvent appelée « réaction de Fenton » : le fer ferreux initie et catalyse la décomposition du H_2O_2 pour former des HO^{\bullet} . Le fer ferrique catalyse aussi la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la réaction R2 qui est appelée « Fenton inverse » ou « Fenton-like » (Walling *et al.*, 1973) ; De Laat & Gallard, 1999).

La réaction R10 est à l'origine de la production de l'autre radical, l'anion superoxyde, ou selon le pH, son acide conjugué, le perhydroxyle ; c'est la réaction d'initiation principale dans les milieux biologiques qui ne contiennent pas initialement de peroxyde d'hydrogène.

Les réactions R4 à R8 de la Figure 13 sont des réactions où les ions ferreux et ferriques réagissent avec les radicaux libres. La réaction R3 de la

Figure 14, participe aussi à la décomposition du peroxyde d'hydrogène et conduit à la formation de l'anion superoxyde à partir du radical hydroxyle. Dans leur étude sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène par des sels de fer, il a été observé qu'en présence d'un excès de H_2O_2 par rapport au fer, le peroxyde d'hydrogène se décomposait, générant davantage d'oxygène moléculaire que de fer ferrique formé. (Haber & Weiss, 1934).

Le schéma réactionnel correspondant aux réactions entre les radicaux libres est présenté sur la Figure 14. Exceptée la réaction R3, ce sont des réactions de recombinaison des radicaux libres entre eux entraînant la formation du peroxyde d'hydrogène, d'oxygène et d'eau.

Nous avons reconsidéré les réactions R5 et R8. En effet, le composé HO_2^{\bullet} produit par la réaction R5 de la Figure 13 n'est autre que la base conjuguée de l'acide H_2O_2 . Or ce couple acido-

basique a un pKa égal à 11,6. Ceci implique que dans les milieux biologiques, où le pH est toujours inférieur à 7, seule la forme acide (H_2O_2) est présente dans le milieu. Autrement dit, dès que le composé HO_2° se forme par la réaction R5 il est quasiment entièrement converti en H_2O_2 . La conséquence est un schéma réactionnel avec une seule réaction R5, au lieu des deux, qui produit du peroxyde d'hydrogène (Figure 15).

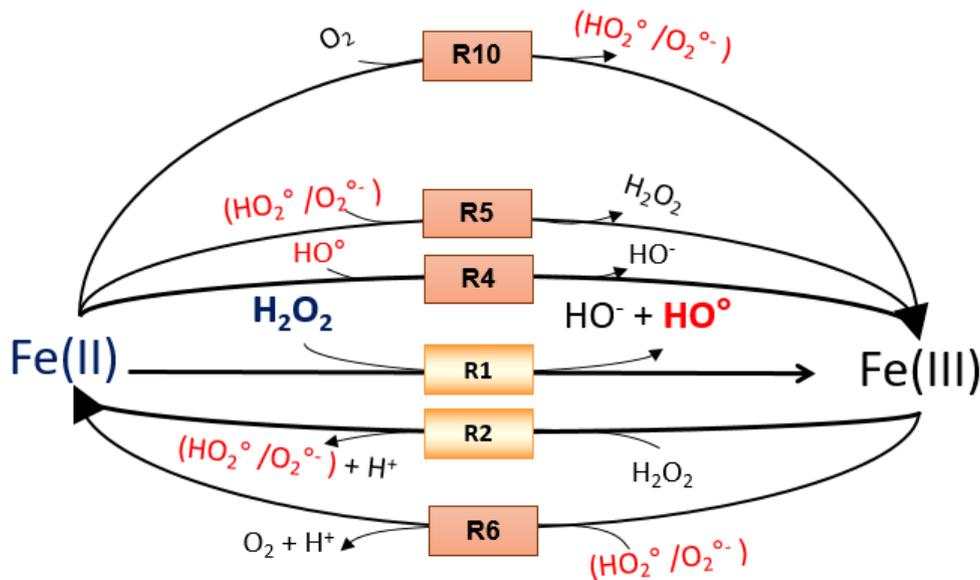


Figure 15 : Réactions impliquées dans le cycle Redox du fer revu par K.Oueslati

Les radicaux ($\text{HO}_2^\circ / \text{O}_2^{\circ-}$) : sur les Figure 13 et

Figure 14, une espèce radicalaire est présentée sous la forme d'un couple acido-basique ayant un pKa égal à 4,8 : le perhydroxyle (HO_2°) est un acide faible et le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) sa base conjuguée. La proportion des deux composés radicalaires varie avec le pH du milieu selon le diagramme de prédominance (Figure 16). Il montre, par exemple, à pH 3 et à pH 6, un pourcentage de radical superoxyde respectivement égal à 1,6% et 94%. Deux approches sont décrites dans la littérature pour prendre en compte ce phénomène dans les modèles mathématiques de la chimie de Fenton. La première consiste à considérer les deux composés radicalaires indépendamment en tenant compte de la réactivité propre de chacun dans les réactions R5, R6, R18 et R20 ; ceci double le nombre de réactions et oblige à ajouter aussi les deux réactions de l'équilibre acido-basique. La deuxième consiste à représenter les radicaux perhydroxydes et superoxydes comme un seul composé, ou couple ($\text{HO}_2^\circ / \text{O}_2^{\circ-}$) (Duesterberg *et*

al., 2005 ; Duesterberg & Waite, 2006 ; Duesterberg & Waite, 2007 ; Duesterberg *et al.*, 2008 ; Kwan & Voelker, 2002). Les auteurs utilisent alors des constantes de vitesse dites "composites", qui sont fonction du pourcentage des radicaux perhydroxyles et superoxydes selon le pH. Cette approche a donc été adoptée puisqu'elle simplifie les schémas réactionnels et réduit les durées de calcul. Nous avons exploité le diagramme de dissociation et les travaux des auteurs précédents pour établir des relations théoriques rendant compte de la variation des constantes réactionnelles des réactions R5, R6, R18 et R20 avec le pH Figure 16.

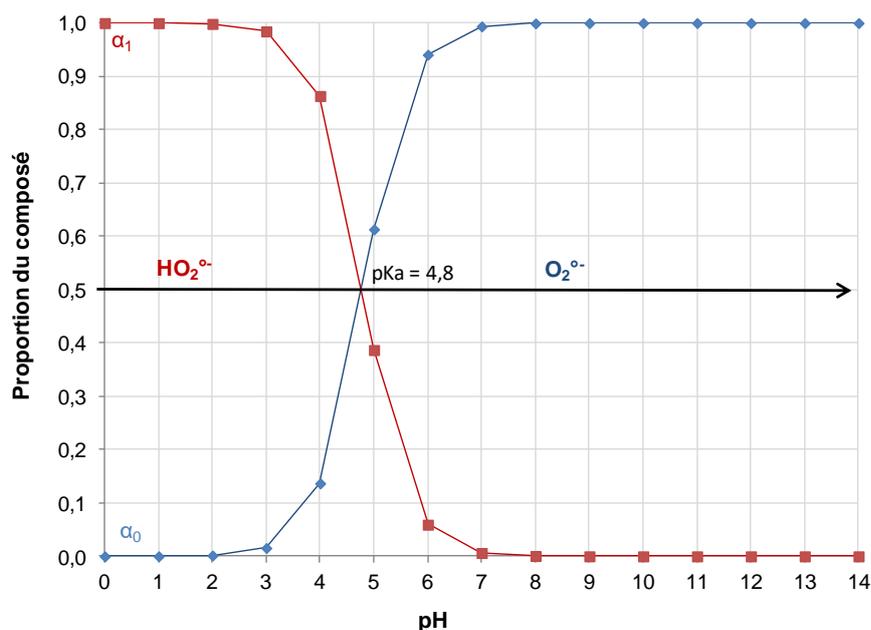
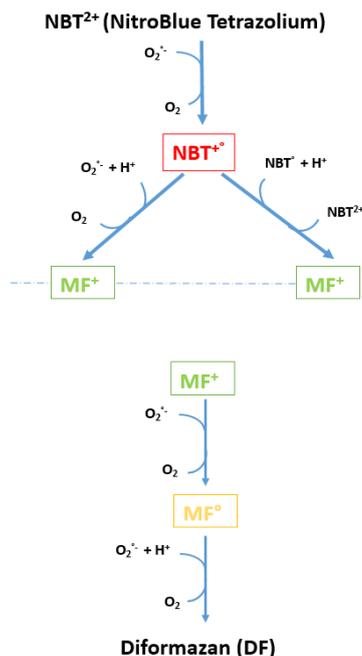
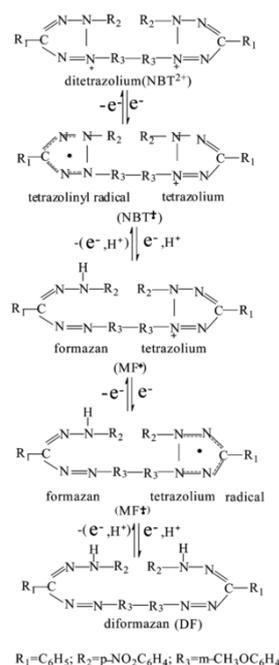


Figure 16 : Diagramme de prédominance du Couple (HO₂[°]/O₂^{°-}) (tiré de Promeyrat, 2013)

III.1.2 Le schéma réactionnel des sondes

- **NitroBlueTetrazolium (NBT)**

La Figure 17 montre que le NBT est formé de deux tetrazolium qui sont réduits successivement (Bielski *et al.*, 1980), donnant d'abord du monoformazan (MF), puis du diformazan (DF). La réduction de chaque tetrazolium nécessite deux électrons ; quatre électrons sont donc nécessaires pour réduire complètement le NBT en diformazan (DF).

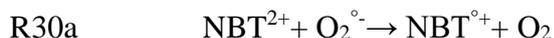


(a)

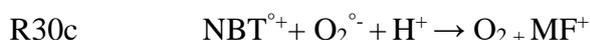
(b)

Figure 17 : Schéma réactionnel du NBT avec le radical superoxyde (Bielski, 1980) (a) Schéma réactionnel simplifié du NBT(b)

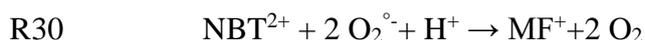
La réduction du NBT en MF, ou de manière équivalente celle du MF en DF, se fait en deux étapes successives. La première étape forme un radical tétrazolynile (NBT^{*}). Cette réaction est de second ordre.



Lors de la deuxième étape, deux réactions parallèles sont possibles : la dismutation ou la réduction du radical NBT^{*} par un deuxième anion superoxyde (O₂^{•-}). Dans les deux cas, il y a formation de (MF).

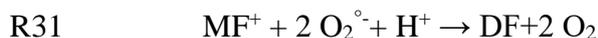


On montre que la réaction de bilan R31 de ces 3 réactions élémentaires s'écrit de la même façon que ce soit pour la voie réactionnelle R31a+R31b ou la voie R31a+R31c :



Les constantes de vitesses des réactions R30b et R30c de la deuxième étape sont considérablement plus élevées que celle de la première étape R30a qui est donc limitante.

Le même raisonnement conduit à la réaction de bilan R32 :



Liu et al. (2009) ont montré expérimentalement que si le ratio $(O_2^{\circ-})/NBT^{2+}$ est inférieur à 2, il se forme essentiellement du MF⁺ alors que s'il est supérieur à 4, c'est essentiellement du DF qui apparaît du fait de l'excès d' $O_2^{\circ-}$. Lorsque le ratio $(O_2^{\circ-})/NBT$ est compris entre 2 et 4, différents ratios de MF et DF se forment (Liu *et al.*, 2009).

Comme le DF a un coefficient d'absorption à 530 nm double de celui du MF, lors des essais nous avons mesuré globalement une concentration équivalente en MF. Dans le modèle, nous avons donc considéré les réactions de bilan 31 et 32 et calculé aussi une concentration équivalente en MF égale à la somme de la concentration en MF et du double de la concentration en DF.

- **Téréphtalate (TP)**

Fang *et al.* (1996) ont réalisé une série d'expériences très complètes qui ont permis d'établir le schéma réactionnel et d'identifier les composés intermédiaires entre le téréphtalate et l'hydrothéréphalate. Page *et al.* (2010) ont retenu dans leur étude que globalement, l'efficacité de l'hydroxylation du TP dans un milieu oxygéné est de 35% et ils ont réduit d'autant la valeur de la constante réactionnelle de la réaction de bilan suivante :



Lors de calculs de simulation préliminaires nous avons constaté que cette simplification ne permettait pas de prédire correctement la formation de l'HTP dans les conditions de nos essais. Il a donc été décidé d'introduire l'ensemble des réactions décrites par Fang *et al.* (1996). La Figure 18 présente l'agencement des réactions entre elles et indique les proportions de consommation des réactants quand il existe deux voies parallèles. Les réactions élémentaires R31 à R38 (Figure 18) constituent donc le schéma réactionnel propre à la formation du HTP. Page *et al.* (2010) ont montré que le HTP peut aussi être dégradé par des radicaux hydroxyles (R38). Enfin, Fang *et al.* (1996) ont identifié les produits formés au cours de certaines réactions (R36 à 38). Ces derniers, qui n'interagissent pas avec les autres composés chimiques du milieu seront appelés « Composé perdu » (CP).

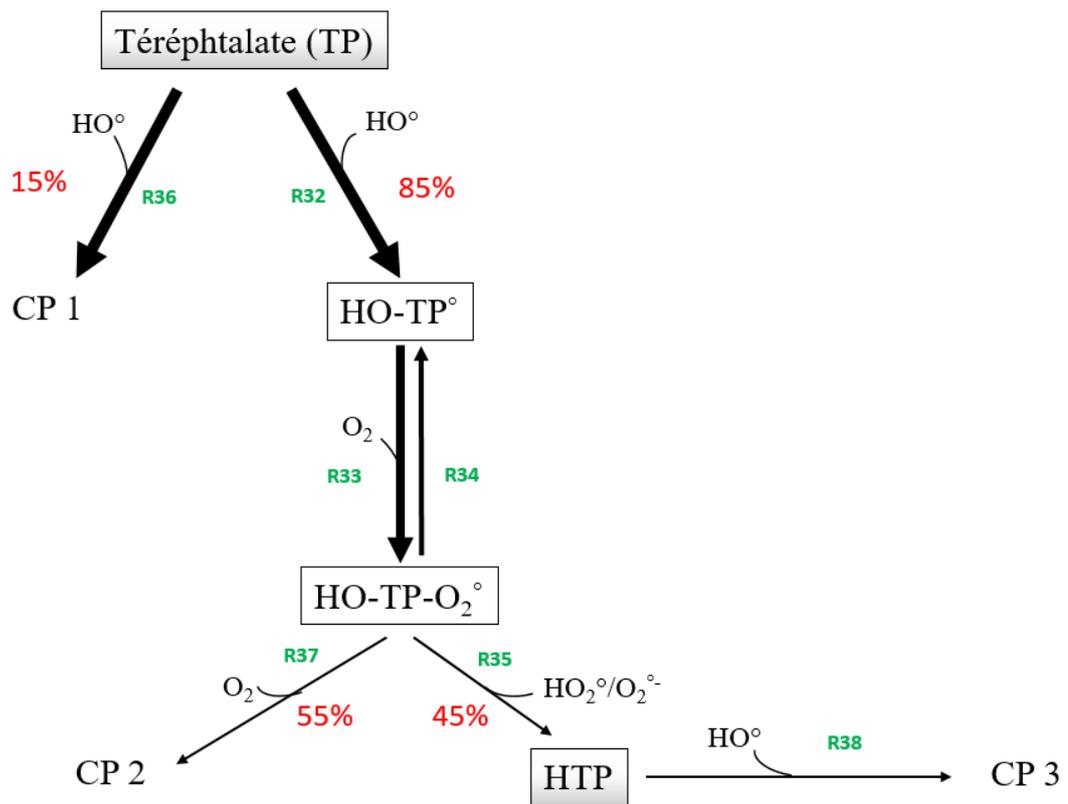


Figure 18 : Schéma réactionnel du Téréphtalate réagissant avec le radical hydroxyle (tiré de Fang,1996)

III.1.3 Schémas réactionnels des antioxydants (AO)

Les antioxydants peuvent avoir un rôle promoteur ou inhibiteur de la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles.

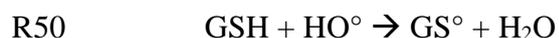
La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme capitale dans les systèmes biologiques puisqu'elle élimine le radical superoxyde; elle catalyse la réaction R18 de dismutation du couple ($\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^{\circ-}$) en peroxyde d'hydrogène (SOD).



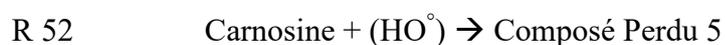
La catalase (Cat) est une enzyme ayant un rôle complémentaire à celui de la SOD dans les systèmes biologiques : elle catalyse la dissociation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (R21) évitant ainsi la production de radicaux hydroxyles.



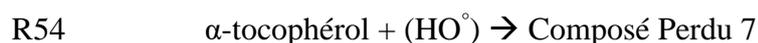
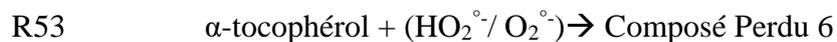
Le glutathion (GSH) peut chélater les ions ferreux et ainsi limiter leur participation à la génération de radicaux libres par les réactions R1, R4, R5 et R10. De plus, il est capable de réagir avec les radicaux hydroxyles (Halliwell & Gutteridge, 1990). Le radical thiyle (GS°), alors produit, peut intervenir, s'il n'est pas neutralisé par auto-association (GSSG), dans les processus d'oxydation, par des réactions avec l'oxygène qui conduisent à la formation d'un peroxyde ou de l'anion superoxyde (Thérond & Bonnefont-Rousselot, 2005).



La carnosine présente des propriétés antioxydantes en fixant le fer ou en réagissant avec les radicaux libres centrés sur l'oxygène.



L' α -TocH (Vitamine E) peut réagir directement avec le radical hydroxyle ($\bullet OH$). La réaction de la vitamine E avec l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ est très lente et par conséquent peu probable. Les constantes de vitesses de ces réactions sont connues.



La vitamine C est un diacide qui existe sous quatre formes différentes : acide ascorbique (AH_2), ascorbate (AH^-), dianion ascorbate (A^{2-}) et le déhydroascorbate (A). Pour les pH des viandes, compris entre 5 et 7, l'ascorbate (AH^-) est la forme majoritaire. Son activité antioxydante est exercée en piégeant directement le peroxyde d'hydrogène, les radicaux hydroxyles et les radicaux superoxydes. En réagissant avec les espèces réactives oxygénées (ERO), la vitamine C est oxydée en un radical ascorbyle ($A^{\circ-}$ ou AH° selon le pH du milieu) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. Les radicaux ascorbyles sont des formes instables qui se transforment en déhydroascorbate ou sont régénérés en ascorbate. Le recyclage de l'ascorbate peut se faire à partir de son produit d'oxydation (

Figure 19). La vitamine C est décrite comme étant un excellent antioxydant. Cependant, elle est aussi largement utilisée comme pro-oxydant (Buettner & Jurkiewicz, 1996). Ce

comportement paradoxal est lié à son fort pouvoir de réduction. Ainsi, la vitamine C réduit le fer ; le cycle redox de ces métaux étant fortement impliqué dans les processus d'oxydations.

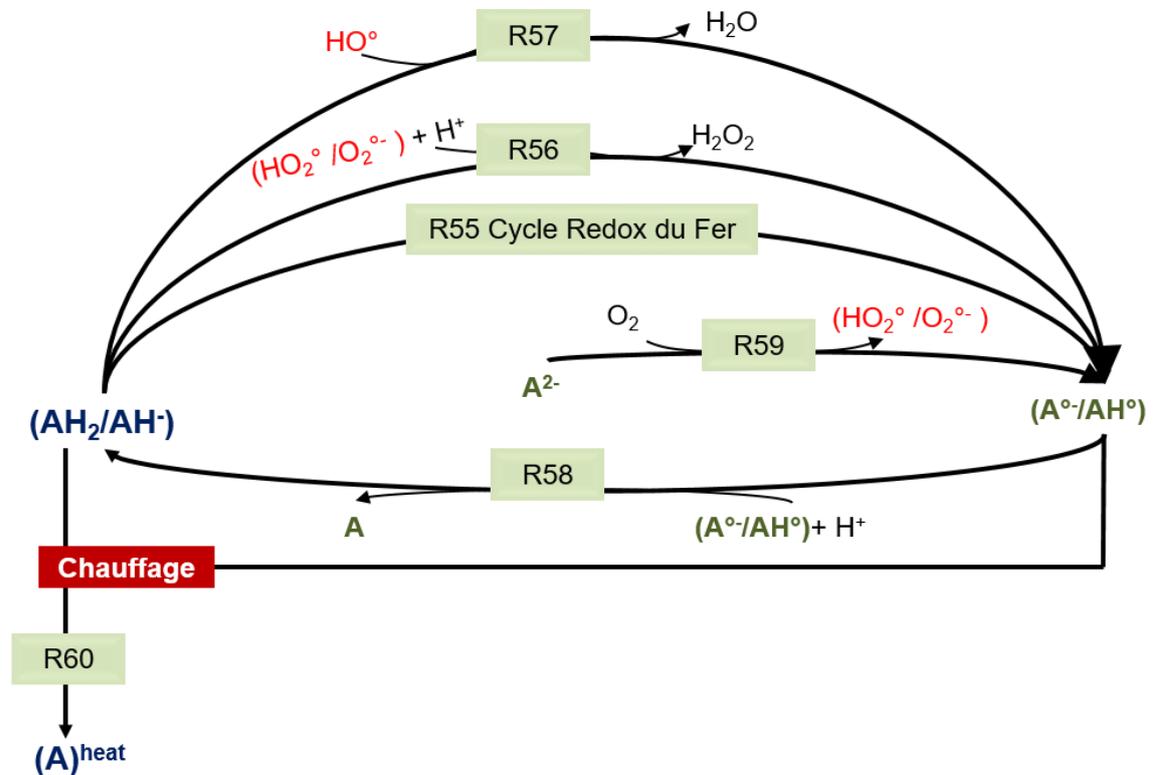
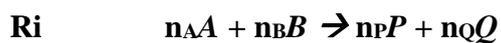


Figure 19 : Schéma réactionnel de la vitamine C (tiré de Promeprat, 2013)

III.2 Calcul des cinétiques chimiques

III.2.1 Principes

Dans une réaction chimique, les molécules interagissent avec d'autres et le résultat est la formation de "produits" à partir des molécules initiales ou "réactants". Dans la réaction chimique ci-dessous, n_A , n_B , n_P et n_Q représentent respectivement le nombre de moles des réactants A et B et des produits P et Q.



- n_A , n_B , n_P et n_Q sont les coefficients stœchiométriques.

La vitesse de la réaction est proportionnelle à la constante réactionnelle et à la concentration de chacun des réactants élevée à la puissance n . S'il s'agit d'une réaction élémentaire, la valeur de n est égale au coefficient stoechio-cinétique. Dans le cas d'une réaction bilan qui résulte de la combinaison de plusieurs réactions élémentaires, la valeur de n doit être identifiée à partir d'expériences ou déduite à partir de l'examen du schéma réactionnel complet des réactions élémentaires.

- k_i est la constante de vitesse de la réaction R_i ; sa valeur est indépendante du temps si les conditions ne changent pas (pH, température...).

$$V_i = -k_i[A]^{n_A}[B]^{n_B} \quad (2-1)$$

Les variations des concentrations des différents réactants et produits provoquées par cette réaction se déduisent de cette vitesse de réaction selon les équations 2-2, que la réaction soit élémentaire ou pas

$$-n_A \frac{d[A]}{dt} = -n_B \frac{d[B]}{dt} = n_P \frac{d[P]}{dt} = n_Q \frac{d[Q]}{dt} \quad (2-2)$$

Le principe des calculs que nous avons effectués peut être résumé à partir d'un exemple élémentaire, comprenant deux réactions interactives, avec trois réactants et deux produits, l'un des produits étant aussi un réactant. Les Équations 3-4 et 3-5 représentent ces deux réactions élémentaires, pour lesquelles les coefficients stœchiométriques et les constantes de vitesse sont connus :



Une matrice réactionnelle peut alors être écrite pour décrire ce système. Chaque ligne correspond à une réaction ayant une constante réactionnelle k ; elle indique le coefficient stœchiométrique associé à chacun des composés avec un signe négatif pour les réactants et positif pour les produits.

		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
<i>k_a</i>	Ra	-1	-1	1	0
<i>k_b</i>	Rb	0	0	-2	1

Cette matrice contient l'information suffisante pour traduire le système réactionnel en modèle stœchio-cinétique en écrivant les équations 2-3 à 2-7 lorsque les réactions sont élémentaires. Dans le cas d'une réaction non élémentaire, il faut en plus indiquer l'ordre relatif à chacun des réactants. Par convention, le coefficient stœchiométrique est alors mis entre parenthèse devant cet ordre. Par exemple, si la deuxième réaction n'est pas élémentaire avec un ordre égal à 1,2, la matrice réactionnelle précédente devient :

		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
<i>k_a</i>	Ra	-1	-1	1	0
<i>k_b</i>	Rb	0	0	1,2(-2)	1

Connaissant la concentration de chaque composé à l'instant *t*, les constantes de vitesse des deux réactions, *k_a* et *k_b*, et la matrice des réactants, il est possible de déterminer la vitesse des réactions à cet instant.

$$V_a = k_a [A]^1 [B]^1 [C]^0 [D]^0 = k_a [A]^1 [B]^1 \quad (2-3)$$

$$V_b = k_b [A]^0 [B]^0 [C]^n [D]^0 = k_b [C]^n \quad (2-4)$$

Avec *n* égal à 2 si la réaction Rb est élémentaire et *n* égal à 1,2 si elle (la réaction Rb) ne l'est pas.

Cela permet ensuite d'écrire un système d'équations aux dérivées ordinaires. Chaque équation relie la variation de la concentration d'un composé à l'instant *t* aux concentrations des réactants

en utilisant uniquement les coefficients stœchiométriques, que les réactions soient élémentaires ou non.

$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = -1 \times V_a + 0 \times V_b = -k_a [A]^1 [B]^1 \quad (2-5)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = 1 \times V_a - 2 \times V_b = k_a [A]^1 [B]^1 - 2k_b [C]^n \quad (2-6)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = 0 \times V_a + 1 \times V_b = k_b [C]^n \quad (2-7)$$

Les cinétiques de variation des quatre composés peuvent être alors calculées, en résolvant ce système d'équations en partant des concentrations de chacun d'entre eux, à $t = 0$.

Ainsi, l'intérêt d'une modélisation stœchio-cinétique est de pouvoir calculer simultanément les cinétiques de tous les composés d'un système réactionnel. Il faut cependant connaître les constantes de vitesse (k) et leurs éventuelles variations en fonction des conditions environnementales (température et variation de pH...).

L'unité d'une constante de vitesse dépend de l'ordre général de la réaction. Pour une réaction élémentaire. Ce dernier est égal à la somme des coefficients stœchiométriques des réactants. Cette unité est donc s^{-1} , $M^{-1}s^{-1}$ quand l'ordre est respectivement 1 ou 2.

III.2.2 Incidence des conditions physicochimiques sur les constantes réactionnelles

La constante réactionnelle d'une réaction chimique dépend de la température et du pH. Le principe est de définir une valeur de référence k_{ref} relative à un couple de référence (T et pH) et de multiplier cette valeur par des fonctions $f(T)$ pour la température, et $f(pH)$ pour le pH, afin d'obtenir la valeur de k dans d'autres conditions physicochimiques.

La dépendance de k à la température est généralement représentée par la loi d'Arrhenius.

Nous avons choisi une température de référence égale à 25°C. La fonction $f(T)$ s'écrit donc :

$$f(T) = \text{Exp} \left[-\frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T + 273} - \frac{1}{T_{Référence} + 273} \right) \right]$$

Avec

- E_a : Energie d'activation (J.mol^{-1}) ;
- R : Constante des gaz parfait ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ;
- T : Température ($^{\circ}\text{C}$) ;
- $T_{\text{Référence}}$: 25°C .

Dans la thèse de Promeprat (2013) les valeurs des constantes réactionnelles sont données pour un pH unique égal à 6. Ce pH avait été choisi car c'est le pH moyen de la viande cuite. Nous avons donc pris cette valeur comme pH de référence.

L'effet du pH sur le comportement du système réactionnel peut provenir de plusieurs raisons. Le premier cas concerne les réactions dont les ions H^+ ou OH^- sont des réactants ; le modèle rend compte de l'effet du pH simplement par le fait que les vitesses de ces réactions sont modulées par les concentrations de ces ions. Le deuxième cas concerne les réactions impliquant les ions ferreux ou ferriques du fait de la réduction de la concentration en fer réactif par complexation et/ou précipitation de ces ions. Ces derniers phénomènes sont analysés dans le paragraphe III.3.

Il n'y a pas de raison théorique pouvant justifier un impact du pH sur les constantes réactionnelles si ce n'est pour les réactions impliquant le couple ($\text{HO}_2^{\circ}/\text{O}_2^{\circ}$). En effet, une différence de réactivité des deux radicaux peut exister alors qu'ils ont été regroupés par simplicité dans un seul composé. Des fonctions $f(\text{pH})$ ont donc été construites pour les seules réactions R5, R6, R18 et R20. Nous nous sommes appuyés sur la synthèse de Bielski *et al.* (1985) qui ont récapitulé les résultats de plus de 200 études relatives à la réactivité respective de HO_2° et O_2° vis-à-vis de nombreux substrats en solutions aqueuses pour des pH compris entre 1 et 10. La démonstration relative à l'établissement de $f(\text{pH})$ de la réaction 18 est détaillée ci-dessous à titre d'exemple. Les résultats pour les 3 autres fonctions sont indiqués ensuite.

La réaction R18 peut être décomposée en deux réactions :



La variation de la concentration en H_2O_2 en fonction du temps due à la réaction 18 de notre modèle est donc la somme des vitesses des réactions R18a et R18b. Pour faire apparaître la

concentration en couple ($\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^\circ$), il suffit d'utiliser dans le calcul de ces vitesses la proportion de chaque radical dans le couple ($\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^\circ$). Par exemple, pour la réaction R18a :

$$V_{18a} = k_{18a} [\text{HO}_2^\circ]^2 = k_{18a} ([\text{H}^+]/(\text{Ka}+[\text{H}^+]))^2 [\text{couple } (\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^\circ)]^2 \quad (2-8)$$

Avec Ka (pKa = 4,8) la constante d'équilibre du couple acido-basique $\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^\circ$.

En procédant de la même façon pour la réaction R18b et en rapportant la valeur de la vitesse globale de R18 à un pH quelconque à celle à pH 6 il vient :

$$f_{18}(\text{pH}) = (0.154 + 17,96 X) / (1 + X)^2 \quad (2-9)$$

Avec $X = 10^{(\text{pH}-4,8)}$ et en prenant la valeur de référence à pH égale à 5,4 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ selon les informations données par Bielski *et al.* (1984). Les valeurs de k_{18} en fonction du pH, calculées par l'équation 2-9, sont présentées sur la Figure 20. Les valeurs aux pH 2 et 5 sont conformes à celles proposées par Kwan (2002) et Dusterberg (2007). Cette figure montre aussi que, comme cela avait été fait dans la thèse de Promeyrat (2013), une simple extrapolation des valeurs connues entre 3 et 5 conduit à une valeur nettement surestimée, d'environ $4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ à pH 6.

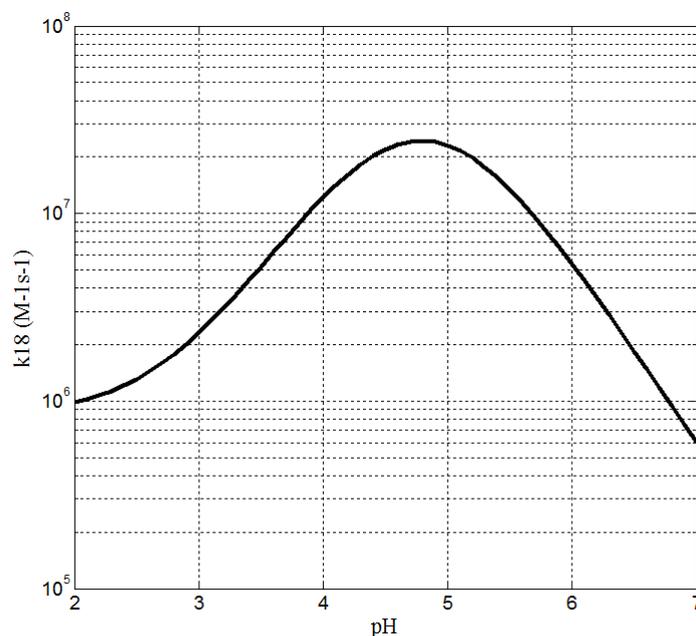


Figure 20 : Variation de la constante réactionnelle de la réaction de dismutation du radical superoxyde (R18) en fonction du pH à température ambiante.

En suivant un raisonnement analogue (annexe 2), les fonction f(pH) des réactions R5, R6 et R20 sont les suivantes :

R5 $f_5(\text{pH}) = (1,2 + 10 X) / (9,5 (1 + X))$, toujours avec $X = 10^{(\text{pH}-4,8)}$

$$R6 \quad f_6(\text{pH}) = 10^{-4.8} / (0.94 (10^{-4.8} + 10^{-\text{pH}}))$$

R20 $f_{20}(\text{pH}) = 1$ car les deux radicaux ont la même réactivité vis-à-vis de HO° .

III.3 Complexation, précipitation et réactivité du fer

Un complexe est constitué d'un atome central ou coordinateur, usuellement un atome métallique donneur d'électrons, auquel sont liés d'autres atomes ou groupes d'atomes qui acceptent ces électrons et que l'on appelle ligands ou coordinats. Burgot (2011) présente dans un ouvrage de synthèse les phénomènes principaux régissant la formation et la stabilité des complexes se formant dans en solutions aqueuses. Il édicte aussi les règles permettant de calculer les proportions des concentrations des complexes se formant dans des solutions aqueuses composées de mélanges de sel minéraux lorsque l'on connaît les constantes de stabilité de chacun des complexes pouvant se former. Ce domaine dépasse le cadre de cette thèse et ce paragraphe se restreint à résumer les faits essentiels qui nous ont permis de définir au mieux les facteurs de réactivités du FeII et FeIII dans le modèle stœchio-cinétique de la chimie de Fenton.

En absence de composés organiques, la formation des complexes dépend en premier lieu des proportions des ions minéraux ; la présence des anions hydroxydes OH^- est importante puisqu'elle conduit à la formation de complexes hydroxo avec les ions métalliques. Le pH qui détermine la concentration des OH^- est donc un élément déterminant. Aussi, l'affinité d'un ligand avec le fer peut varier énormément avec le pH (Von Wirén *et al.*, 1999). La connaissance de l'état de chélation du fer, également appelée « spéciation du fer », est donc un élément très important à prendre en compte pour comprendre les mécanismes d'oxydo-réduction du fer.

Dans les milieux biologiques, comme le tissu musculaire, le fer est aussi complexé à différentes molécules organiques (citrate, ascorbate, acides aminés libres, ATP, ansérine, carnosine....) ou minérales (sulfate, chlorures, carbonates, phosphate.....).

La précipitation du fer, qui n'est pas indépendante de la complexation, affecte aussi potentiellement sa réactivité dans la chimie de Fenton.

III.3.1 Impact de la complexation dans l'eau sur la chimie de Fenton

Une série de travaux relatifs aux réactions R1 et R10 a été menée par Millero et ses collaborateurs entre 1989 et 2006 (Santana-Casiano *et al.*, 2006; Millero *et al.*, 1991 ; Santana-Casiano *et al.*, 2006), puis par Morgan et Lahav (2007) en utilisant un système très

simple à base d'eau, de sels du fer et éventuellement de quelques autres ions. Ces travaux ont d'abord permis d'évaluer les valeurs des constantes réactionnelles apparentes (au moyen d'une seule réaction bilan globale) des réactions dans lesquelles le Fe II ou le Fe III est réactant en mesurant soit la variation de la concentration du Fe II au cours du temps, soit celle du peroxyde d'hydrogène. Le nombre de composés présents dans le milieu expérimental étant très réduit, il était possible de calculer par des formules analytiques les proportions des concentrations des complexes hydroxo du fer en utilisant les constantes de stabilité des différents complexes.

Le principal résultat de ces travaux est d'avoir démontré dans plusieurs conditions expérimentales que chaque complexe hydroxo a une réactivité propre dans la chimie de Fenton et que la variation des constantes réactionnelles apparentes, estimées en fonction du pH, s'expliquait simplement par la variation des proportions des concentrations de ces complexes.

- **Cas du Fe II**

A titre d'exemple, la Figure 21 montre la variation des concentrations des différents complexes hydroxylés du Fe II dans l'eau de mer (Morgan *et al.*, 2007). Ce résultat n'est évidemment pas extrapolable à d'autres milieux puisque tout ajout d'autres ions modifierait ces équilibres.

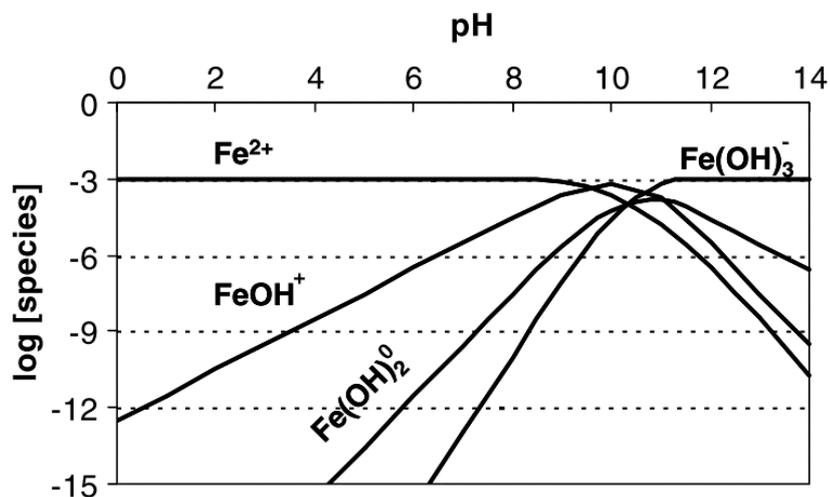


Figure 21 : Concentration en log des différentes formes de Fe(II) dans un milieu aqueux très dilué (Fe(II) = 10³ M)

Santana-Casiano *et al.* (2006), montrent que le ratio Fe II /H₂O₂ impacte la contribution de chaque complexe de fer dans la vitesse d'oxydation du fer II. En effet, la Figure 22 montre qu'à

pH 6 et un ratio Fe II/ H₂O₂ qui est égal à 0,9 ou à 5, la contribution de l'ion de l'ion libre Fe²⁺ à la vitesse d'oxydation du Fe II passe de 55 à 80 % alors que celle du complexe FeOH⁺ diminue de 38 à 19 %.

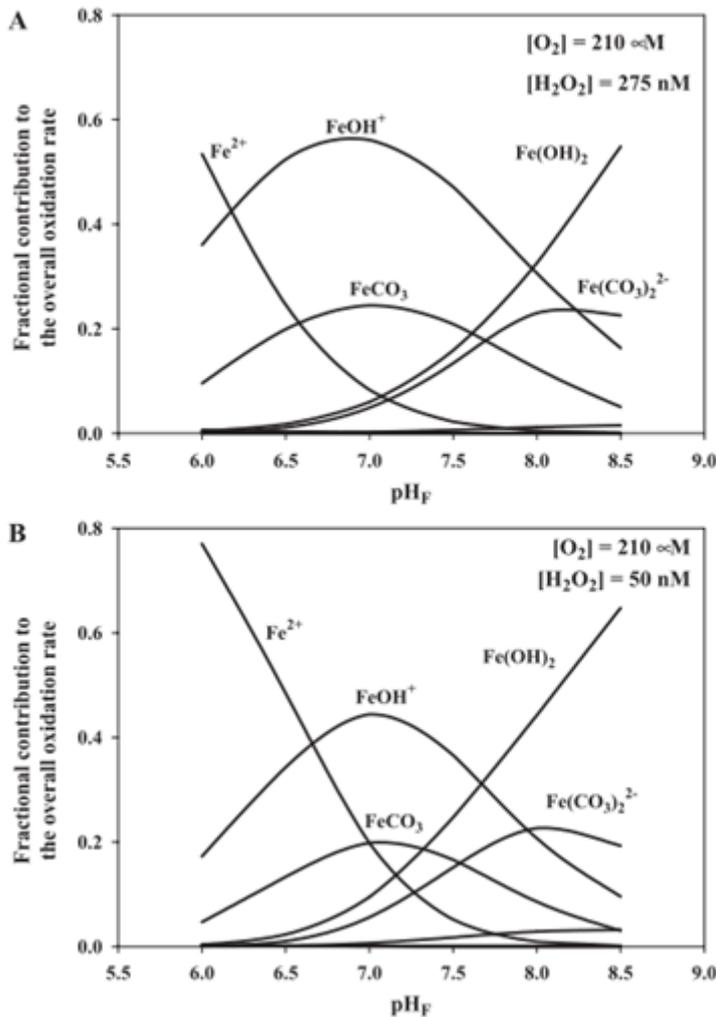


Figure 22 : Contribution de chaque complexe du Fe II dans la vitesse d'oxydation du Fe II par l'O₂ et H₂O₂ dans l'eau de mer ([O₂] = 210 μM, [Fe²⁺]_{t₀} = 250 nM) avec [H₂O₂]_{t₀} égales à 275 nM et 50 nM respectivement (Santana-Casiano *et al.*, 2006)

- **Cas du Fe III**

Millero (2001) a calculé les proportions des concentrations des complexes du Fe III en fonction du pH d'une part dans une solution de NaCl ayant une salinité égale à celle de l'eau de mer (Figure 23), et d'autre part, dans l'eau de mer (Figure 24). Dans le premier cas, le complexe FeOH²⁺ est majoritaire sur la plage de pH comprise entre 2,5 et 3,5 (Figure 23) alors qu'il

devient minoritaire sur cette même plage dans le deuxième cas du fait de la présence d'autres ions, même à faibles concentrations. Cet auteur a aussi montré que la modulation des concentrations des complexes de Fe III influence la vitesse des réactions de réduction du Fe III en Fe II dans la chimie de Fenton.

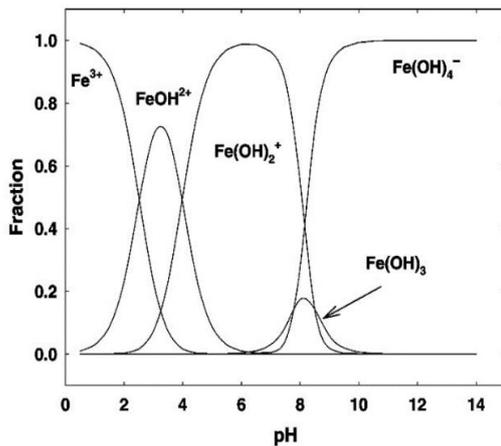


Figure 23 : Complexation du Fe III dans une solution saline à 0,7 M de NaCl à 25°C (Millero, 2001)

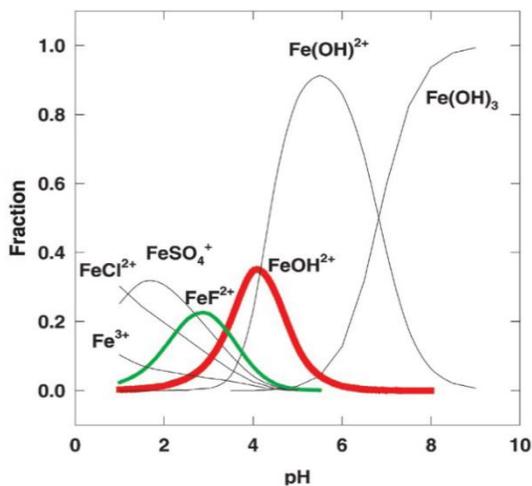


Figure 24 : Complexation du Fe III dans l'eau de mer à 25°C (Millero, 2001)

- **Précipitation du Fe III**

La précipitation du Fe III à pH neutre est un phénomène bien connu ; cette précipitation est susceptible de modifier considérablement la réactivité du fer dans la chimie de Fenton

puisque'une grande partie des atomes de fer se situe alors à l'intérieur dans les particules précipitées et ne peuvent plus réagir avec l'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène.

La solubilité du fer III en fonction du pH a été étudiée dans l'eau de mer par Kuma (1996) et par Millero (2001). La Figure 25 montre que la concentration en Fe III soluble diminue fortement avec le pH. A pH 6, pH de la plupart de nos essais, cette concentration est inférieure à 10^{-8} M, soit 10 nM. Les seuils à pH 2, 3,5 et 8 sont respectivement 10^{-2} M, 10^{-6} M et 10^{-9} M, soit 10 mM, 1 μ M et 1 nM. Millero (2001) a aussi montré que la solubilité du Fe III dépend des ions présents dans le milieu et de la force ionique. En effet, pour une force ionique égale à 0,2 la solubilité du Fe III dans l'eau de mer est 10 fois plus grande que dans un milieu salin très dilué contenant 0.7 M de NaCl. L'eau de mer contient davantage de minéraux ce qui améliore la solubilité du Fe III. La concentration en ions phosphate dans le milieu mimétique de la viande (40mM) est beaucoup plus importante que celle dans l'eau de mer (0.088ppm). Il n'est donc pas judicieux d'extrapoler les résultats de la littérature.

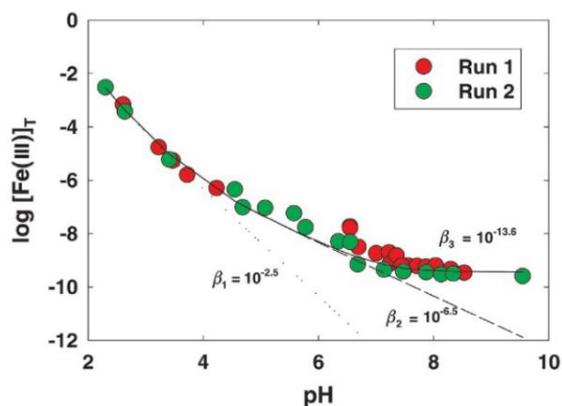


Figure 25 : Effet du pH et de la concentration initiale en Fe III sur la solubilité du Fe III dans l'eau de mer à 25°C (Millero, 2001)

La composition du milieu mimétique de la viande utilisé dans mes essais était très différente de celles des solutions diluées des travaux précédents. Lors d'essais préliminaires, j'ai laissé évoluer le milieu mimétique de composition suivante à 25°C pendant 30 minutes : 40 mM de phosphate, 200 μ M de FeSO₄. Après filtration à différents temps, le fer 'soluble' restant dans le filtrat a été dosé avec de la ferrozine (Stolze *et al.*, 1996). La filtration était effectuée sur un filtre d'ester de cellulose (0,2 μ m) ; ceci signifie que des particules plus petites pouvaient soit rester dans le filtrat, soit être adsorbées sur les fibres du filtre. Les résultats obtenus (Figure 26) montrent que la proportion en fer 'soluble' diminue très rapidement au cours du temps puis se stabilise avec des niveaux différents à 30 minutes. La concentration en fer 'soluble' est

beaucoup plus grande que dans les travaux précédents, même après 30 minutes au moment où tout le Fe II initial a certainement été transformé en Fe III. Il est vraisemblable que les concentrations élevées en SO_4^- et en PO_4^{2-} soient à l'origine de cette différence ; d'ailleurs, la concentration en fer 'soluble' dépend de la concentration initiale en FeSO_4 .

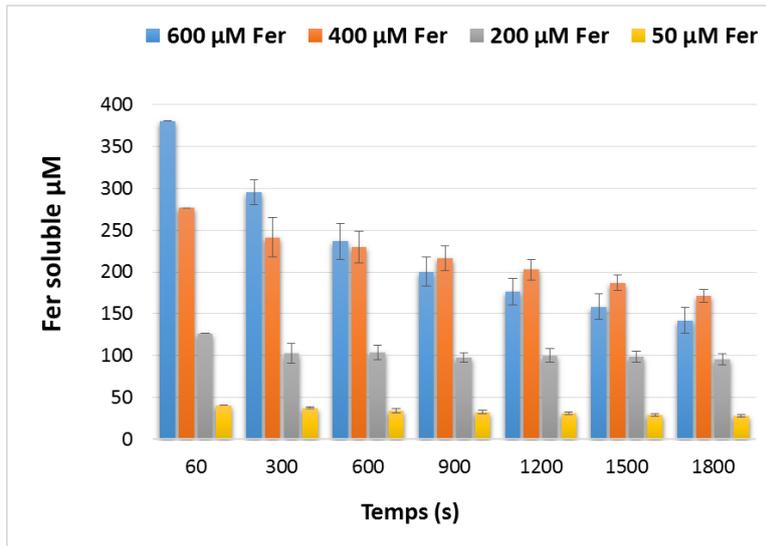


Figure 26 : Dosage du Fer soluble à différentes concentrations de Fer (25°C, tampon phosphate 40 mM, pH 6)

La question de la réactivité du fer insoluble, ou précipité, a été traitée par Kwan *et al.* (2002, 2003, 2004) dans une série d'études consacrées au traitement des eaux des nappes phréatiques polluées. Ces eaux contiennent des cristaux de ferrihydrites (oxy-hydroxyde-ferrique) dont la taille est de l'ordre de quelques nanomètres lorsqu'ils sont synthétisés en laboratoire (Hiemstra *et al.*, 2013) et qui évoluent sur des durées de plusieurs jours en donnant des cristaux de goethite, puis hématite, nettement plus gros. Les résultats de Kwan *et al.* (2003) ont montré que la vitesse de production des radicaux hydroxyles est proportionnelle au produit de la surface des cristaux et de la concentration en peroxyde d'hydrogène (Figure 27). Ceci démontre que le fer insoluble n'a pas une réactivité nulle et que le type de précipité détermine le coefficient de réactivité, c'est-à-dire le facteur de proportionnalité entre la concentration en fer totale et la concentration à prendre en compte dans les équations du modèle stœchio-cinétique.

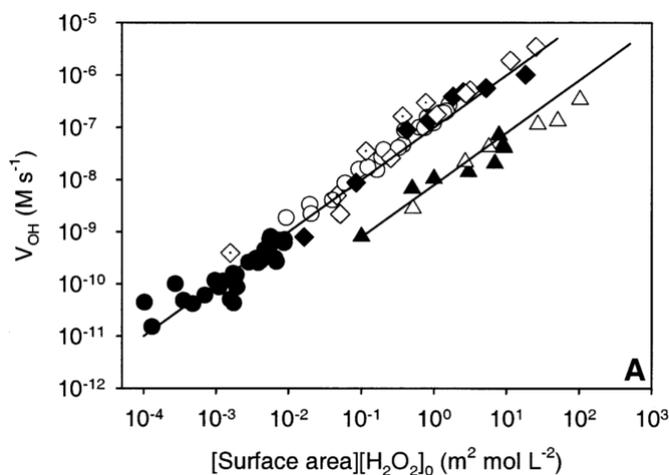


Figure 27: Vitesse de formation du radical hydroxyle suite à l'oxydation de trois différents oxydes de fer en fonction du ratio surface du fer précipité/ H_2O_2 à pH = 4 (tiré de Kwan *et al.*, 2002)

Les concentrations en ferrihydrite varient de 6 à 400 μM , avec $[H_2O_2]_0 < 1 \text{ mM}$ (●) et $> 5 \text{ mM}$ (○)

Les concentrations en Goethite varient : 0,02 g/L (◇), 0,2 g/L (◆) 0,6 g/L (◇)

Les concentrations en Hématite varient de 0,2 g/L (▲) à 1 g/L (△)

III.3.2 Influence de la présence des ions sulfate et phosphate

L'ion sulfate (SO_4^{2-}) est le produit ultime de la décomposition des thiols organiques (cystéine, méthionine, glutathion) dans la viande. Les teneurs en sulfate dans différents types de viandes sont données dans le Tableau 16. Il est donc important de tenir compte ses interactions avec le fer et avec les radicaux libres.

Tableau 16 : Teneurs en sulfate de différents types de viandes (Florin *et al.*, 1993)

<i>Viandes</i>	<i>Teneur en sulfate (mg/g)</i>	<i>Ecart-type</i>	<i>Nombre de répétition</i>
<i>Bacon</i>	0,15	0,35	3
<i>Bœuf salé</i>	0,24	0,07	2
<i>Saucisse de Francfort</i>	0,2	2,1	3
<i>Foie (bœuf, porc)</i>	0,16	0,57	2
<i>Viande rôtie (bœuf, volaille, agneau)</i>	0,15	0,78	6
<i>Jambon</i>	0,13	0,78	4
<i>Saucisse (style anglais)</i>	0,1	1,1	3

Le Truong *et al.* (2004) ont comparé les constantes de vitesse de la réaction R1 d'oxydation du fer ferreux par le peroxyde d'hydrogène en présence de plusieurs ions (perchlorate de sodium, nitrate de sodium, chlorure de sodium et sulfate de sodium). Les expériences ont été menées dans l'obscurité, à 25°C et à un pH < 3. En présence de sulfate, l'oxydation du Fe²⁺ est plus rapide et dépend du pH et de la concentration en sulfate. A titre d'exemple, les constantes de vitesse des réactions d'oxydation du Fe²⁺, FeCl⁺ et FeSO₄ par le peroxyde d'hydrogène sont respectivement 55, 55 et 78 M⁻¹s⁻¹. En revanche, la complexation du Fe III avec le SO₄²⁻ ralentie la régénération du Fe II dans le cycle de Fenton. Le Tableau 17 regroupe les principales réactions de l'ion en présence du réactif de Fenton. Dans cette même étude, les réactions V et VI montrent l'interaction entre les ions sulfates et les radicaux hydroxyles entraînant la formation d'une espèce radicalaire (SO₄^{•-}) à pH acide. Celle-ci est moins réactive que les radicaux hydroxyles. En effet, les constantes de vitesse d'oxydation de ce radical avec la plupart des composés organiques sont de l'ordre de 10⁶ à 10⁹ M⁻¹.s⁻¹ pour SO₄^{•-} (De Laat *et al.*, 2004), alors que celles des radicaux hydroxyles sont de l'ordre de 10⁷ à 10¹⁰ M⁻¹.s⁻¹ (Walling, 1975). D'autre part, le SO₄^{•-} réagit avec le Fe II et le peroxyde d'hydrogène (réactions IX, XI). La présence de cet ion peut également modifier la vitesse d'auto-oxydation du Fe II. Ainsi, Millero et Izaguirre (1988) ont observé une diminution de la vitesse d'auto-oxydation du Fe II en présence de SO₄^{•-}. Cet anion a été introduit dans notre modèle mimétique sous forme de FeSO₄ à des concentrations environ 10 fois plus petites que celles du Tableau 17 (Martell, 1974-89) puisque les concentrations en FeSO₄ étaient fixées pour contrôler la concentration en Fe II.

Tableau 17 : Principales réactions de l'ion sulfate et de ses complexes dans la chimie de Fenton (tiré de De Laat *et al.*, 2004)

N° de la réaction	Réaction	Constante réactionnelle
V	$\text{H}_2\text{SO}_4 + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{SO}_4^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	$1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
VI	$\text{HSO}_4^- + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$	$3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
VII	$\text{SO}_4^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{SO}_4^{2-} + \cdot\text{OH}$	$6.6 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
VIII	$\text{SO}_4^- + \text{OH}^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \cdot\text{OH}$	$1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
IX	$\text{SO}_4^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ + \text{HO}_2\cdot$	$1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
X	$\text{SO}_4^- + \text{HO}_2\cdot \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ + \text{O}_2$	$3.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
XI	$\text{SO}_4^- + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{SO}_4^{2-}$	$3.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
XII	$\text{SO}_4^- + 1\text{e} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	$E^\circ = 2.43 \text{ V}$

Durant la phase de la « *rigor mortis* », l'hydrolyse de l'ATP en ADP produit du phosphate (H_2PO_4^-). Le phosphate qui assure une grande partie du pouvoir tampon du muscle a été utilisé à cet effet dans le modèle mimétique ; sa concentration s'élève à 40 mM ce qui correspond à la concentration en phosphate dans le muscle du porc (Sherman, 2009).

En ce qui concerne la complexation de l'ion phosphate avec le fer, il faut souligner que ce phénomène est utilisé pour éliminer les phosphates des eaux usées en les précipitant. Ces phosphates sont sous diverses formes : ion phosphate, métaphosphate, polyphosphate et composés organophosphorés. Toutefois, seules les formes hydrogénées de l'ion phosphate peuvent être précipitées par du Fe II ou du Fe III en donnant du FePO_4 insoluble. L'acide phosphorique H_3PO_4 ayant 3 pKa, il se décompose selon le pH en différentes formes hydrogénées de l'ion phosphate (Figure 28). Enfin, Kochany et Lipczynska-Kochany (1992) ont montré que le phosphate, sous ses deux formes (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) réagit avec le radical hydroxyle. Les constantes de vitesses relatives à ces réactions sont indiquées dans le Tableau 18.

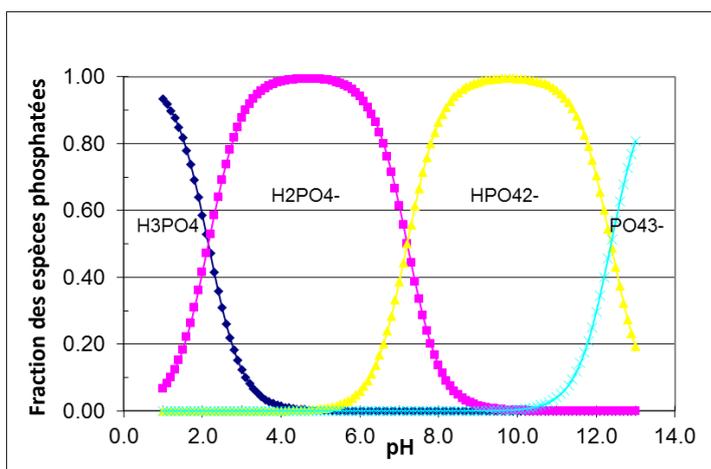


Figure 28 : Spéciation de l'acide phosphorique en fonction du pH en solution aqueuse (tiré d'Essington, 2015)

Tableau 18 : Valeurs des constantes de vitesses des réactions du radical hydroxyle avec différents anions (Kochany & Lipczynska-Kochany, 1992)

<i>Composé</i>	<i>pH</i>	<i>k (M⁻¹s⁻¹)</i>
PO ₄ ³⁻	11,2	7.10 ⁶
HPO ₄ ²⁻	7-8,5	6.10 ⁵
H ₂ PO ₄ ⁻	-	2.10 ⁴

III.3.3 Conclusions relatives aux coefficients de réactivité des Fe II et Fe III

Les phénomènes de complexation et précipitation du fer sont très compliqués et mettent en jeu de très nombreux composés dès que le milieu réactionnel s'éloigne de solutions aqueuses simples. Notamment, les concentrations des différents complexes pouvant exister ne sont plus calculables par des formules analytiques ou par des calculs approchés. A partir des travaux relatifs à la chimie de Fenton dans les solutions diluées, dans l'eau de mer et dans les eaux des nappes phréatiques deux conclusions importantes peuvent néanmoins être tirées :

1. Les différents complexes du Fe II et du Fe III constituent autant de voies parallèles pour chacune des réactions de la Figure 15. La constante réactionnelle de la réaction globale considérant tous les complexes comme un seul composé, Fe II ou Fe III, est une combinaison linéaire des constantes réactionnelles des différentes réactions parallèles dont les coefficients sont les proportions des complexes.
2. La précipitation du fer qui est importante à pH 6 est fortement réduite par la présence des ions sulfates et phosphates. De plus le fer précipité réagit dans la chimie de Fenton en fonction de la proportion des atomes de fer situés en surface des particules précipitées.

Dans les deux cas, complexation et/ou précipitation, un coefficient de proportionnalité appliqué à la concentration totale en Fe II ou FeIII permet de rendre compte des observations. Ce coefficient sera appelé par convention 'réactivité'. Il est impossible d'estimer théoriquement les valeurs des réactivités des Fe II et Fe III correspondant à nos conditions expérimentales ; elles seront donc ajustées. Par simplicité nous avons négligé une possible évolution de ces réactivités au cours du temps.

Afin de discuter nos résultats nous avons estimé par des calculs théoriques les concentrations des différents complexes du fer, et précipités, pouvant être présent dans le milieu mimétique. Les calculs ont été effectués avec le logiciel Visual MINTEQ 3.0 (Gustafsson, 2012). Les calculs reposent sur la thermodynamique chimique des équilibres en solutions aqueuses pour lesquelles existe une large base de données regroupant les constantes de stabilités des complexes. Ces calculs utilisent le modèle de Debye-Hückel qui rend compte des interactions entre les ions afin d'estimer les coefficients d'activité associés à chacun d'eux (écart à l'idéalité). Les calculs ont été faits en prenant en compte la précipitation éventuelle des différents complexes du fer. Ils estiment aussi le pH et la force ionique vraie en tenant compte des coefficients d'activité.

III.4 Valeurs les plus probables des constantes de réaction k_{ref} et des énergies d'activation E_a

Les valeurs les plus probables des constantes de réactions et des énergies d'activation du système Fenton, des réactions relatives aux sondes NBT (2 réactions bilans) et TP (7 réactions élémentaires) et des réactions relatives à chaque antioxydant sont commentées en IV.2.2

(Tableau 21). L'organisation du fichier d'entrée et l'organigramme du programme Matlab® sont décrits dans l'annexe 1.

Résultats

IV. Résultats

Ce chapitre est composé de 3 paragraphes.

Le 1^{er} paragraphe présente les résultats expérimentaux de suivi de la production des radicaux libres de la chimie de Fenton. Le paragraphe 2 est une analyse des performances du modèle stoechio-cinétique pour simuler ces résultats expérimentaux. Les paragraphes 3 et 4 sont consacrés à l'étude de la formation des radicaux libres suite à l'extension du domaine expérimental au salage ou au marinage de la viande (3) ainsi qu'à sa digestion (4).

IV.1 Analyse de l'effet des réactants, de l'état du fer et de l'ajout d'antioxydants sur la formation des radicaux libres par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de viande : **mesure des cinétiques au moyen de sondes chimiques**

**Analyse de l'effet des réactants, de l'état du fer et de l'ajout
d'antioxydants sur la formation des radicaux libres par la chimie
de Fenton dans un milieu mimétique de viande : mesure des
cinétiques au moyen de sondes chimiques**

Khaled Oueslati, Jean Dominique Daudin, Alain Kondjoyan and Philippe Gatellier*

INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France

*Corresponding author: Philippe Gatellier, tel. +33 473 62 41 98; fax: + 33 473 62 42 68;
email address: Philippe.gatellier@clermont.inra.fr

Abstract

During meat processes (chilled storage, curing, cooking...), the production of free radicals (superoxide $O_2^{\circ-}$ and hydroxyl HO°), in which iron in reaction with oxygen and peroxides plays a key role, leads to the accumulation of oxidative damages on proteins and lipids. The present study was designed to determine the kinetic laws governing the free radical production according to the physicochemical environment. Experiments were carried out on model systems which mimic the physicochemical conditions observed in meats during storage or cooking (pH 6, ionic strength of 0.24 M, and temperatures varying from 4 to 60°C). Oxidants (Fe^{2+} and H_2O_2) were added in the model in physiological concentration. Antioxidants (Superoxide Dismutase (SOD), Catalase, Carnosine, Gluthation, Vit C and Vit E) were added to assess their effects on free radical production that was evaluated with the use of specific probes (Nitro Blue Tetrazolium for $O_2^{\circ-}$ and Terephthalate for HO°). Results show how much the amount of radicals trapped increases with increasing temperature and iron content. The addition of H_2O_2 promotes the formation of HO° to the detriment of $O_2^{\circ-}$. SOD reduces $O_2^{\circ-}$ production.

Carnosine, catalase and glutathione have an inhibitory effect on the production of hydroxyl radicals.

Keywords: Meat; free radicals; iron oxidation; antioxidants

IV.1.1 Introduction

Les procédés de transformation (conservation, cuisson, salaison) permettent de préserver et/ou d'améliorer certaines qualités des produits animaux mais peuvent conduire aussi à l'oxydation des lipides et des protéines avec un impact négatif sur les qualités sensorielles (Haak, Raes, Smet, Claeys, Paelinck, & De Smet, 2006) et nutritionnelles (Gatellier, Santé-Lhoutellier, Portanguen, & Kondjoyan, 2009) des produits. La maîtrise de la qualité des produits carnés nécessite une meilleure compréhension des mécanismes responsables des phénomènes oxydatifs et des lois cinétiques qui les régissent. Au cours des processus oxydatifs la phase d'initiation des oxydations est capitale. Cette phase se caractérise par la vitesse à laquelle l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène, en interaction avec le fer (dont la viande est plus ou moins riche selon l'espèce), se transforment en radicaux libres. La production de ces radicaux est modulée par les antioxydants (AO) présents dans la viande. Ces AO peuvent avoir un effet promoteur ou inhibiteur sur la production des radicaux libres.

L'oxydation du fer dans la viande entraîne la formation de radicaux libres : le radical superoxyde (O_2°) et le radical hydroxyle (HO°). Les réactions impliquées dans la formation de ces radicaux sont nombreuses et complexes. Elles constituent la chimie de Fenton. Celle-ci comporte des réactions du cycle oxydo-redox du fer et des réactions de recombinaisons entre les radicaux formés (Figure 29). A ce système Fenton, s'ajoutent les réactions des AO de la viande dont certains agissent sur la production des radicaux superoxydes et d'autres agissent sur la production des radicaux hydroxyles. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'oxydation du fer dans la viande et les modes d'action des AO sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles, il faudrait modéliser ces phénomènes complexes.

Dans cette étude, on s'intéresse aux radicaux superoxydes et hydroxyles. Le radical superoxyde n'est pas directement impliqué dans la dégradation de la qualité sensorielle et nutritionnelle de la viande. Néanmoins, sa dismutation engendre la formation du peroxyde d'hydrogène responsable de l'oxydation du Fe^{2+} et de la production du (HO°). En effet, le H_2O_2 favorise la voie 1 au détriment de la voie 10 du cycle de Fenton entraînant la formation d'avantage d' HO° . Ce radical est responsable de l'oxydation des protéines et des lipides de la viande.

De nombreuses études sur la chimie de Fenton ont été réalisées pour traiter une large variété de déchets, notamment ceux associés à l'industrie du textile, aux eaux usées, aux effluents toxiques non biodégradables et aux pesticides (Esteves *et al.*, 2016) (Cihanoğlu *et al.*, 2015). La chimie de Fenton a aussi été étudiée en chimie atmosphérique, en médecine et dans des systèmes biologiques (Shaeib *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2016).

Ces études ont permis d'identifier les valeurs des constantes de vitesse des réactions de Fenton dans **des conditions différentes de celles de la viande**. En effet, certaines espèces chimiques tel que les ions phosphate sont présentes à des concentrations élevées dans la viande par comparaison aux autres milieux (eaux de mer, eaux usées, nuages...). Ces espèces chimiques sont susceptibles de se complexer avec les ions ferriques et ferreux en modifiant potentiellement leurs réactivités et leurs solubilités. Le pH impacte également la solubilité du fer et par conséquent les vitesses des réactions dans lesquelles le fer est réactant.

Pour toutes ces raisons, des expérimentations ont été menées dans un milieu mimétique basique de la viande afin de réduire au maximum les interactions entre les espèces radicalaires formées suite à l'oxydation du fer ($O_2^{\circ-}$, HO°) et les espèces organiques (protéines et les lipides : cibles des radicaux hydroxyles). Ces essais ont été réalisés en fonction de la température (pour mimer la conservation et la cuisson), de la concentration en fer (pour mimer les différents types de viandes blanches et rouges) et la concentration en H_2O_2 (espèce chimique présente dans la viande et très impliquée dans l'oxydation du fer). Le milieu mimétique a été complexifié par l'ajout d'AO **présents dans la viande** (Superoxyde Dismutase (SOD), Catalase, Carnosine, Glutathion (GSH), Vitamine E et C) afin d'étudier leurs impacts sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles.

Ces données expérimentales permettront de **mieux** comprendre les mécanismes impliqués dans la production des radicaux superoxydes et hydroxyles, de **mieux** comprendre les mécanismes d'action des AO sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles et de déterminer les paramètres cinétiques du schéma réactionnel représentant au mieux la chimie de Fenton ainsi que des réactions des AO. Ces paramètres sont indispensables à la construction d'un **modèle stœchio-cinétique** capable de simuler l'oxydation du fer dans la viande ainsi que les effets des AO sur la production de ces radicaux libres.

La viande constitue une source importante de fer. Ce dernier existe sous deux formes : une forme héminique et une forme non héminique. La teneur en fer total et le rapport entre le fer héminique et le fer non héminique dépendent de l'espèce animale et du type de muscle (Lombardi-Boccia, Martinez-Dominguez, & Aguzzi, 2002 ; Mien, Nam, Cordray, et Ahn,

2008). La forme héminique correspond à la myoglobine, pigment protéique rouge de la viande, comportant une molécule, l'hème, qui renferme un atome de fer.

Le fer non héminique est complexé à des protéines de transport, la transferrine plasmatique, et à des protéines de stockage : la ferritine. L'abaissement du pH post mortem (< 5,6) conduit à un relargage du fer sous la forme Fe II par les protéines le contenant in vivo. Le fer non héminique provient essentiellement de la ferritine qui peut contenir jusqu'à 2500 atomes de fer/molécule contre 2 atomes de fer/molécule avec la transferrine (Buettner & Schafer, 2012).

Le fer héminique ferreux, en présence d'O₂, s'oxyde en fer ferrique et l'hème libère l'oxygène sous forme de radical superoxyde. La metmyoglobine ainsi formée peut réagir avec H₂O₂ et produire la ferryl-myoglobine. Le fer héminique peut aussi intervenir, indirectement, dans la réaction de Fenton. En effet, la myoglobine, comme toute protéine, se dénature au chauffage. Pour des températures élevées et des temps de chauffage long, la dénaturation de la myoglobine est accompagnée d'une libération du fer. Ce phénomène correspond à un décrochage de l'hème au niveau de la myoglobine induisant un relargage du fer sous forme libre Purchas *et al.* (2003). Afin de mieux comprendre le degré d'implication du fer héminique dans la chimie de Fenton durant la transformation de la viande, on s'intéressera au fer décrochée de l'hème sous l'effet de la température.

Le fer ferreux non héminique réagit avec l'oxygène pour former le radical superoxyde (O₂^{•-}) et réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former le radical hydroxyle. En effet, le tissu musculaire contient du (H₂O₂) issu essentiellement de la dismutation du radical superoxyde.

Dans cette étude, on prendra donc en compte l'oxydation du **fer non héminique** qui constitue la chimie de Fenton (Figure 29) (Fenton, 1894). Le radical superoxyde (O₂^{•-}), le radical perhydroxyle (HO₂[•]) ainsi que le radical hydroxyle (HO[•]) conduisent à l'oxydation des lipides et des protéines au cours du stockage et la cuisson de la viande.

Deux grandes catégories d'antioxydants existent : (i) les antioxydants endogènes, composés de systèmes enzymatiques (SOD, Catalase) reconnus comme étant les plus performants (Théron & Bonnefont-Rousselot, 2005), (ii) les antioxydants endogènes non enzymatiques (peptidiques) et (iii) les antioxydants exogènes apportés par l'alimentation des animaux (vitaminiques). Dans la catégorie des AO enzymatique, on distingue :

- la SOD : Il en existe trois : la Mn SOD, la SOD extracellulaire et la Cu-Zn SOD majoritaire dans la viande dont l'activité est dépendante des apports nutritionnels en métaux (Fe, Cu, Zn, Mn). Cet enzyme accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (R18).

- la Catalase : a une fonction complémentaire à la SOD puisqu'elle catalyse la dissociation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (R21).

Dans la catégorie des AO peptidiques, il y a :

- le glutathion (GSH) qui est un tri-peptide capable de réagir avec les radicaux hydroxyles. Le radical thiyle (GS°) produit peut intervenir, s'il n'est pas neutralisé par auto-association (GSSG), dans les processus d'oxydation, par des réactions avec l'oxygène qui conduisent à la formation d'un peroxyde ou de l'anion superoxyde (Thérond & Bonnefont-Rousselot, 2005).
- la carnosine qui est un dipeptide de l'histidine. La carnosine présente des propriétés antioxydantes notamment en fixant les métaux de transitions (fer, cuivre, zinc, cobalt) et en piégeant les radicaux libres centrés sur l'oxygène. La carnosine et le glutathion ont un effet pro-oxydant possible par réduction du fer ferrique en fer ferreux (Mozdan *et al.*, 2005 ; Simpson *et al.*, 1998).

Dans la catégorie des AO exogènes, on trouve la vitamine C (ascorbate) et E (α -tocophérol) qui piègent les radicaux libres centrés sur l'oxygène. Des études *in vitro* ont montré que l' α -tocophérol et l'ascorbate peuvent aussi avoir un rôle pro-oxydant par réduction du fer ferrique en fer ferreux (Khalil, 2002) (Premkumar & Bowlus 2004). Pour les pH des viandes, compris entre 5 et 7, l'ascorbate (AH-) est la forme majoritaire. Son activité antioxydante est exercée en piégeant directement les radicaux hydroxyles et les radicaux superoxydes.

Afin de détecter les radicaux libres produits dans le milieu mimétique de la viande, plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature dont la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) : cette méthode est applicable lorsque les radicaux libres sont produits en quantités relativement élevées et est plus adaptée à des milieux complexes.

Pour l'étude des cinétiques dans un milieu simple, la méthode des sondes chimiques est plus adéquate. Pour les radicaux superoxydes, on distingue les sondes : généralement utilisées comme indicateur non quantitatif (Auclair, 1985). Certaines sondes sont incompatibles avec notre milieu expérimental. L'Epinephrine est, par exemple, peu soluble en milieu aqueux. La Ferricytochrome est instable à la chaleur. Toutefois, l'utilisation des sondes spectrophotométriques est très répandue en biologie (Armstrong & Whiteman, 2007; Fridovich, 1997; Gomes, Fernandes, & Lima, 2005; Tarpey, Wink, & Grisham, 2004). Dans cette étude, le NitroBlueTetrazolium (NBT) a été choisi pour sa spécificité aux radicaux superoxydes, sa solubilité dans l'eau et sa stabilité thermique (Altman, 1976). Son mécanisme de réaction avec l'anion ($O_2^{\circ -}$) est connu.

Pour la détection des radicaux hydroxyles, l'utilisation de sondes fluorogènes est répandue présente des avantages dont la sensibilité accrue. Certaines sondes présentent néanmoins des inconvénients tel que l'acide salicylique dont l'affinité importante pour le Fe III peut poser problème (Cheng *et al.*, 2002) ou l'acide benzoïque qui réagit avec le radical hydroxyle pour former plusieurs produits de substitution. Dans cette étude, la sonde choisie est le téréphtalate (TP). Il s'agit d'une sonde aromatique cyclique fluorogène utilisée dans des milieux biologiques et considérée spécifique aux (HO°). La réaction du (HO°) sur l'un de ses quatre cycles aromatiques induit la formation de 2-hydroxytéréphtalate (HTP).

Il est indispensable d'étudier l'effet de la température pour ajuster les énergies d'activation des réactions impliquées dans la chimie de Fenton et les réactions des AO.

Les données expérimentales sur l'effet de la concentration initiale en Fe II et en H_2O_2 ainsi que l'effet des AO sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles sont nécessaires pour évaluer les valeurs des constantes de vitesse des réactions qui y sont impliquées.

Dans cette partie, le but est de mesurer, expérimentalement, les cinétiques de formation des radicaux superoxydes et hydroxyles en fonction de la température, des concentrations initiales en Fe II et en H_2O_2 dans un milieu mimétique basique. On s'intéressera également aux effets des AO sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles en fonction de la température. L'objectif est, d'une part, de mieux comprendre l'évolution de la phase d'initiation de l'oxydation dans la viande, et d'autre part, d'élaborer un modèle mathématique stochiocinétique représentant les réactions élémentaires de la chimie de Fenton et des AO dans le but de pouvoir simuler le comportement du système réactionnel pour de nombreuses conditions après ajustement de certains paramètres (la réactivité du Fer II et III, les valeurs de certaines constantes de vitesse k et énergies d'activation (E_a)).

IV.1.2 Matériels et méthodes

Le milieu réactionnel est constitué de tampon phosphate 0,40 mM à pH 6. Les oxydants (FeSO_4 et H_2O_2) sont dissous dans ce milieu à des concentrations variables (de 50 à 600 μM pour le fer et de 200 à 2000 μM pour H_2O_2). Le taux d'oxygène dissous dans le milieu est déterminé par la température et mesuré avec une sonde à oxygène (HACH-LANGE). La sonde de détection des radicaux superoxydes (Nitro Blue Tetrazolium, NBT) est utilisée à la concentration de 500 μM et la sonde de détection des radicaux hydroxyles (téréphtalate) est utilisée à la concentration de 1000 μM (Tableau 19). La réduction du NBT en formazan est suivie par absorbance à 530

nm (Auclair et Voisin, 1985). L'hydroxylation du téréphtalate en hydroxytéréphtalate est mesurée par fluorescence (émission à 420 nm après excitation à 340 nm) (Saran et Summer, 1999). Les mesures sont effectuées à intervalles réguliers pendant 30 minutes. Différentes températures ont été testées de 4 à 75°C. Pour les mesures de fluorescence, le spectrofluorimètre étant équipé d'un Peletier, le chauffage et le refroidissement se font directement dans la cuve du spectrofluorimètre. Pour les mesures d'absorbance le chauffage est réalisé à l'extérieur du spectromètre à l'aide de bains chauffants ou réfrigérants.

Trois catégories d'antioxydants sont testées : un antioxydant lipidique, le trolox C, analogue hydrosoluble de la vitamine E (α -tocophérol), des antioxydants enzymatiques (SOD et catalase) et deux antioxydants peptidiques, la carnosine et le GSH.

L'effet des antioxydants est testé à deux groupes de températures : basse température 4 et 10°C (températures de conservation) et hautes température 45°C et 60°C (températures de cuisson). Dans le premier cas, la durée des essais est de 20h au lieu de 30 minutes. Les concentrations en AO sont des concentrations moyennes physiologiques :

- Superoxyde dismutase (Cu-Zn SOD) = 240 U.mL⁻¹ Young *et al* (2005)
- Catalase = 640 U.mL⁻¹ Young *et al* (2005)
- Carnosine = 20mM
- Glutathion = 0.85mM Williams *et al* (2007)
- Trolox C = 2.9µg.mL⁻¹ Trefan *et al* (2011)
- Ascorbate = 0.1mM Decker *et al* (2000)

L'effet promoteur ou inhibiteur de chaque AO est calculé comme suit :

$$\frac{\text{Essai avec AO} - \text{Essai sans AO}}{\text{Essai sans AO}}$$

- Essai avec AO : valeur de l'absorbance (cas du formazan) ou la fluorescence (cas du HTP) dans un milieu standard auquel un AO est rajouté.
- Essai sans AO : valeur de l'absorbance (cas du formazan) ou la fluorescence (cas du HTP) dans un milieu standard témoin sans AO.

Si le résultat est positif, on dit que l'AO a un effet promoteur sur la production du radical concerné (superoxyde ou hydroxyle). Sinon, l'AO est considéré comme inhibiteur.

Pour chaque condition expérimentale, les essais ont été répétés 4 fois.

IV.1.2.1 Calibration de la fluorescence

En absence de fer, la fluorescence du HTP est proportionnelle à la concentration en HTP (A.H. Barati, 2006; Qu, Kirschenbaum, & Borish, 2000). Ce résultat a été vérifié et a permis de convertir la fluorescence du HTP en concentration du HTP.

D'autre part, dans nos conditions, à pH 6, le Fe^{3+} ; produit d'oxydation du Fe^{2+} par l' O_2 et l' H_2O_2 , est peu soluble. De plus, le Fe^{3+} se chélate au phosphate du milieu pour former du fer phosphaté, très peu soluble (Lente, Magalhaes, & Fabian, 2000). La précipitation du Fe III, entraîne la formation de colloïdes à l'origine de la baisse de fluorescence mesurée. De plus, le HTP est dégradé par le (HO°) formé dans le milieu. Ainsi, pour prendre en compte cette baisse de la fluorescence du HTP mesuré, une relation de calibration a été établie pour convertir la mesure de la fluorescence en concentration :

$$[\text{HTP}]_t = [\text{HTP}]_{ref} * \frac{\text{Fluo}, t}{\text{Fluo}, ref} * R, t$$

- $[\text{HTP}]_t$: concentration du HTP formé au cours du temps
- $[\text{HTP}]_{ref}$: la concentration de référence du HTP
- Fluo, t : fluorescence mesurée au cours du temps dans les essais TP
- Fluo, ref : fluorescence du HTP à la concentration de référence sans fer
- R, t est un facteur de correction tenant compte de l'atténuation de la fluorescence due à la précipitation du fer.

Des essais préliminaires ont permis d'établir la formule suivante et d'ajuster les valeurs des paramètres a, b et c en fonction de la concentration totale en fer (annexe 4) :

$$R, t = a * (\text{temps})^b + c,$$

IV.1.3 Résultats et discussion

La Figure 29 indique les numéros attribués dans cet article aux réactions de la chimie de Fenton. L'ensemble des résultats des cinétiques de production des radicaux superoxydes et hydroxyles est présenté dans les (Figure 30, Figure 31, Figure 32). Les dérivés de ces courbes calculées numériquement, indiquent la vitesse de production des différents composés. Seules les variations du HTP sont présentées sur la Figure 33, les cinétiques de formation du formazan étant trop bruitées.

Les allures des cinétiques de formation du formazan et du HTP en fonction de la température, de la concentration initiale en fer et en H_2O_2 présentent des similitudes : une augmentation rapide suivie d'une plus faible évolution de la concentration en formazan et en HTP au cours du temps. Ces allures probablement liées à l'évolution des complexes de fer dans le milieu. En effet, à t_0 , le $FeSO_4$ rajouté dans le milieu. Il se forme alors plusieurs complexes du fer dont la solubilité et la réactivité sont différentes. D'après la littérature, à pH 6, il se forme du fer hydroxylé ($Fe(OH)^+$, $Fe(OH)_2$) dont la réactivité est entre 10^3 et 10^5 supérieure à celle du Fe^{2+} (Millero *et al.*, 1989). D'autre part, il se forme aussi du fer phosphaté dont la proportion serait élevée en raison de la forte concentration en phosphate (40mM) dans le milieu mimétique de la viande comparée aux milieux étudiés dans la littérature. L'augmentation rapide des concentrations en formazan et en HTP durant les premières minutes de la réaction s'expliquerait par l'oxydation des formes les plus réactives du Fe II essentiellement avec l' O_2 dans le cas de la production des radicaux superoxydes (R10) et l' H_2O_2 dans le cas de la production des radicaux hydroxyles (R1). Les évolutions lentes des concentrations en formazan et en HTP constatées par la suite seraient essentiellement dues à l'oxydation des formes les moins réactives en Fe II par l' O_2 (R10) et l' H_2O_2 (R1) mais aussi à la réduction d'une faible proportion du Fe III via la R6 (cas de la production des radicaux superoxydes) et la R2 (cas de la production des radicaux hydroxyles) entraînant ainsi le recyclage du Fe II du cycle Fenton. En effet, à pH 6, les surfaces des particules de fer III insolubles réagissent avec certaines espèces chimiques telles que H_2O_2 (Kwan & Voelker, 2003).

IV.1.3.1 Effet de la température sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles (Figure 30)

La concentration en formazan à 30 minutes est 53% plus élevée à 60°C qu'à 30°C. Ceci s'explique en premier lieu par le fait que les réactions limitantes R1, R2 et R10 ont une énergie

d'activation d'environ 50 kJ/mol. Ceci pourrait s'expliquer aussi par l'incidence de la température sur la complexation et la solubilité du Fer II. A des températures élevées, la proportion des complexes les plus réactives augmente ce qui entraîne une oxydation plus importante du Fe II par l'oxygène via la R10. Cette hypothèse pourra être discuté en modélisant les complexes de fer dans le milieu et en identifiant les réactions qui contribuent le plus à la production et à la consommation du couple ($\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^\circ$). La production du HTP à 30 minutes est 18,5% plus élevée qu'à 60°C. Il n'a pas été possible de faire les mesures à 75°C à cause de la dégradation de la sonde TP (Figure 30, b). La (Figure 33, a) montre une augmentation de la vitesse calculée de production du HTP avec la température dès les premières secondes de la réaction. La vitesse de production du HTP à 30 minutes à 60°C est 40% plus élevée qu'à 25°C. Ceci s'explique également par les énergies d'activations des réactions limitantes R1 et R2 dont les valeurs sont égales à 65 kJ/mol. L'importance de la voie de réduction du Fe III en Fe II (R2), à l'origine du maintien du cycle Fenton, est d'autant plus élevée à forte température et en présence d' H_2O_2 .

Par ailleurs, Pour expliquer l'évolution plus importante de la concentration en HTP comparée à celle du formazan entre 5 et 30 minutes, il faut analyser la vitesse de formation du HTP. La figure 5a montre que la vitesse de formation du HTP en fonction de la température entre 5 et 30 minutes décroît mais est non nulle. En effet, le HTP est produit directement par la R1 et indirectement via la R2 par le recyclage du Fe II et la formation d'avantage d' HO° . La vitesse la réaction de réduction du Fe III par le H_2O_2 (R2) dépend aussi de la température. Dans le cas du Foramzan, la réduction du Fe III en Fe II se fait via la R6 dont la vitesse est indépendante de température.

IV.1.3.2 Effet de la concentration initiale en FeSO_4 sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles

La (Figure 31,a) montre qu'entre 200 et 400 μM de Fe II, la concentration en formazan à 30 minutes augmente de 42%. Une relation de proportionnalité a été identifiée sur l'ensemble des essais entre la concentration en formazan à 30 minutes et la concentration initiale en Fe^{2+} . La production d' (O_2°) piégés par la sonde provient de la réaction 10. Dans nos conditions, pour des concentrations en Fe II supérieures à 200 μM , la concentration initiale en oxygène paraît donc limitante (150 μM). Pourtant, la concentration en formazan continue à augmenter. Ceci peut s'expliquer par une éventuelle alimentation continue du milieu réactionnel en O_2

atmosphérique. Plus vraisemblablement, cela provient de certaines réactions de Fenton (6, 18 et 20) qui régénèrent l' O_2 .

La (Figure 31, b) montre l'effet de la concentration initiale en $FeSO_4$ sur la production des radicaux hydroxyles. Toutes les courbes indiquent la même tendance, c'est-à-dire une phase de production rapide suivie d'une phase lente. La concentration en HTP mesurée augmente logiquement avec la concentration initiale en $FeSO_4$. A 30 minutes, elle augmente de 52,2% entre 50 μM et 400 μM . Cette augmentation a lieu bien que, dans ces conditions, le rapport H_2O_2 /Fer II initial est en faveur du fer. Ceci pourrait s'expliquer en partie par le fait que seule une proportion du fer est réactif et reste dans tous les cas inférieure à la concentration en H_2O_2 du milieu. L'autre explication, plus classique, est une régénération du H_2O_2 via les R5 et R19, ce qui permet à la R1 d'oxydation du Fe II par le peroxyde d'hydrogène (R1) de produire du HO° . La modélisation (chapitre IV.2) permettra d'identifier les degrés de contribution des réactions de Fenton dans la production d'HTP.

La (Figure 33, b) montre que pour des concentrations initiales en fer comprises entre 50 et 400 μM , la vitesse de formation du HTP diminue jusqu'à atteindre une valeur de 0,01 $\mu M.s^{-1}$ à 30 minutes. Ceci n'est pas vrai pour une concentration initiale en fer égale à 600 μM . On pourrait parler d'un seuil au-dessus duquel la proportion en fer réactif augmente sensiblement, seuil qui pourrait s'expliquer par l'évolution de la réactivité du fer précipité.

IV.1.3.3 Effet de la concentration initiale en peroxyde d'hydrogène sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles

La Figure 32(a) montre que l'ajout du H_2O_2 dans le milieu entraîne une forte diminution de la concentration en formazan. A 30 minutes, cette baisse est de 81,5% pour une concentration en H_2O_2 égale à 200 μM .

La Figure 32 (b) montre logiquement un phénomène inverse caractérisé par une très faible concentration en HTP mesuré en absence d' H_2O_2 et une augmentation de cette concentration en HTP à mesure que la concentration initiale en H_2O_2 augmente. En effet, cette augmentation est, à 30 minutes, de 99,9 % entre 0 et 200 μM d' H_2O_2 et est de 81,5% entre 200 et 1000 μM d' H_2O_2 . En revanche, pour une concentration d' H_2O_2 égale à 2000 μM , la concentration en HTP mesuré change très peu (5,7%) par rapport à 1000 μM . Deux phases caractérisent l'évolution de la production des radicaux hydroxyles au cours du temps. Une première phase rapide et courte et une deuxième phase relativement plus lente.

Afin d'interpréter ces résultats, il faut considérer l'interaction entre la production des radicaux superoxydes ($O_2^{\circ-}$) et hydroxyles (HO°). En effet, en absence d' H_2O_2 , l'oxydation du Fe II se

fait essentiellement par l'O₂ (R10), ce qui explique la concentration élevée en formazan et la faible concentration en HTP mesurée dans cette condition. L'ajout d'H₂O₂ fait que les R10 et la R1 entrent en compétition. Dans ces conditions, le Fe II s'oxyde essentiellement par le H₂O₂. Ainsi, en présence d'H₂O₂, la production d' (O₂^{°-}) est très faible comparée à celle du (HO[°]) via la R1. Ceci s'explique aussi par le fait que la concentration en O₂ dissous mesurée (150 µM à 60°C) est nettement inférieure à la concentration d'H₂O₂ ajoutée lors des essais à 1000 et 2000 µM. Cette grande différence entre les réactants H₂O₂ et O₂ favorise la R1. Pour expliquer la production de seulement 38 µM d'HTP en 30 minutes dans un milieu contenant 200 µM de Fe II et autant d'H₂O₂, il faut se référer au schéma réactionnel du téréphtalate (Figure 18). Le TP réagit avec 2 molécules d' (HO[°]) pour former de l'HTP. Ce dernier est oxydé par le (HO[°]). La réaction d'hydroxylation dans des solutions contenant de l'oxygène a un rendement de 35% seulement (Fang, Mark, & Sonntag, 1996).

Si une molécule de TP réagit bien avec une molécule d' (HO[°]), divers composés autres que l'HTP se forment. Fang *et al.* (1996) ont montré en analysant les composés intermédiaires et finaux de cet ensemble de réactions dans des solutions aqueuses oxygénées que seulement 35% du TP se transforme en HTP.

Si le Fe III était non réactif du fait qu'il serait précipité en totalité à pH 6, alors la réaction R1 produirait autour d'(HO[°]) qu'il y a de Fe II initialement et la réaction R2 serait totalement inhibée. Dans ce cas, augmenter la concentration initiale en H₂O₂ au-delà de la concentration initiale en Fe II ne se traduirait pas par une augmentation de la quantité d' (HO[°]) produit et donc de la concentration en HTP mesurée. L'augmentation observée de 200 à 1000 µM d'H₂O₂ montre indirectement qu'une proportion non négligeable du Fe III résultant de l'oxydation du Fe II est bien réactif.

IV.1.3.4 Effet des antioxydants sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles

Tous les résultats concernant les antioxydants sont rassemblés dans le Tableau 20.

- *Enzymes (SOD et Catalase)*

Pour toutes les températures, la SOD a un rôle **inhibiteur** sur la production des radicaux superoxydes (Tableau 20). Ceci est logique car la SOD est une enzyme qui catalyse la R18 de dismutation des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène. L'augmentation de la production d'H₂O₂ impliqué dans l'oxydation du Fe II (R1) conduit aussi à la formation d'avantage de radicaux hydroxyles. Ainsi, la SOD joue un rôle **promoteur** dans la production

de (HO°). Nos résultats sont en adéquation avec ce qui est décrit dans la littérature (McCord et Fridovich, 1969; Jenney et coll, 1999; Lombard et coll, 2000).

La catalase a un effet **inhibiteur** sur la production des radicaux hydroxyles puisqu'elle catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en molécules d'eau (R21) pour prévenir la formation des (HO°) dans les cellules. Ceci est vrai à fortes et basses températures. En revanche, la production de radicaux superoxydes est favorisée car la dissociation de peroxyde d'hydrogène génère de l' O_2 responsable via la R10 de l'oxydation du Fe^{2+} et de la formation de l' $\text{O}_2^{\circ-}$. Cet effet promoteur de la catalase sur la production du radical superoxyde est d'autant plus important que la concentration saturante en oxygène dissous diminue avec la température.

- *Peptides*

Le glutathion et la carnosine favorisent la formation des radicaux superoxydes et inhibent De manière équivalente, la formation des radicaux hydroxyles à toutes les températures.

Le glutathion et la carnosine sont décrits comme étant des peptides qui favorisent la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (Mozdan et al., 2005 ; Simpson et al., 1998). Le fer ferreux produit réagit avec l' O_2 pour former de l' $\text{O}_2^{\circ-}$ via la R10. L'effet promoteur du GSH et de la carnosine sur la formation des radicaux superoxydes augmente en fonction de la température en raison de la baisse de la solubilité de l' O_2 avec la température.

- *Vitamines (Vitamine E = Trolox C ; Vitamine C =ascorbate)*

Concernant la production du radical superoxyde, le trolox C, a un rôle promoteur à basses températures et neutre à fortes températures. En ce qui concerne la production du radical hydroxyle, quelle que soit la température, le trolox C, joue un rôle promoteur. Ces résultats, surprenant au premier abord pour un composé réputé antioxydant, vont dans le même sens que ceux d'autres études *in vitro* qui ont montré que l' α -tocophérol pouvait avoir un rôle pro-oxydant en intervenant dans la réduction des ions métalliques (cuivre et fer). Dans l'ensemble, l'ascorbate favorise la production des $\text{O}_2^{\circ-}$ sauf à 10°C , et inhibe la production des (HO°) sauf à 10 et 60°C . Il est vrai que la vitamine C est décrite comme étant un excellent antioxydant puisqu'elle piège directement les radicaux hydroxyles et les radicaux superoxydes. Cependant, elle est aussi largement utilisée comme pro-oxydant (Buettner & Jurkiewicz, 1996). Ce comportement paradoxal est lié à son fort pouvoir de réduction des métaux de transition.

IV.1.4 Conclusion

Cette étude s'est intéressée à la production des radicaux libres oxygénés initiée par le fer non hémique dans la viande et aux effets des AO sur ce phénomène oxydatif. Les techniques de détection des radicaux libres avec des sondes chimiques ont permis de constituer une base de cinétiques expérimentales conséquente couvrant de nombreuses conditions. En particulier, les effets de la teneur en fer, qui varie dans la viande, et de la température susceptible de faire varier les constantes réactionnelles de certaines réactions de la chimie de Fenton, ont pu être quantifiés. De plus, en faisant varier largement la concentration initiale en H_2O_2 qui est en fait un produit intermédiaire de la chimie de Fenton, des hypothèses ont pu être formulées sur l'incidence de la complexation et de la précipitation du fer.

L'ajout d'AO a permis d'évaluer les effets promoteurs ou inhibiteurs de chacun des AO sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles. Vu la complexité du système réactionnel, un modèle mathématique stoechio-cinétique de la chimie de Fenton a été développé afin de rendre compte des interactions entre les différentes réactions. Le but étant d'explorer par des calculs de simulation l'incidence de chacune des réactions de Fenton et de celles des AO à différentes concentrations sur la production des radicaux libres (O_2° et OH°). Ces données expérimentales serviront de références pour ajuster les paramètres cinétiques (Constante de vitesse, énergie d'activation, coefficient de réactivité de fer...) de certaines réactions de Fenton ainsi que des réactions impliquant les AO.

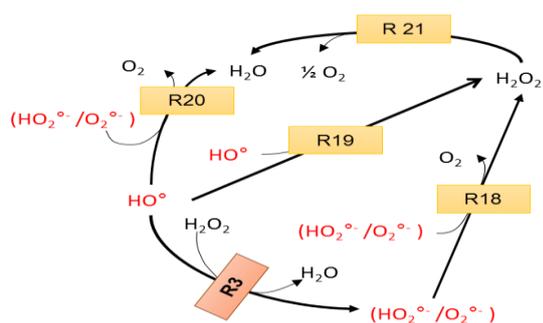
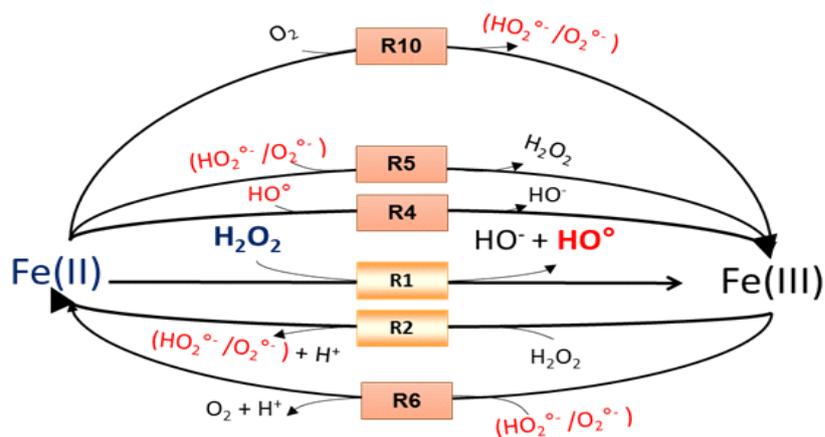
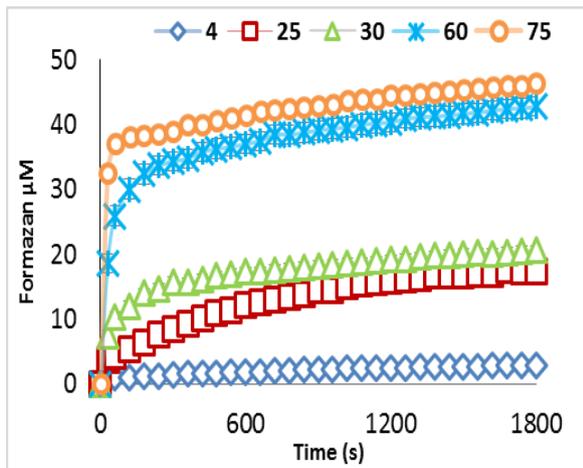


Figure 29 : Chimie de Fenton

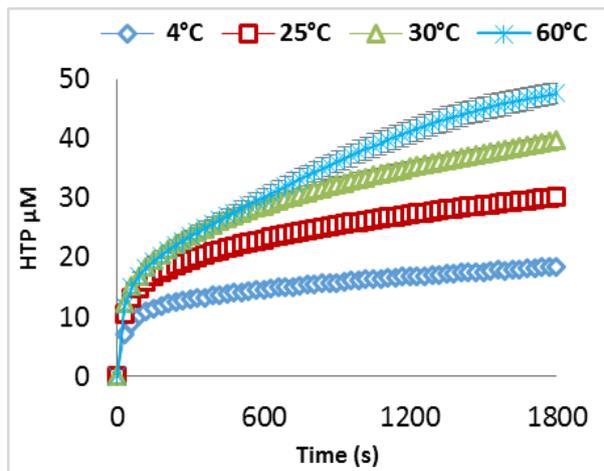
Tableau 19 : Plan expérimental des cinétiques de formation des radicaux superoxydes et hydroxyles dans un milieu mimétique basique de la viande

Composés et paramètres	TP (μM)	NBT (μM)	FeSO ₄ (μM)	H ₂ O ₂ (μM)	Temperature (°C)
radical superoxyde*	0	500*	200*	0	(4→75)
			(50→600)		60
radical hydroxyle**	1000**	0	200**	200**	(4→60)
			(50→600)		60
			200		(200→2000)

Les effets des AO sont étudiés dans ces conditions standards : formazan* (200 μM de Fe²⁺) ; HTP** (200 μM de Fe²⁺, 200 μM H₂O₂) à basse température 4 et 10°C et hautes température 45°C et 60°C

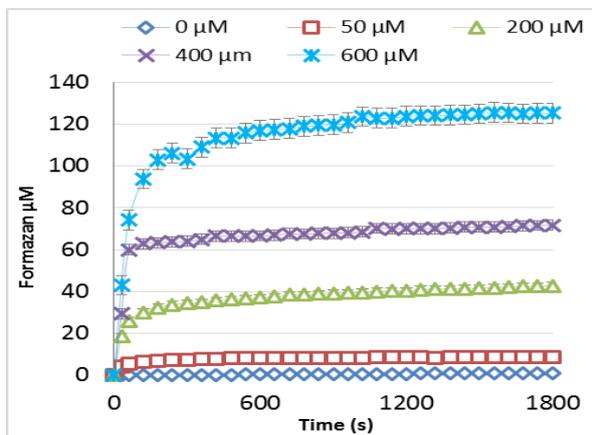


(a)

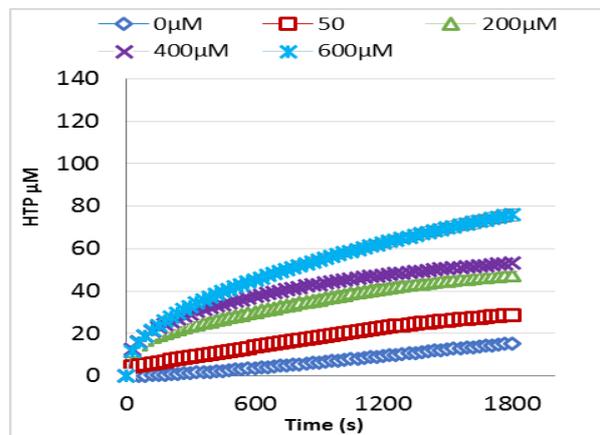


(b)

Figure 30: Mesure de l'effet de la température sur la production des radicaux libres ; (a) formazan ($\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$, pas H_2O_2) et (b) HTP ($\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$, $\text{H}_2\text{O}_2 = 200 \mu\text{M}$)

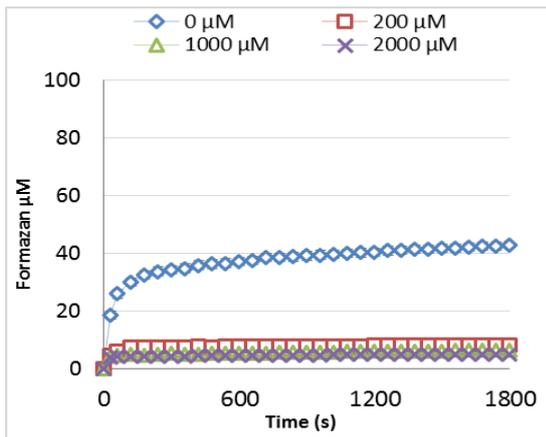


(a)

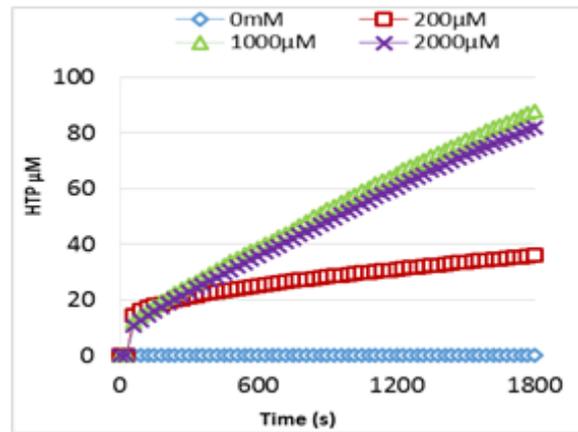


(b)

Figure 31 : Mesure de l'effet de la concentration initiale en FeSO_4 sur la production des radicaux libres ; (a) formazan (température 60°C et pas H_2O_2) et (b) HTP (température 60°C et $\text{H}_2\text{O}_2 = 200 \mu\text{M}$)

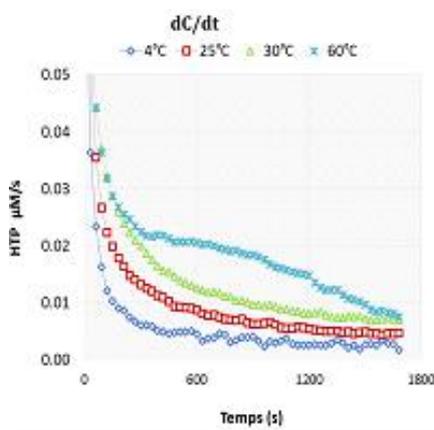


(a)

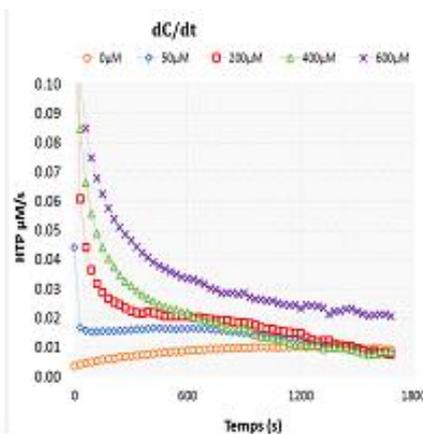


(b)

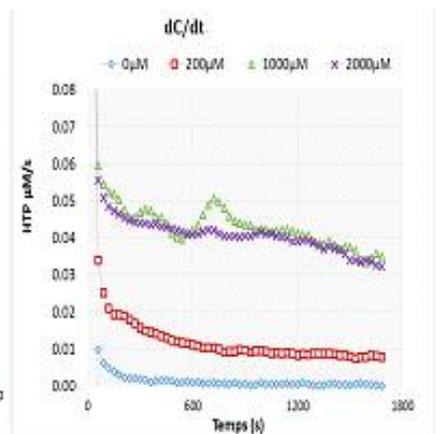
Figure 32 : Mesure de l'effet de la concentration initiale en H_2O_2 sur la production des radicaux libres ; (a) formazan (température = $60^\circ C$ et $FeSO_4$ $200 \mu M$) et (b) HTP (température = $60^\circ C$ et $FeSO_4 = 200 \mu M$)



(a)



(b)



(c)

Figure 33 : Mesure de la vitesse de formation du HTP calculée à partir des cinétiques des figures 31, 32 et 33 en fonction de la température (a), de la concentration initiale en fer (b) et de la concentration initiale en H_2O_2 (c)

Tableau 20: Mesure de l'effet promoteur ou inhibiteur des AO, exprimé en % à 30 minutes pour les essais à hautes températures (45 et 60°C) et à 20 heures pour les essais à basses températures (4 et 10°C) (n=4)

	formazan								HTP							
	Moyenne				SEM				Moyenne				SEM			
Antioxydants	4°C	10°C	45°C	60°C	4°C	10°C	45°C	60°C	4°C	10°C	45°C	60°C	4°C	10°C	45°C	60°C
Cu-Zn SOD	-59	-61	-12	-14	17	14	0	2	-18	-29	17	15	1	2	0	2
Catalase	1684	779	45	19	591	83	2	15	-81	-79	-74	-50	1	1	2	6
Carnosine	138	243	28	6	4	45	5	3	-95	-96	-96	-97	0	0	1	0
Glutathion	94	424	249	85	16	184	22	31	-73	-73	-61	-63	1	1	1	1
Trolox C	24	47	8	1	8	11	8	2	19	70	34	175	3	11	22	38
Ascorbate	50	-38	12	19	60	14	2	5	8	-14	12	-18	1	7	6	3

Références bibliographiques

- A.H. Barati, M. M.-D., H.Mozdarani, S.Z. Bathaei, Z.M.Hassan. (2006). Free hydroxyl radical dosimetry by using 1 MHz low level ultrasound waves. *IJRR*, 3(4), 163-169.
- Altman, F. P. (1976). Tetrazolium Salts and formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9(3), III-51.
- Armstrong, J. S., & Whiteman, M. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria. *Methods Cell Biol*, 80, 355-377.
- Auclair, C., & Voisin, E. (1985). *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*: In: Greenwald, R. A. (Eds.) Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc., .
- Buettner, G. R., & Schafer, F. Q. (2012). Ascorbate (Vitamin C), its Antioxidant Chemistry. In).
- Fang, X., Mark, G., & Sonntag (von), C. (1996). OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions Part I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 57-63.
- Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65(0), 899-910.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*, 272(30), 18515-18517.
- Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., Portanguen, S., & Kondjoyan, A. (2009). Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. *Meat Science*, 83(4), 651-656.
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2-3), 45-80.
- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., & De Smet, S. (2006). Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Science*, 74(3), 476-486.
- Haddou, M. (2010). *Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo Fenton et photocatalyse*. Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité chimique et Photochimique(IMRCP), UMR 5623.

- Kwan, W. P., & Voelker, B. M. (2003). Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems. *Environmental Science & Technology*, 37(6), 1150-1158.
- Lente, G., Magalhaes, M. E., & Fabian, I. (2000). Kinetics and mechanism of complex formation reactions in the Iron(III)-phosphate ion system at large iron(III) excess. Formation of a tetranuclear complex. *Inorg Chem*, 39(9), 1950-1954.
- Lombardi-Boccia, G., Martinez-Dominguez, B., & Aguzzi, A. (2002). Total Heme and Non-heme Iron in Raw and Cooked Meats. *Journal of Food Science*, 67(5), 1738-1741.
- Millero, F. (2001). Speciation of metals in natural waters. *Geochemical Transactions*, 2(8), 56.
- Qu, X., Kirschenbaum, L. J., & Borish, E. T. (2000). Hydroxyterephthalate as a fluorescent probe for hydroxyl radicals: application to hair melanin. *Photochem Photobiol*, 71(3), 307-313.
- Tarpey, M. M., Wink, D. A., & Grisham, M. B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286(3), R431-444.

IV.2 Analyse de l'effet des réactants, de l'état du fer, et de l'ajout d'antioxydants sur la formation des radicaux libres par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de viande : simulation du système réactionnel au moyen d'un modèle stoechio-cinétique

Les mesures présentées dans le projet d'article 1 ont servi de support pour faire évoluer le modèle stœchiocinétique développé pendant la thèse d'Aurélié Promeprat (2013) avec notamment des ajustements de certaines valeurs des constantes réactionnelles k et des énergies d'activation (E_a) de la chimie de Fenton, des réactions relatives aux sondes et aux antioxydants. Un facteur de proportionnalité entre la concentration totale en fer et celle réagissant réellement dans la chimie de Fenton a été introduit pour prendre en compte la réactivité des différents complexes et précipités du fer. Ce travail est donc focalisé sur l'étape critique de la production des radicaux libres pour réviser ces ajustements. La comparaison entre les résultats mesurés dans le milieu mimétique et les résultats calculés par le modèle stoechio-cinétique ont permis également d'ajouter des éléments permettant de tenir compte de la variation du pH (chapitre IV.3). L'objectif est d'obtenir avec un jeu unique de paramètres des prédictions en accord avec mes mesures de production de formazan et d'HTP.

Analyse de l'effet des réactants, de l'état du fer, et de l'ajout d'antioxydants sur la formation des radicaux libres par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de viande : simulation du système réactionnel au moyen d'un modèle stoechio-cinétique

Khaled Oueslati, Philippe Gatellier, Jean Dominique Daudin and Alain Kondjoyan *

INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France

*Corresponding author: Alain Kondjoyan, tel. +33 473 62 44 92; fax: + 33 473 62 40 89;

Email address: Alain.kondjoyan@inra.fr

Abstract

During meat processes the formation of free radicals in which iron in reaction with oxygen and peroxides plays a key role, leads to the accumulation of oxidative damages on proteins and lipids. Kinetics of the Fenton reactions, which involved a Fe(II)/Fe(III) redox oxidative cycle have been studied in a liquid medium which mimics meat physicochemical conditions. Then endogenous and exogenous antioxidants were added one by one in the medium to determine their respective effects on the formation of the superoxyde $O_2^\circ-$ and hydroxyl HO° radicals. A stoichio-kinetic mathematical model was used to predict the formation of these radicals and a first set of calculations was carried out based on parameters values founded in literature. The difference between the experimental and the predicted results was mainly due to the reactivity of iron that was assessed to be 5% of the concentrations of the Fe II and the Fe III existing in the medium. Constant rates and energy of activation values, which were uncertain in literature, were determined by minimizing the SCE between the experimental and the predicted concentrations of the superoxyde and hydroxyl radicals. The agreement between the experimental and calculated value was better after 30 minutes of experiments than for shorter times. In the future variation of iron reactivity with time can be introduce in the model, and

more sophisticated minimizing procedures can be used to determine uncertain parameter values to improve even more model predictions.

Keywords: Kinetics; modeling; meat; free radicals; iron oxidation; iron reactivity; antioxidants

IV.2.1 Introduction

L'oxydation du fer (chimie de Fenton) au cours de la conservation et de la transformation des viandes est à l'origine de la formation de radicaux libres responsables de l'oxydation des lipides et des protéines. Celle-ci est modulée par la présence d'antioxydants dans le produit (AO). La compréhension des mécanismes de formation des radicaux libres, ainsi que le mode d'action des AO, sont nécessaires pour adapter les conditions de transformation et de conservation, et limiter la dénaturation du produit.

Etudier l'évolution des réactions chimiques directement dans la viande est très compliqué car il est difficile de contrôler précisément les conditions physico-chimiques et la composition du milieu. Des expérimentations ont donc été faites (chapitre IV.1) dans un milieu mimétique représentant la viande en faisant varier la température (mimer la conservation et la cuisson), la concentration en fer (mimer les différents types de viandes blanches et rouges), et la concentration en H_2O_2 (espèce chimique présente dans la viande et très impliquée dans l'oxydation du fer). La quantification des radicaux superoxydes et hydroxyles formés dans le milieu a été effectuée en utilisant des sondes spécifiques : le NitroBlueTetrazlium (NBT) et le téréphtalate (TP). Une deuxième série d'expériences a été faite en ajoutant individuellement dans le milieu mimétique des antioxydants naturellement présents dans les viandes : SuperOxydeDismutase (SOD), Catalase, Carnosine, Glutathion, Vitamine C et Vitamine E.

Maîtriser les réactions d'oxydation au cours des procédés demande de pouvoir quantifier l'effet de différents scénarios de conservation et de transformation sur la formation des radicaux libres dans les viandes. Un modèle stoechio-cinétique a été développé pour répondre à cet objectif. Ce modèle est basé sur l'ensemble des réactions élémentaires qui constituent la chimie de Fenton. Mathématiquement, le modèle est constitué d'un ensemble d'équations aux dérivées ordinaires, et ses capacités de prédiction reposent sur la valeur des constantes de vitesse qui sont introduites. La cinétique de formation des radicaux libres par la chimie de Fenton dépend aussi de la réactivité du fer qui varie en fonction des ions présents à un moment donné dans le milieu et du pH.

L'objectif de cet article est d'abord d'évaluer les paramètres liés à la réactivité du fer et les valeurs des constantes de vitesse des réactions élémentaires de Fenton afin de pouvoir ensuite prédire la formation des radicaux superoxydes et hydroxydes pour différentes concentrations en réactants (Fer, H₂O₂, antioxydants...), ou températures du milieu.

IV.2.2 Systèmes réactionnels mis en jeux

IV.2.2.1 Système Fenton

A l'issu d'une recherche bibliographique sur la chimie de Fenton, un schéma réactionnel composé de 21 réactions élémentaires a été proposé dans le chapitre III (Tableau 21). Les réactions R1, R2 et R10 sont des réactions limitantes car les valeurs de leurs constantes de vitesses sont petites comparées à celles des autres réactions et leur rôle est prépondérant dans la consommation des deux principaux réactants : O₂ et H₂O₂. Les valeurs des constantes de vitesse k_1 et k_2 sont différentes selon les articles et selon les conditions expérimentales et comprises entre 40 et 600 M⁻¹.s⁻¹ pour k_1 , et 0,002 à 0,3 M⁻¹.s⁻¹ pour k_2 . La valeur de k_{10} est égale à 5,4. 10⁶ M⁻¹.s⁻¹. Les valeurs des constantes de vitesse des autres réactions, impliquant une oxydation ou une réduction du fer (de R3 à R6), sont connues et très élevées exceptées pour la réaction 5 qui est incertaine et comprise entre 10⁵ à 10⁸ M⁻¹.s⁻¹. Toutes les réactions inter-radicalaires sont connues pour avoir (de R18 à R20) des constantes de vitesse élevées comprises entre 10⁶ et 10⁹ M⁻¹.s⁻¹. En absence d'ions métalliques, le peroxyde d'hydrogène est très stable à basse température ; k_{21} est donc très basse.

Dans son ouvrage de synthèse van Boekel (2008) indique que les valeurs des énergies d'activation des réactions radicalaires sont mal connues, mais vraisemblablement inférieures à 10 kJ, et donc à celles des réactions élémentaires d'ordre 1 et 2. Deguillaume *et al.* (2005) indiquent des valeurs d'Ea comprises majoritairement entre 20 kJ et 45 kJ pour des réactions d'oxydoréduction qui mettent en jeu des ions Fe²⁺ et Fe³⁺ dans l'eau et les nuages. La littérature indique aussi que la vitesse des réactions 1, 2 et 10 dépend de la température, mais que les valeurs des Ea sont mal connues, ce qui constitue donc aussi une source d'incertitude (Rivas *et al.*, 2004 ; Millero *et al.*, 1986).

IV.2.2.2 Systèmes des sondes

Les systèmes correspondant aux sondes introduites dans le milieu liquide pour mesurer la formation des radicaux libres sont représentés par les réactions 30 à 38 dans le Tableau 21. Le NBT est formé de deux tetrazolium qui sont réduits en monoformazan (MF). Chaque tetrazolium a besoin de deux électrons pour produire du MF. Quatre électrons sont donc nécessaires pour réduire complètement le NBT en diformazan (DF) : la réduction du NBT en MF débute par la formation du radical tétrazolynile. Cette réaction est de second ordre. Ensuite, deux réactions qui opèrent en parallèle sont possibles : la dismutation ou la réduction du radical NBT^\bullet par un deuxième anion ($\text{O}_2^{\circ-}$). Dans les deux cas, il y a formation de (MF). La constante de vitesse des réactions de réduction du radical tétrazolynile (NBT^\bullet) est très élevée en comparaison de la vitesse de la première étape (réduction du NBT). Cette dernière est donc limitante et fixe. La constante de vitesse de la R30 ; elle est égale à $5,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Altman, 1976 ; B.H.J. Bielski & Richter, 1977, Tableau 21). Lorsque le ratio ($\text{O}_2^{\circ-}$)/NBT est inférieur à 2, il se forme essentiellement du MF. Lorsque le ratio ($\text{O}_2^{\circ-}$)/NBT est supérieur à 4, la réaction est contrôlée par le NBT et il se forme essentiellement du diformazan DF. Lorsque le ratio ($\text{O}_2^{\circ-}$)/NBT est compris entre 2 et 4, différents ratios de MF et DF se forment (Liu *et al.*, 2009). Dans le modèle, la somme des MF et DF calculée est désignée par la suite par le terme global de « formazan ».

Les réactions élémentaires 31-38 constituent le schéma réactionnel propre à la formation du HTP (Fang, Mark, & Sonntag (von), 1996). Le HTP formé est oxydé par le HO^\bullet formant un autre composé (réaction 38) noté « composé 3 » dans le schéma réactionnel du Tableau 21 (Page, Arnold, & McNeill, 2010).

IV.2.2.3 Système des antioxydants (AO)

Les antioxydants peuvent avoir un rôle promoteur ou inhibiteur de la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles. La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui accélère la dismutation du couple ($\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^{\circ-}$) en peroxyde d'hydrogène (Tableau 21, R18 avec SOD). La catalase (Cat) est une enzyme dont le rôle est complémentaire à celui de la SOD, puisqu'elle catalyse la dissociation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Tableau 21, R21 avec catalase).

Le glutathion (GSH) peut chélater les ions ferreux et ainsi limiter leur participation à la formation de radicaux libres par des réactions de type Fenton. De plus, GSH est capable de réagir avec les radicaux hydroxyles (réaction 50, Tableau 21) (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Le radical thiyle (GS°) produit peut intervenir, s'il n'est pas neutralisé par auto-association (GSSG), dans les processus d'oxydation, par des réactions avec l'oxygène qui conduisent à la formation d'un peroxyde, ou de l'anion superoxyde (Thérond & Bonnefont-Rousselot, 2005).

La carnosine présente des propriétés antioxydantes en fixant le fer, ou en piégeant les radicaux libres centrés sur l'oxygène. La constante de vitesse de la réaction de fixation du fer est méconnue contrairement à celle de la réaction entre le carnosine et le couple HO_2°/O_2° (Tableau 21).

Le trolox C (Vitamine E= α -Toch) peut réagir directement avec le radical hydroxyle ($\bullet OH$). La réaction de la vitamine E avec l'anion superoxyde O_2° est très lente et par conséquent peu probable. Les constantes de vitesses de ces réactions sont connues (Tableau 21). Le trolox C peut aussi réguler à la hausse la production des enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la glutathion peroxydase, la catalase... Ces réactions demeurent peu documentées et leurs constantes de vitesses inconnues.

La vitamine C est un diacide qui existe sous quatre formes différentes : acide ascorbique (AH_2), ascorbate (AH^-), dianion ascorbate (A^{2-}) et le déhydroascorbate (A). Pour les pH des viandes, compris entre 5 et 7, l'ascorbate (AH^-) est la forme majoritaire. Son activité antioxydante consiste à piéger les radicaux hydroxyles et les radicaux superoxydes. En réagissant avec les espèces réactives oxygénées (ERO), la vitamine C est oxydée en un radical ascorbyle (A° ou AH° selon le pH du milieu) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. Les radicaux ascorbyles sont des formes instables qui se transforment en déhydroascorbate ou sont régénérés en ascorbate. Le recyclage de l'ascorbate peut se faire à partir de son produit d'oxydation. La vitamine C est décrite comme étant un excellent antioxydant. Cependant, elle est aussi largement utilisée comme pro-oxydant (Buettner & Jurkiewicz, 1996). Ce comportement paradoxal est lié à son fort pouvoir de réduction des métaux de transition. Ainsi, la vitamine C réduit le fer ; le cycle redox de ces métaux étant fortement impliqué dans les processus d'oxydations (R 55-60, Tableau 21).

IV.2.3 Effet du pH sur l'état des réactants

Le pH influence la vitesse des réactions de Fenton. Lorsque le couple acido-basique (HO_2°/O_2°) de pKa 4,8 est réactant, la proportion entre l'acide et sa base conjuguée varie en fonction du pH, ce qui impacte la vitesse des réactions (R5, R6, R18 et R20). Lorsque la valeur du pH est égale à 6, le pourcentage de radical superoxyde est de 94%. Une fonction pH propre à chaque

réaction permet de prendre en compte la proportion des composés du couple $\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^\circ$ (chapitre III).

Le pH du milieu influence aussi la complexation et la solubilité du fer et impacte ainsi sa solubilité, et donc potentiellement sa réactivité. La chimie des complexes du fer est extrêmement compliquée (Spiro *et al.*, 1967a; Spiro *et al.*, 1967b). L'affinité d'un ligand pour le fer peut varier énormément en fonction du pH, qui va déterminer l'état de protonation du ligand et donc la possibilité de complexation de l'atome de fer par cette molécule. Ainsi, un changement de pH peut fortement modifier la stabilité d'un complexe, voire provoquer un changement de ligand (Von Wirén *et al.*, 1999). La connaissance de l'état de chélation du fer, également appelée « spéciation du fer », est donc un élément très important à prendre en compte pour pouvoir prédire la formation des radicaux hydroxyles et superoxydes par la chimie de Fenton. En effet, à pH 6, dans une solution diluée de chlorure de sodium, le Fe^{2+} est prépondérant mais les formes hydroxylées pourtant moins abondantes jouent un rôle important. En effet, le $\text{Fe}(\text{OH})_2$, par exemple, est 10^3 à 10^5 plus réactif que le Fe^{2+} (Morgan *et al.*, 2007). La chimie du Fe III en solution aqueuse est comme celle du Fe II très dépendante du pH. A pH acide, Fe^{3+} représente l'espèce prédominante mais lorsque le pH augmente, il précipite (Knight & Sylva, 1975; Milburn & Vosburgh, 1955; Turner, Whitfield, & Dickson, 1981). A la température de 25 °C et dans une solution aqueuse de force ionique $0,03 \text{ mol.L}^{-1}$, des colloïdes commencent à se former dès pH 3. La précipitation du Fer III commence par la formation des dimères ($[\text{Fe}_2(\text{OH})_2]^{4+}$) qui se polymérisent ensuite et produisent des particules insolubles. La température et la concentration totale en Fe(III) sont évidemment aussi des facteurs qui influencent la précipitation. (Millero *et al.*, 2001).

La forte concentration en phosphate présent dans notre milieu modèle, complique d'avantage l'identification des complexes du fer présents. Le phosphate est décrit comme étant un bon chélateur qui favorise l'auto-oxydation du Fe(II) (Welch, Davis, & Aust, 2002). Pour un pH compris entre 6 et 8, H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} sont les espèces chimiques majoritaires impliquées dans la complexation du fer (Millero *et al.*, 2001).

Dans la viande, la situation est encore plus complexe que dans le milieu modèle et la réactivité des différents complexes du Fe II et du Fe III est variable et mal connue. Une analyse particulière a donc été effectuée sur l'état et la réactivité des Fe II et Fe III qui est introduite dans le modèle, au travers de la valeur de deux coefficients P2 et P3 dont la valeur est comprise entre 0 et 1.

IV.2.4 Modélisation des systèmes réactionnels

IV.2.4.1 Résolution du système d'équations aux dérivées ordinaires (EDO)

Le bilan de la formation et de la disparition de chacun des composés impliqués dans les réactions élémentaires est écrit sous forme d'une équation aux dérivés ordinaires (ODE). L'ensemble de ces équations constitue un système dont la résolution s'effectue en utilisant la routine "ODE15s" du solveur du logiciel Matlab®. Les paramètres du modèle sont les valeurs des constantes de vitesse des réactions, des énergies d'activation E_a , de certaines réactions, et les coefficients de réactivité du Fe II et Fe III. La concentration initiale de chaque composé constitue la matrice des entrées. Lors de l'implémentation du modèle, une boucle conditionnelle a été programmée qui permet d'examiner en sortie l'un des effets suivants :

- I. effet d'une variation de la température du milieu modèle, sur la cinétique de la concentration de chacun des composés du système réactionnel
- II. effet de la variation de la concentration initiale d'un des réactants
- III. effet de la variation de la valeur de la constante de vitesse d'une des réactions soit du fait de la variation de la constante à la température de référence soit de la variation de l'énergie d'activation.

Les résultats sont visualisés sous forme de graphiques présentant chacun les cinétiques de la concentration d'un composé cible et l'ensemble des résultats est sauvegardé dans un tableau contenant les valeurs des concentrations de tous les composés pour une centaine de valeurs de temps comprises entre t_0 et t_{fin} .

IV.2.4.2 Procédure d'estimation des paramètres incertains du modèle

Les valeurs des constantes de réactions k_1 , k_5 et k_{10} ainsi que celles des énergies d'activation E_{a1} , E_{a2} et E_{a10} fournies par la littérature sont incertaines et les valeurs P2 et P3 des réactivités du Fe II et du Fe III qui sont inconnues pour nos conditions expérimentales. Un ajustement local, paramètre par paramètre, a été fait en minimisant la somme des écarts entre les moyennes des concentrations mesurées (4 mesures, chapitre IV.1) et celles calculées à 5, 10, 20 et 30 minutes.

IV.2.4.3 Identification des complexes de fer et estimation des coefficients de réactivité P2 et P3

Le logiciel Minteq (Gustafsson, 2001) qui modélise la thermodynamique des équilibres chimiques en solution aqueuse jusqu'à une force ionique de 1 M a été utilisé. Il calcule les équilibres entre les molécules dissoutes, adsorbées, solides, et les phases gazeuses et prend en compte la précipitation éventuelle des composés. Le modèle de Debye-Hückel, modèle le plus utilisé et le plus courant, a été choisi. Il évalue l'écart à l'idéalité en solution, à travers le calcul des coefficients d'activité. Les calculs ont été faits pour des mélanges d'ions représentatifs du milieu mimétique : Fe^{2+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Na^+ , Cl^- .

Ce milieu mimétique à pH 6 était toujours constitué d'un tampon phosphate à 40 mM. Pour reproduire ces conditions, la concentration en ions PO_4^{3-} a été fixée à 40 mM puis le pH de la solution a été ajusté en ajoutant 44700 μM de Na^+ comme cela a été fait expérimentalement ; les ions sodium n'interagissent de toute façon pas avec le fer.

IV.2.5 Résultats et interprétations

Une première comparaison a été effectuée entre les résultats calculés et les résultats expérimentaux en introduisant dans le modèle les valeurs des constantes de vitesse issues de la littérature et en considérant que la totalité de la concentration en fer ajoutée dans le tube à essai était impliquée dans les réactions de Fenton, soit P2 et P3 égaux à 1 dans le modèle. Les résultats simulés étaient très différents des valeurs expérimentales. Les écarts moyens de la quantité d'HTP et de formazan formés dans les conditions standards (60°C, 200 μM de Fe^{2+} , 200 μM de H_2O_2 uniquement dans le cas du HTP) sur l'ensemble des résultats à 10 minutes représentaient respectivement 66,6% et 50% de la valeur expérimentale et 12,5%, et 40% à 30 minutes. L'écart entre les résultats calculés et les résultats expérimentaux était principalement dû au fait que la totalité du fer introduite dans le milieu était supposé réagir avec les autres composés impliqués dans la chimie de Fenton. Or, il est bien connu de par la littérature que cela n'est pas le cas. Une analyse détaillée de l'état du fer dans le milieu a donc été effectuée pour évaluer l'ordre de grandeur des coefficients P2 et P3 dans le but de représenter au mieux les résultats expérimentaux obtenus. Les valeurs de P2, P3 et les valeurs des constantes de vitesse incertaines (Tableau 21) d'un point de vue bibliographique (k_1 , k_5 , k_{10} et E_a 1, 2 et 10) ont alors été recherchées, d'abord en examinant un par un l'effet d'une variation de chacune de ces constantes autour de la valeur proposée dans la littérature sur les cinétiques de production du formazan et du HTP

puis, plus précisément, par optimisation locale, en isolant une partie des essais réalisés dans les conditions pour lesquels chaque paramètre ou groupe de paramètres avait un réel impact.

Un jeu unique de paramètres a ensuite été retenu et utilisé pour évaluer l'effet de la concentration en réactants et de la température sur la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles (concentrations en formazan et HTP) dans le milieu mimétique de la viande.

IV.2.5.1 Evaluation de la réactivité du fer dans le milieu mimétique

Le Tableau 22 issu du calcul avec Minteq montre que le Fe II qui est totalement soluble à pH 3 précipite à mesure que le pH augmente pour ne plus représenter qu'environ 5% de la concentration totale en Fe II pour un pH de 6. La Figure 34 indique les concentrations des différents complexes de Fe II présents en solution dans cette gamme de pH.

Les simulations effectuées à partir du modèle Debye-Hückel montrent que pour un pH 3, les formes $\text{Fe}(\text{OH})_2$, FeOH^+ et Fe^{2+} sont prépondérantes dans une solution. Dans notre milieu mimétique à pH 6, la concentration en $\text{Fe}(\text{OH})_2$ est négligeable et les trois composés majoritaires sont les ions en Fe^{2+} et les complexes phosphatés (FeHPO_4 , FeH_2PO_4) et aux pH inférieurs à 5, le complexe hydroxylé (FeOH^+). Il est cependant impossible de conclure sur la réactivité globale du Fe II dans notre milieu réactionnel. En effet, d'après la littérature, la réactivité du $\text{Fe}(\text{OH}^+)$ est 10^3 supérieure à celle du Fe^{2+} (Haddou, 2010) tandis que la réactivité du fer phosphaté est méconnue. Toutefois, si on fait l'hypothèse que seule la fraction soluble du Fe II est réactive, et que la réactivité des composés présents ne varie pas significativement, alors moins de 5% de la concentration en fer ajouté devrait conduire à du Fe II réactif.

En ce qui concerne le Fe III, le Tableau 22 montre qu'à pH 5 et 6, il est totalement sous forme précipitée. Si la forme soluble était la seule réactive, les réactions de Fenton ne devraient pas se dérouler à pH 5 et 6, ce qui est en contradiction avec nos expériences. Une fraction même faible du précipité est donc réactive. Ceci est cohérent avec les résultats de Kwan (2003) qui a montré que la vitesse de disparition du H_2O_2 dans un système Fenton est proportionnelle à la surface des particules de Fe III insolubles.

En conclusion, l'ensemble des résultats précédents conduisent à penser que les réactivités du Fe II et du Fe III sont vraisemblablement inférieure à 10% et même à 5% de la concentration en fer ajouté.

Pour aller plus loin dans la détermination de P2 et de P3, une étude de sensibilité a été faite en faisant varier successivement les valeurs de chacun de ces paramètres entre 0,01 et 0,1 (annexe 3). Le RMSE des concentrations en formazan et HTP calculées par rapport à leurs valeurs expérimentales à 0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes a été calculé. La Figure 35 montre les

résultats obtenus pour P2 et P3 compris entre 0,03 et 0,09. Les cinétiques de production du formazan ou du HTP sont moins sensibles à la variation de P2 qu'à celle de P3. Ceci est cohérent avec la dynamique globale du système. En effet, l'oxydation initiale des complexes de Fe II les plus réactifs est très rapide. Par la suite, la vitesse du cycle de Fenton est déterminée par la vitesse de réduction du Fe III en Fe II, qui s'effectue via les réactions 2 et 6. Enfin, les fractions les moins réactives de Fe II sont aussitôt oxydées via les réactions 1, 5 et 10 et ainsi de suite jusqu'à la disparition des fractions réactives du fer. Les valeurs de P2 et P3 qui ont été introduites dans le modèle sont celles pour lesquelles le RMSE était minimal (16 μM) soit P2 = 0,05 et P3 = 0,05. Mais la Figure 35 montre qu'une incertitude de l'ordre de 0,01 à 0,02 existe autour de ces valeurs.

Les valeurs des constantes de vitesse et des énergies d'activation incertaines dans la littérature (k_1 , k_5 , k_{10}) ont été déterminées en utilisant une démarche similaire à celle présentée pour P2 et P3. Les valeurs retenues sont les suivantes : $k_1 = 100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_5 = 7.10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{10} = 30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $E_{a1} = E_{a2} = 65 \text{ kJ M}^{-1}$.

IV.2.5.2 Comparaisons entre les concentrations en formazan et en HTP simulées et expérimentales

Les figures (Figure 36, Figure 37, Figure 38, Figure 39 et Figure 40) montrent une comparaison entre les concentrations en formazan et en HTP mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la concentration en fer, en H_2O_2 , et de la température du milieu. Les résultats calculés ont été obtenus à partir d'un seul jeu de paramètres présenté précédemment.

- Effet de la variation de la concentration en fer

Pour des concentrations en Fer II comprises entre 50 et 200 μM les résultats fournis par le modèle sont plutôt cohérents avec les résultats calculés, à 10 comme à 30 minutes. En effet, pour une concentration initiale en Fer II de 200 μM , la différence entre les concentrations mesurées et calculées à 10 minutes est de 26,6% et 10,5% respectivement pour le HTP et le formazan (Figure 36 et Figure 40) et celle à 30 minutes est de 50% et 48%. Ainsi, l'ajustement de P2 et P3 a surtout permis de mieux simuler la première phase de l'oxydation du fer. La réduction des écarts entre les mesures et les calculs du formazan et du HTP à 10 minutes est de 40%. Lorsque la concentration en Fe II devient supérieure à 200 μM , les concentrations en HTP prédites pour les temps les plus courts surestiment clairement les valeurs obtenues expérimentalement. Un effet inverse est observé pour le formazan lorsque la concentration en fer est égale à 600 μM . Mais les écarts observés pour des concentrations en fer supérieures à

200 μM n'ont pas d'implications pratiques en ce qui concerne l'oxydation des viandes, car les concentrations en fer non héminique dans ce type de produit sont toujours inférieures à 200 μM . En absence d' H_2O_2 , l'oxydation du Fe II se fait essentiellement via la R10. L'écart entre les résultats simulés et mesurés relatif au formazan à forte concentration en fer pourrait être dû aux valeurs de k_{10} et E_{a10} qui demeurent une source d'incertitude. En présence d' H_2O_2 , l'essentiel de la production d'HTP se fait durant les premières minutes par l'oxydation du Fe II en Fe III (R1). La vitesse de celle-ci dépend des complexes de Fe II dans le milieu et de leurs réactivités.

- Effet d'une variation de la concentration en H_2O_2

A 10 comme à 30 minutes, les concentrations en HTP prédites sont, pour des concentrations en H_2O_2 inférieures ou égale à 200 μM , proches de celles mesurées avec des écarts allant de 13,5% à 80% (Figure 37). Pour les concentrations en H_2O_2 supérieures à 200 μM , les prédictions tendent à surestimer les valeurs expérimentales pendant les dix premières minutes, l'écart se réduisant par la suite. Ces écarts pourraient être dus à l'évolution de la réactivité du fer au cours du temps. En effet nous avons considéré que la dynamique de la complexation du fer est très rapide et donc nous avons opté pour une valeur constante de P2 et de P3. Or H_2O_2 réagit avec le Fe III précipité. La vitesse de cette réaction est régie par la taille des particules précipitées qui pourrait faire varier la réactivité du Fe III au cours du temps (Kwan, 2002).

- Effet de la variation de la température entre 4 et 60°C

Les prédictions du modèle en fonction de la température sont en cohérence avec les concentrations en formazan et HTP mesurées à 10 et à 30 minutes. A 30°C par exemple, l'écart entre les mesures et les calculs en HTP sont respectivement de 5 et 21% de la valeur expérimentale aux deux temps considérés (Figure 38). Toutefois, à 4 et 60°C, l'écart s'accroît jusqu'à 78% et s'explique en partie par le fait qu'à ces températures extrêmes, l'écart type sur les valeurs expérimentales est élevé, la valeur moyenne étant alors plus incertaine. Pour le formazan, les calculs sont pour ces températures extrêmes en meilleur accord avec les mesures. A 10 minutes, la différence entre les valeurs simulées et mesurées varie entre 2% et 50% alors qu'à 30 minutes elle varie entre 14 et 23% (Figure 39).

La variation de la production d'HTP avec la température dépend essentiellement des valeurs des énergies d'activation des réactions 1 et 2 qui ont été ajustées localement. Ceci pourrait être aussi à l'origine de l'écart constaté aux températures les plus extrêmes (4 et 60°C). La production du formazan dépend de la réaction 10. Le couple k_{10}/E_{a10} est peu documenté et la valeur d' E_a reste donc incertaine.

- Effet de la présence d'antioxydants (AO) sur la formation du formazan et d'HTP

Le Tableau 23 compare à 4 et 60°C les valeurs des effets inhibiteurs ou promoteur tels que définis dans la partie IV.1. Les calculs de simulation ont été faits en utilisant la valeur des constantes réactionnelles relatives à chacun des AO. Les énergies d'activations des réactions des AO demeurent inconnues à notre connaissance.

Le modèle prédit bien les effets promoteurs ou au contraire inhibiteurs, tels que calculés en IV.2, de la carnosine, du GSH, et des vitamines C et E aussi bien pour l'HTP que pour le formazan formées. En revanche, le sens des variations prédites par le modèle est plus souvent en désaccord avec les expériences pour la SOD et la Catalase. Les valeurs prédites sont en général en meilleures accord avec les valeurs expérimentales à 60°C qu'à 4°C (Tableau 23). Les raisons de cette disparité sont multiples. En premier lieu, les valeurs des constantes réactionnelles de référence proviennent de la littérature avec souvent beaucoup d'incertitude. De plus, aucune valeur d'énergie d'activation n'ayant été introduite dans les calculs, l'effet de la température n'est rendu compte que par les réactions de production des radicaux libres : R1, R2, et R10. Les schémas réactionnels propres à chacun des AOs proviennent de résultats obtenus dans la littérature dans des milieux qui peuvent être différents de la viande. De plus, les interactions potentielles entre les AO et des espèces chimiques présentes à fortes concentration dans le milieu, tel le phosphate, ont été négligées ; de même que les interactions directes de certains AO avec le fer, telle la vitamine C.

IV.2.6 Conclusion

Un modèle stoechio-cinétique a été utilisé dans le but de prédire la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles dans un milieu modèle de viande en fonction de la concentration des réactants, de la température et de l'état du fer. Une première série de calcul a été effectuée en se basant complètement sur les valeurs des paramètres trouvées dans la littérature. Les concentrations en formazan et en HTP prédites, qui sont respectivement liées à la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles, étaient très différentes des valeurs expérimentales. La raison essentielle de cette différence viendrait du fait que la variation de la réactivité du fer liée à sa complexation, et à sa précipitation avait été négligée. La prédiction par un logiciel de thermodynamique des équilibres chimiques des différents états du fer, et la comparaison des cinétiques avec nos résultats expérimentaux, ont permis d'estimer, qu'à pH 6, seuls environ 5% de la concentration des formes de Fe(II) et de Fe(III) était réellement impliqués dans les réactions de Fenton. Ce phénomène a été introduit dans le modèle par l'intermédiaire de deux

coefficients P2 et P3 dont la valeur était constante au cours du temps et égale à 0,05. Un ajustement, paramètre par paramètre, a alors été effectué sur les paramètres dont les valeurs étaient, dans la littérature, particulièrement incertaines. Dans ce cas, les effets de la variation de la température et des concentrations initiales en fer et en H_2O_2 sur les valeurs des concentrations en formazan, ou en HTP, prédites par le modèle à 30 minutes sont en bon accord avec les résultats expérimentaux, excepté pour des concentrations initiales en fer ou en H_2O_2 très élevées. Pour les premières minutes de réaction, les calculs surestiment nettement les mesures. Ceci est vraisemblablement lié au fait que : (1) le jeu de paramètres introduit dans le modèle n'est pas complètement optimal et (2) l'hypothèse d'une réactivité du fer constante au cours du temps est vraisemblablement trop simplificatrice.

Les effets des AO sur la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles ont par la suite été simulés par le modèle stoechiométrique-cinétique. Les résultats ont été obtenus avec les constantes de vitesse issues de la littérature sans introduire d'énergie d'activation. Le modèle prédit bien les effets promoteurs ou au contraire inhibiteurs de la carnosine, du GSH, et des vitamines C et E sur les quantités d'HTP ou de formazan formées

Pour améliorer les capacités de prédictions du modèle sur le système de Fenton, il faudrait intégrer des coefficients de réactivité P2 et P3 qui varient au cours du temps. Il faudrait également procéder à un ajustement global des valeurs de l'ensemble des paramètres du système à l'intérieur de l'intervalle de variation défini dans cette étude. Les interactions des antioxydants entre eux et avec les composés présents dans le milieu réactionnel devraient également être introduites dans le modèle pour mieux prédire l'effet de ces composés sur la génération des radicaux superoxydes et hydroxyles. Enfin, l'oxydation des viandes est également très dépendante de la myoglobine dans le milieu, cette perspective faisant l'objet d'un travail en cours.

Tableau 21 : Synthèse des constantes de vitesse des réactions k et des énergies d'activation (E_a), sélectionnées pour le modèle mathématique. k exprimé en $M^{-1}.s^{-1}$ ou en s^{-1} . (E_a) est exprimée en kJ

Numéro des réactions	Réactions	k Référence à pH 6, 25°C	E_a (kJ)	Principales références bibliographiques
1	$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + OH^- + HO^\circ$	$1,5.10^3$	40	Millero <i>et al.</i> , 1991
2	$Fe(III) + H_2O_2 \rightarrow Fe(II) + H^+ + (HO_2^{\circ-} / O_2^{\circ-})$	2	65	Joseph De Laat & Gallard, 1999
3	$HO^\circ + H_2O_2 \rightarrow H_2O + (HO_2^{\circ-} / O_2^{\circ-})$	3.10^7		Kwan <i>et al.</i> , 2002
4	$Fe(II) + HO^\circ \rightarrow Fe(III) + HO^-$	$3,5.10^8$		Ramirez <i>et al.</i> , 2009
5	$Fe(II) + (HO_2^{\circ-} / O_2^{\circ-}) \rightarrow Fe(III) + H_2O_2$	$9,5.10^6$		De Laat <i>et al.</i> , 1999
6	$Fe(III) + (HO_2^{\circ-} / O_2^{\circ-}) \rightarrow Fe(II) + O_2 + H^+$	1.10^4		Fowles <i>et al.</i> , 2007
10	$Fe(II) + O_2 \rightarrow Fe(III) + (HO_2^{\circ-} / O_2^{\circ-})$	3	65	Gallard <i>et al.</i> , 1999
18	$(HO_2^{\circ-} / O_2^{\circ-}) + (HO_2^{\circ-} / O_2^{\circ-}) \rightarrow H_2O_2 + O_2$	$5,4.10^6$		Bielski, 1985
19	$HO^\circ + HO^\circ \rightarrow H_2O_2$	5.10^9		Kwan <i>et al.</i> , 2002
20	$HO^\circ + (HO_2^{\circ-} / O_2^{\circ-}) \rightarrow H_2O + O_2$	10.10^9		Kwan <i>et al.</i> , 2002
21	$H_2O_2 \rightarrow 1/2(O_2) + H_2O$	1.10^{-4}	40	Rivas <i>et al.</i> , 2001

30	$\text{NBT} + 2 \text{O}_2^{\circ-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{MF} + 2 \text{O}_2$	$5,9 \cdot 10^4$		Altman <i>et al.</i> , 1976
31	$\text{MF} + 2 \text{O}_2^{\circ-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{DF} + 2 \text{O}_2$	$5,9 \cdot 10^4$		Altman <i>et al.</i> , 1976
32	$\text{HO}^\circ + \text{TP} \rightarrow \text{HO-TP}^\circ$	$2,8 \cdot 10^9$		Fang <i>et al.</i> , 1996
33	$\text{HO-TP}^\circ + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO-TP-O}_2^{\circ-}$	$1,6 \cdot 10^7$		Fang <i>et al.</i> , 1996
34	$\text{HO-TP-O}_2^{\circ-} \rightarrow \text{HO-TP}^\circ + \text{O}_2$	$3,4 \cdot 10^3$		Fang <i>et al.</i> , 1996
35	$\text{HO-TP-O}_2^{\circ-} \rightarrow \text{HTP} + (\text{HO}_2^\circ / \text{O}_2^{\circ-})$	175		Fang <i>et al.</i> , 1996
36	$\text{HO}^\circ + \text{TP} \rightarrow \text{composé perdu 1}$	$0,5 \cdot 10^9$		Fang <i>et al.</i> , 1996
37	$\text{HO-TP-O}_2^{\circ-} \rightarrow \text{composé perdu 2} + \text{O}_2$	215		Fang <i>et al.</i> , 1996
38	$\text{HTP} + \text{HO}^\circ \rightarrow \text{composé perdu 3}$	$6,3 \cdot 10^9$		Fang <i>et al.</i> , 1996
48	$(\text{HO}_2^{\circ-} / \text{O}_2^{\circ-}) + (\text{HO}_2^{\circ-} / \text{O}_2^{\circ-}) + \text{SOD} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	$1,6 \cdot 10^9$		Thérond & Bonnefont-Rousselot, 2005
49	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalase} \rightarrow 1/2(\text{O}_2) + \text{H}_2\text{O}$	10^7		Thérond & Bonnefont-Rousselot, 2005
50	$\text{GSH} + \text{HO}^\circ \rightarrow \text{GS}^\circ + \text{H}_2\text{O}$	$1,3 \cdot 10^{10}$		Quintiliani <i>et al.</i> , 1977

51	Carnosine + (HO ₂ ^{o-} / O ₂ ^{o-}) → Composé perdu 4	0,83. 10 ⁵		Pavlov <i>et al.</i> , 1993
52	Carnosine + (HO ^o) → Composé perdu 5	9. 10 ⁹		Pavlov <i>et al.</i> , 1993
53	α-tocophérol + (HO ₂ ^{o-} / O ₂ ^{o-}) → Composé perdu 6	6		Khalil <i>et al.</i> , 2002
54	α-tocophérol + (HO ^o) → Composé perdu 7	6,9.10 ⁹		Davies <i>et al.</i> , 2005
55	(AH ₂ /AH ⁻) + Fe(III) → (AH ^o /A ^{o-}) + Fe(II)	10		Buettner <i>et al.</i> , 2004
56	(AH ₂ /AH ⁻) + (HO ₂ ^{o-} / O ₂ ^{o-}) + H ⁺ → H ₂ O ₂ + (AH ^o /A ^{o-})	0,1.10 ⁷		Buettner <i>et al.</i> , 2004
57	(AH ₂ /AH ⁻) + HO ^o → H ₂ O + (AH ^o /A ^{o-})	1100.10 ⁷		Buettner <i>et al.</i> , 2004
58	2(AH ^o /A ^{o-}) + H ⁺ → (AH ₂ /AH ⁻) + A	0,02.10 ⁷		Buettner <i>et al.</i> , 2004
59	A ²⁻ + O ₂ → (AH ^o /A ^{o-}) + (HO ₂ ^{o-} / O ₂ ^{o-})	10 ²		Buettner <i>et al.</i> , 2004
60	(AH ₂ /AH ⁻) + (AH ^o /A ^{o-}) → 2(A)	1,24.10 ⁻⁴		Buettner <i>et al.</i> , 2004

Tableau 22 : Proportions de précipitation du Fe II et du Fe III en fonction du pH du milieu (phosphate= 40mM, 200 μ M de FeII ou de Fe III, 25°C) calculées avec le logiciel Minteq (Gustafsson, 2001)

% de précipitation		
pH	Fer II	Fer III
3,5	0	99,85
5	33,13	100
6	95,76	100

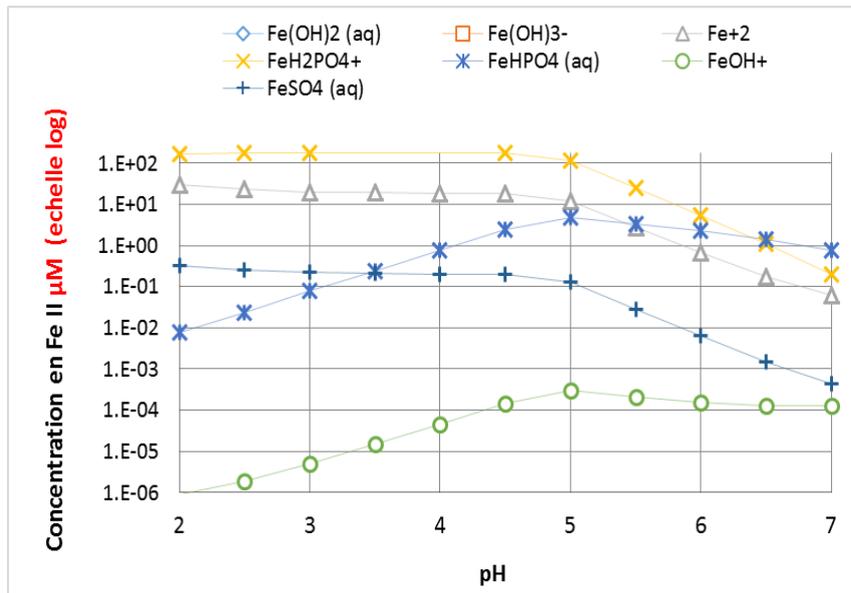


Figure 34 : Calcul des concentrations des complexes du Fe II en fonction du pH avec le logiciel Minteq (Gustafsson, 2001) pour un tampon phosphate 40 mM contenant 200 μ M de FeSO_4

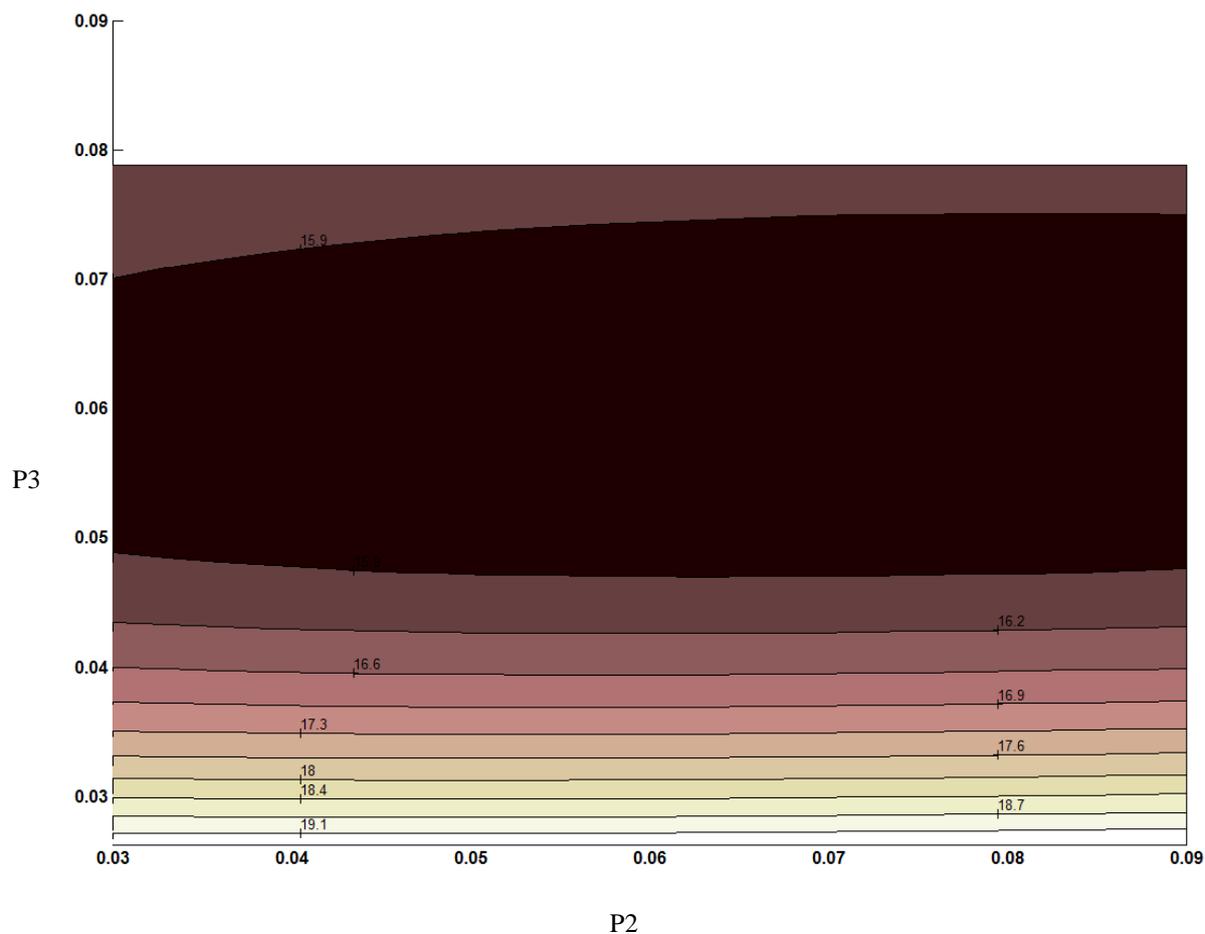


Figure 35 : Ecart quadratique moyen, calculé par le modèle stoechio-cinétique, entre les concentrations mesurées et calculées à 0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes, pour toutes les conditions expérimentales du Tableau 13 du chapitre II pour différentes valeurs du couple P2/P3

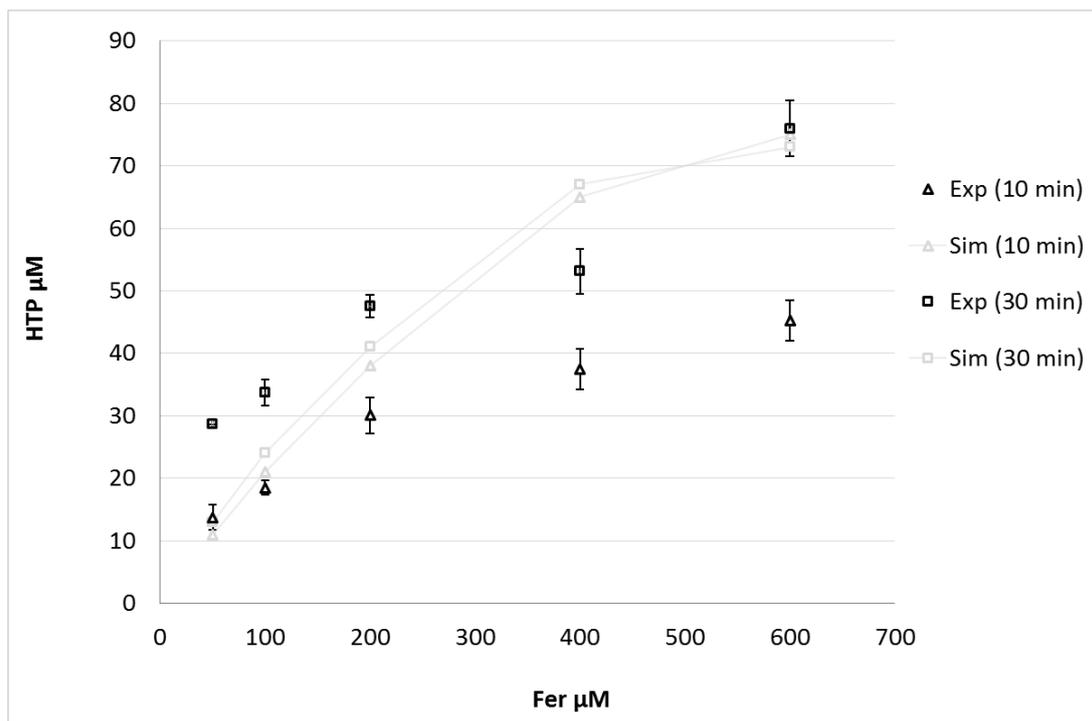


Figure 36 : Comparaison entre les concentrations en HTP mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la concentration initiale en fer (60°C, H₂O₂ = 200 µM)

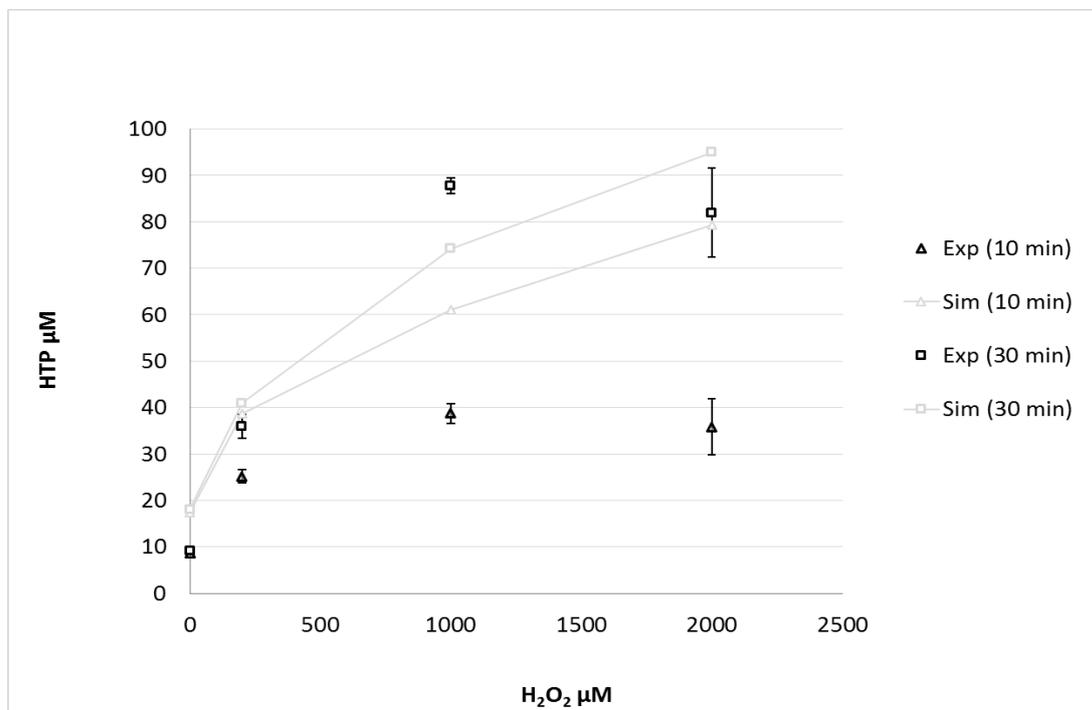


Figure 37 : Comparaison entre les concentrations en HTP mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la concentration initiale en H₂O₂ (60°C, FeSO₄ = 200 µM)

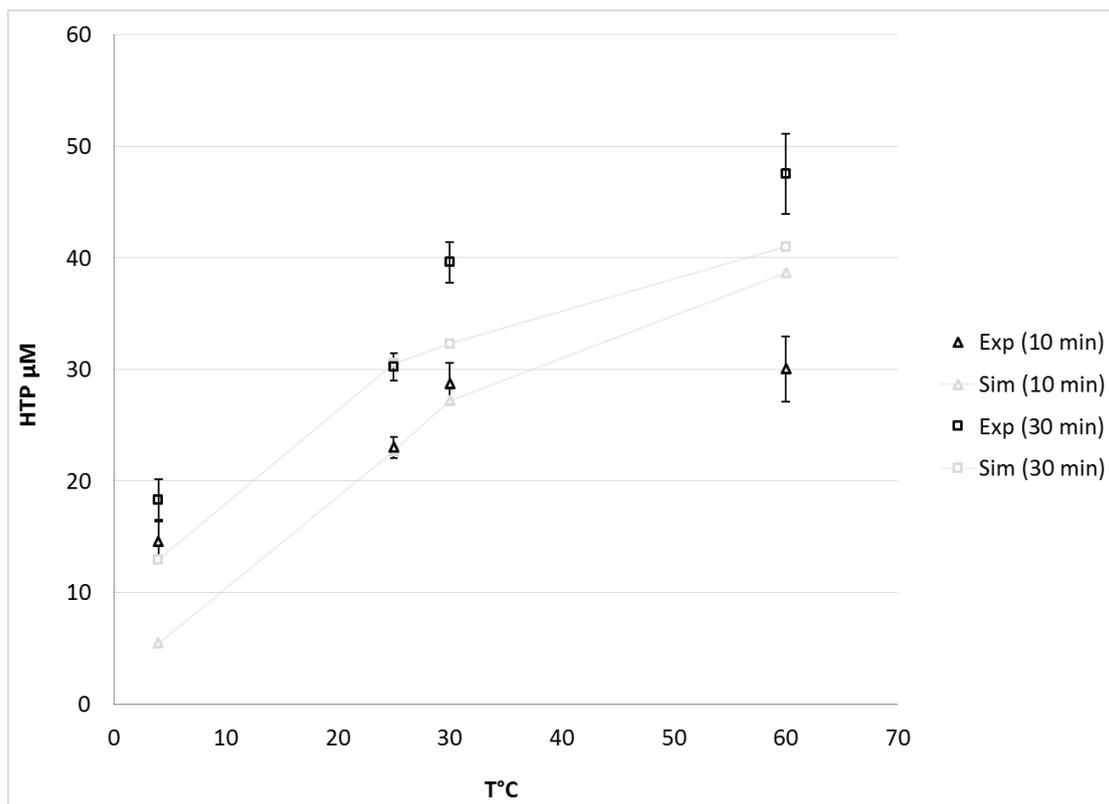


Figure 38 : Comparaison entre les concentrations en HTP mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la température ($\text{FeSO}_4 = \text{H}_2\text{O}_2 = 200 \mu\text{M}$)

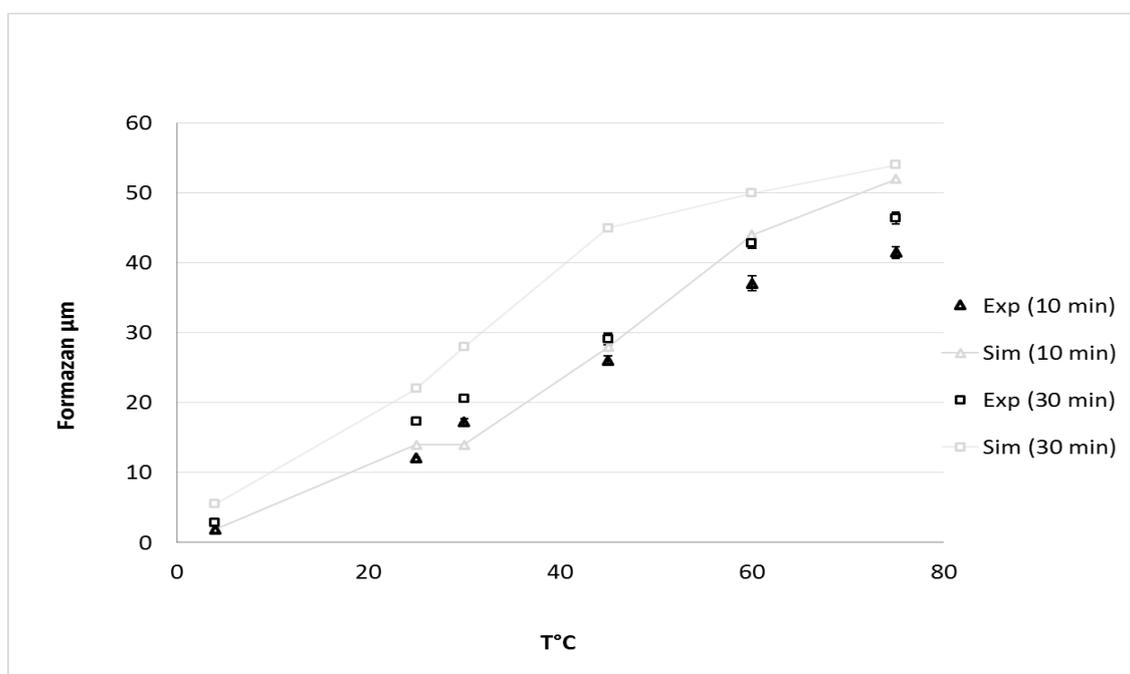


Figure 39 : Comparaison entre les concentrations en formazan mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la température ($\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$, sans H_2O_2)

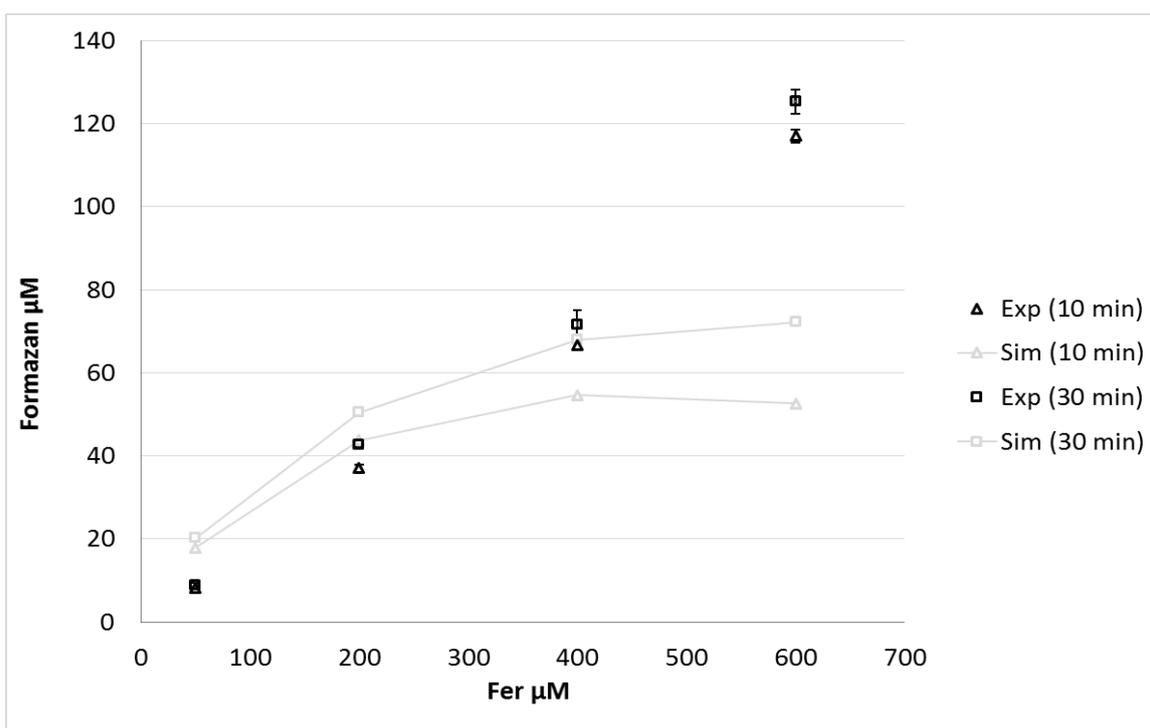


Figure 40 : Comparaison entre les concentrations en formazan mesurées et calculées à 10 et 30 minutes en fonction de la concentration initiale en fer (60°C, sans H₂O₂)

Tableau 23 : Résultats calculés et mesurés des effets promoteur ou inhibiteur des AO, exprimé en % par rapport au témoin sans AO à 30 minutes pour les essais à haute température (60°C) et à 20 heures pour les essais à basse température (4 °C)

HTP (200 µM de FeSO₄, 200 µM de H₂O₂ +AO) et formazan (200 µM de FeSO₄, pas H₂O₂ +AO)

Antioxydants	Résultats calculés				Résultats mesurés			
	HTP		formazan		HTP		formazan	
	60°C	4°C	60°C	4°C	60°C	4°C	60°C	4°C
SOD	-13.6	32.2	14.4	92.9	15	-18	-14	-59
Catalase	-13.6	32.2	14.4	47	-50	-81	19	1684
Carnosine	-95.7	-89	90	-14	-97	-95	6	138
GSH	-74.7	-61.7	19	93	-63	-73	85	94
Vit C	-26.3	74.8	26	95	-18	8	19	50
Vit E	-13.6	42	16.7	83.8	175	19	1	24

Références bibliographiques

- Bielski, B. H. J., Shiue, G. G., & Bajuk, S. (1980). Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂⁻ and O₂⁻ radicals. *The Journal of Physical Chemistry*, 84(8), 830-833.
- Cihanoglu, A., Gunduz, G., & Dukkanci, M. (2015). Degradation of acetic acid by heterogeneous Fenton-like oxidation over iron-containing ZSM-5 zeolites. *Applied Catalysis B: Environmental*, 165, 687-699.
- De Laat, J., & Gallard, H. (1999). Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe(III) in Homogeneous Aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling. *Environmental Science & Technology*, 33(16), 2726-2732.
- De Laat, J., Gallard, H., Ancelin, S., & Legube, B. (1999). Comparative study of the oxidation of atrazine and acetone by H₂O₂/UV, Fe(III)/UV, Fe(III)/H₂O₂/UV and Fe(II) or Fe(III)/H₂O₂. In *Chemosphere*, vol. 39 (pp. 2693-2706).
- Esteves, B. M., Rodrigues, C. S. D., Boaventura, R. A. R., Maldonado-Hódar, F. J., & Madeira, L. M. (2016). Coupling of acrylic dyeing wastewater treatment by heterogeneous Fenton oxidation in a continuous stirred tank reactor with biological degradation in a sequential batch reactor. *Journal of Environmental Management*, 166, 193-203.
- Fang, X., Mark, G., & Sonntag (von), C. (1996). OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions Part I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 57-63.
- Fowles, E. H., Gilbert, B. C., Giles, M. R., & Whitwood, A. C. (2007). The effects of chelating agents on radical generation in alkaline peroxide systems, and the relevance to substrate damage. *Free Radic Res*, 41(5), 515-522.
- Kwan, W. P., & Voelker, B. M. (2003). Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems. *Environmental Science & Technology*, 37(6), 1150-1158.
- Li, H., Jiang, W., Liu, Y., Jiang, J., Zhang, Y., Wu, P., Zhao, J., Duan, X., Zhou, X., & Feng, L. (2016). The metabolites of glutamine prevent hydroxyl radical-induced apoptosis through inhibiting mitochondria and calcium ion involved pathways in fish erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 92, 126-140.
- Millero, F. (2001). Speciation of metals in natural waters. *Geochemical Transactions*, 2(8), 56.
- Morgan, B., & Lahav, O. (2007). The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution – basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere*, 68(11), 2080-2084.
- Page, S. E., Arnold, W. A., & McNeill, K. (2010). Terephthalate as a probe for photochemically generated hydroxyl radical. *J Environ Monit*, 12(9), 1658-1665.
- Shaeib, F., Banerjee, J., Maitra, D., Diamond, M. P., & Abu-Soud, H. M. (2013). Impact of hydrogen peroxide-driven Fenton reaction on mouse oocyte quality. *Free Radical Biology and Medicine*, 58, 154-159.
- Uehara, H., Luo, S., Aryal, B., Levine, R. L., & Rao, V. A. Distinct oxidative cleavage and modification of bovine [Cu-Zn]-SOD by an ascorbic acid/Cu(II) system: Identification of novel copper binding site on SOD molecule. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Welch, K. D., Davis, T. Z., & Aust, S. D. (2002). Iron Autoxidation and Free Radical Generation: Effects of Buffers, Ligands, and Chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 360-369.

Zhao, B., Wang, X., Shang, H., Li, X., Li, W., Li, J., Xia, W., Zhou, L., & Zhao, C. (2016). Degradation of trichloroacetic acid with an efficient Fenton assisted TiO₂ photocatalytic hybrid process: Reaction kinetics, byproducts and mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 289, 319-329.

IV.3 Effets du chlorure et du pH sur la production des radicaux libres issus du système Fenton dans la viande

IV.3.1 Introduction générale

La partie bibliographique a fait apparaître que les trois paramètres physicochimiques principaux pouvant moduler les oxydations dans les produits carnés transformés à basses températures (salaison, marinage) ou pendant la conservation et la digestion étaient la température, le pH et la teneur en chlorure de sodium.

Des essais spécifiques, utilisant les mêmes matériels et méthodes que précédemment, ont donc été conduits à seulement 2 températures pour évaluer les effets respectifs du pH et du chlorure de sodium.

IV.3.2 Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales ont été détaillées dans le chapitre II.1.6

IV.3.3 Résultats et discussion

IV.3.3.1 Effet du pH

Les valeurs des concentrations des sondes mesurées à 30 minutes sont présentées respectivement pour le formazan et le HTP sur les Figure 41 et Figure 44. A 4°C, la production de formazan est apparue très faible et les concentrations finales étaient au-dessous du seuil de détection. L'effet du pH est manifeste sur la production des deux radicaux libres oxygénés mais il est très différent selon le radical. Pour interpréter ces résultats, nous nous sommes appuyés, d'une part, sur des calculs de simulation avec le modèle stoechio-cinétique, en gardant les paramètres retenus en IV.2, et d'autre part, sur une comparaison des concentrations des complexes et précipités du Fe II prédits par Minteq en fonction du pH.

Production du radical $O_2^{\bullet-}$ et du formazan

La Figure 41 indique une forte augmentation de la concentration en formazan mesurée à 30 minutes en fonction de l'augmentation du pH : elle est environ 8 fois plus grande à pH 6,5 qu'à

pH 3,5. Ceci paraît logique puisque le diagramme de dissociation du couple ($\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^{\circ-}$) de $\text{pK}_a = 4,8$ (Figure 16) indique que la proportion d' $\text{O}_2^{\circ-}$ est respectivement égale à 5, 55 et 95% pour les pH 3,5 ; 5 et 6,5. La Figure 42 indique que la vitesse de production du radical superoxyde (R10) prédite au cours du temps par les calculs de simulation. L'effet pH est conforme aux observations, il serait toutefois imprudent de commenter la valeur des variations car mes calculs ne prennent pas en compte la modification de la réactivité du fer avec le pH. La Figure 43, issue du même calcul renseigne sur les proportions d' $\text{O}_2^{\circ-}$ réagissant soit avec la sonde NBT par les réactions (R30 et R31) soit avec le Fe II par la R5. Ces résultats montrent qu'à pH 5 et 6,5, la sonde NBT piège bien la majorité des $\text{O}_2^{\circ-}$ produits et exactement dans les mêmes proportions, ce qui signifie que l'augmentation de la concentration en formazan traduit bien une augmentation de même ampleur de la production du radical superoxyde. Il n'est pas de même entre pH 3,5 et 5 puisque la proportion en $\text{O}_2^{\circ-}$ piégée par la sonde est bien inférieure à pH 3,5, autrement dit, l'écart réel de production des $\text{O}_2^{\circ-}$ est plus grand que celui constaté en observant la réduction de la sonde.

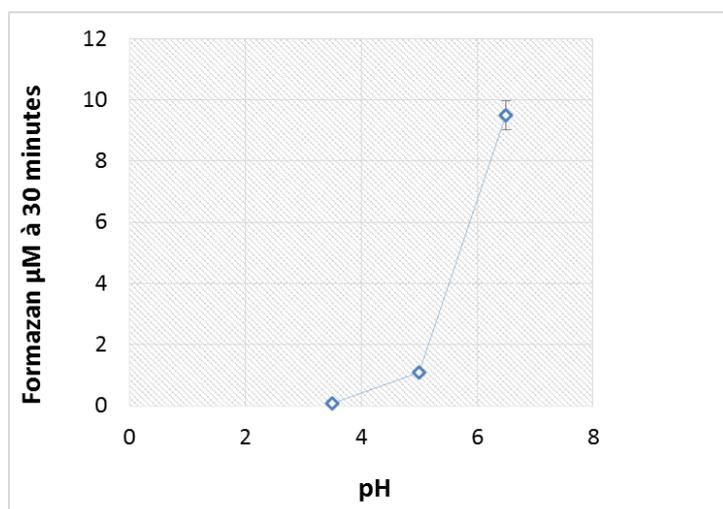


Figure 41 : Mesure de la production de formazan en fonction du pH à 37°C (tampon phosphate, $\text{FeSO}_4 = 50 \mu\text{M}$, sans H_2O_2)

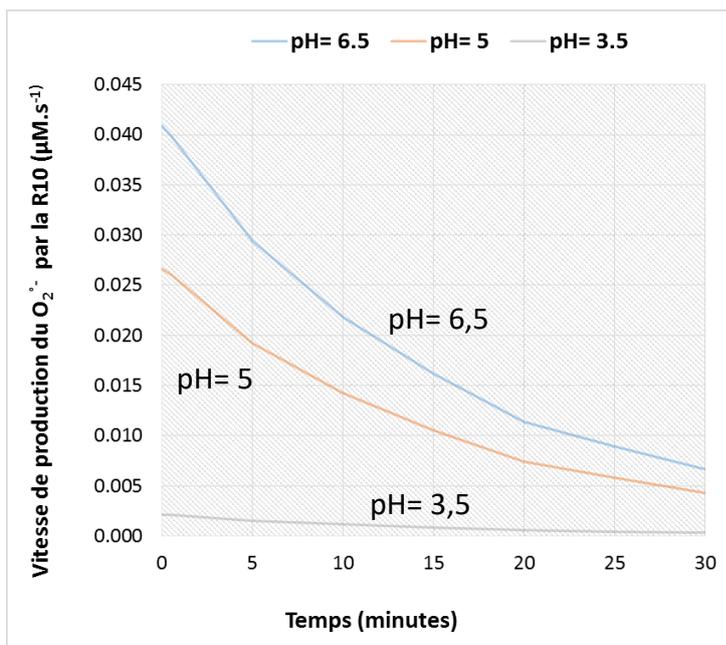


Figure 42 : Calcul de la vitesse de production du radical superoxyde sur 30 minutes à différents pH (tampon phosphate, $\text{FeSO}_4 = 50 \mu\text{M}$, sans H_2O_2 , 37°C)

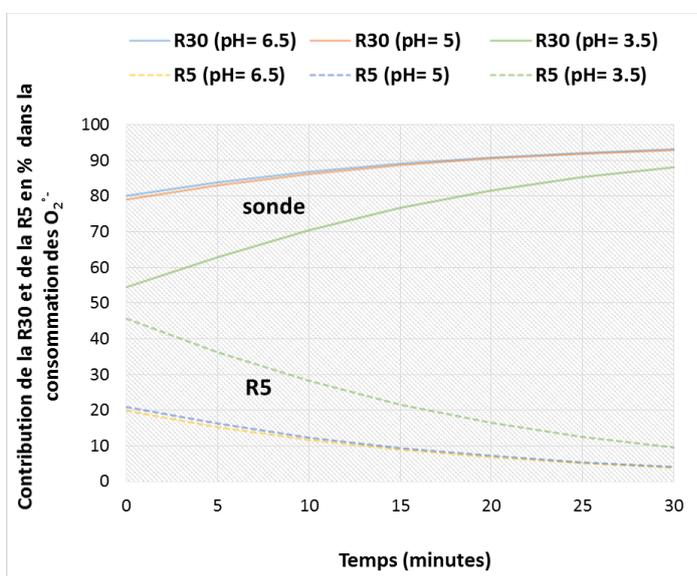


Figure 43 : Calcul des proportions d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ réagissant soit avec la sonde NBT par les réactions (R30 et R31) soit avec le Fe II par la R5

Production du radical (HO°) et du HTP

Les calculs de simulation ont montré que quelle que soit la température et le pH de nos conditions expérimentales, plus de 95% des radicaux (HO°) réagissait avec le TP, les contributions des réactions R3 et R4 étant donc négligeables en présence de la sonde. La Figure 44 montrent qu'à pH 5, la production d' (HO°) est environ 50% plus grande à 37°C qu'à 4°C, ce qui est conforme au fait que les deux réactions R1 et R2 ont des énergies d'activation égales à 40 et 65 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (chapitre IV.2). L'allure des courbes est plus difficile à expliquer car elle résulte de l'effet combiné de deux phénomènes de nature différentes : (1) les interactions entre les réactions R6, R5 et R18 auxquelles sont associées des fonctions croissantes ou décroissantes en fonction du pH et qui sont à l'origine de la conversion des $\text{O}_2^{\circ-}$ en (HO°) dans les milieux biologiques en favorisant la synthèse d' H_2O_2 . En produisant, par radiolyse de l'eau, des quantités connues de radicaux superoxydes et en mesurant les quantités d' (HO°) produites par la chimie de Fenton. Backer *et al.* (1986) ont obtenu un taux maximum de transformation à pH 4,8, soit au pKa du couple $\text{HO}_2^\circ/\text{O}_2^{\circ-}$ et des taux beaucoup plus petits et sensiblement équivalents à pH 3,7 et à pH 7,4. Ils ont interprété leur résultats, équivalents à ceux que nous avons observés à la température de 37°C, par les interactions évoquées précédemment (2) les modifications des concentrations des différents complexes et précipités du fer qui sont probablement à l'origine d'un changement des réactivités des Fe II et Fe III. Les résultats présentés pour le Fe II dans le Tableau 24 montrent par exemple la diminution très importante de la solubilité du complexe $\text{FeH}_2\text{PO}_4^+$ entre pH 5 et 6,5 et la réduction par deux de la concentration en ion Fe^{2+} quand la température s'élève de 4 à 37°C.

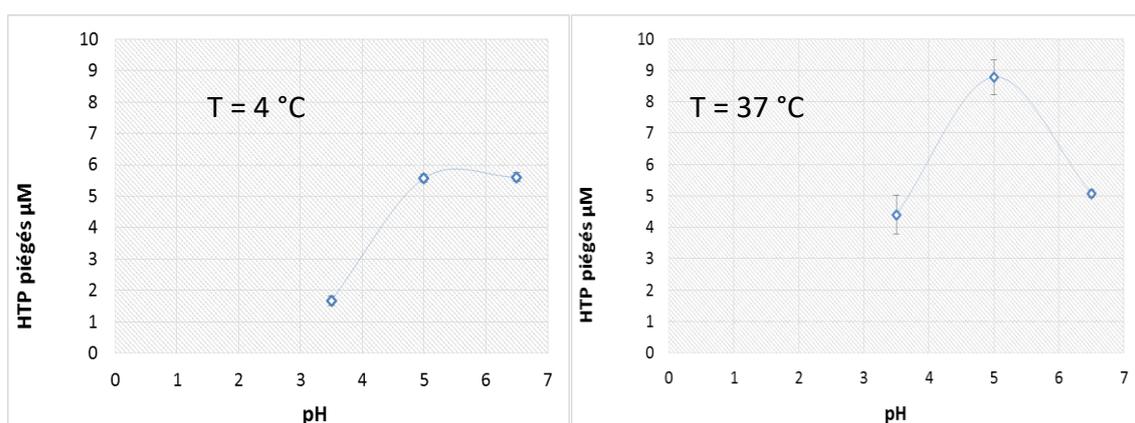


Figure 44 : Mesure de la production du HTP en fonction du pH à 4 et 37°C (tampon phosphate, $\text{FeSO}_4 = \text{H}_2\text{O}_2 = 50 \mu\text{M}$)

Tableau 24 : Calcul de l'effet de la température sur les concentrations en complexes de fer dans une solution aqueuse simple de FeSO₄ à 50 μM à trois différents pH (3,5; 5 et 6,5). Calcul fait avec Minteq (Gustafsson, 2001)

pH	4°C			37°C		
	3,5	5	6,5	3,5	5	6,5
FeH ₂ PO ₄ ⁺	42,50	40,62	0,68	46,18	44,36	1,31
Fe ²⁺	7,44	7,08	0,19	3,74	3,58	0,17
FeHPO ₄ (aq)	0,05	2,29	1,04	0,07	2,04	1,57
FeSO ₄ (aq)	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00
FeOH ⁺	9,2E-07	4,2E-05	2,9E-05	7,6E-06	2,3E-04	2,7E-04
Fe(OH) ₂ (aq)	2,4E-15	5,4E-12	9,9E-11	4,7E-13	4,5E-10	1,4E-08
Fe(OH) ₃ ⁻	2,0E-22	2,2E-17	1,2E-14	6,9E-20	2,1E-15	1,8E-12

La concentration du fer soluble à pH 6,5 à 4°C et 37°C est respectivement égale à 1,91 et 3,05 μM. A ces pH, le fer précipité est sous forme de vivianite

IV.3.3.2 Effet du chlorure de sodium

L'ajout de chlorure de sodium dans le milieu entraîne la baisse de la concentration du formazan et du HTP. Cette baisse comparée au témoin (sans NaCl) est de 7 et 27% à 30 minutes dans le cas du HTP et est de 21% et 46,5% dans le cas du formazan (Figure 45 ; Figure 46).

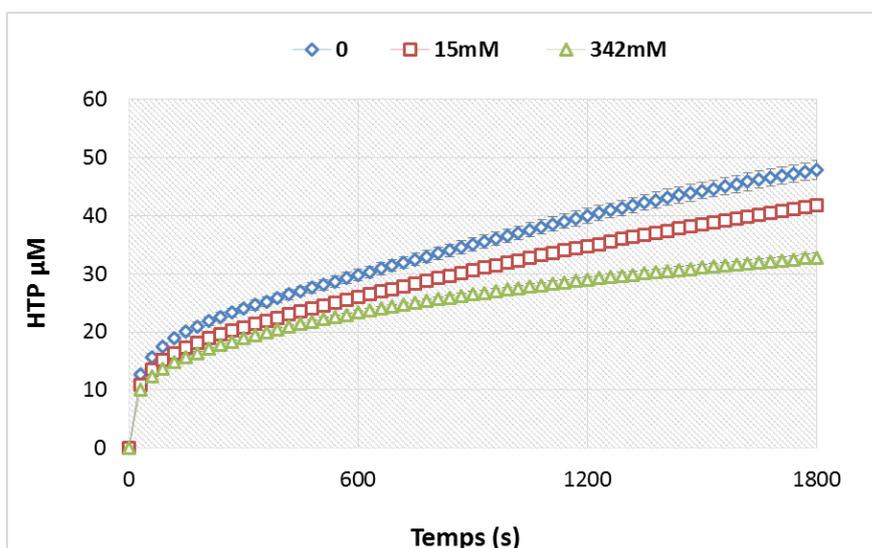


Figure 45 : Cinétique de formation du HTP en fonction de la concentration initiale en NaCl (tampon phosphate, FeSO₄ = H₂O₂ = 200 μM à 60°C)

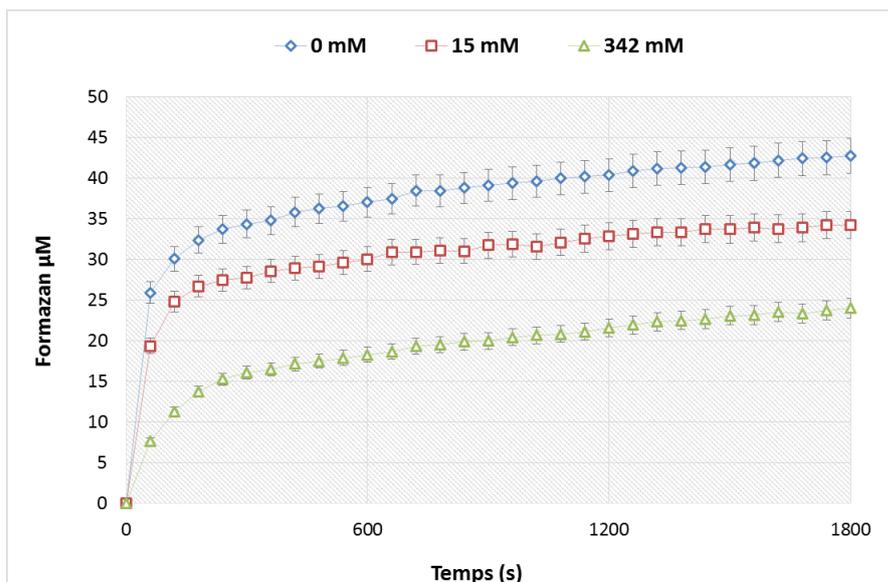
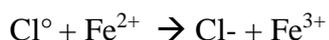


Figure 46 : Cinétique de formation du formazan en fonction de la concentration initiale en NaCl (tampon phosphate, $\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$, sans H_2O_2 à 60°C)

Cette baisse s'explique par la réaction suivante qui sera plus intense que la concentration en ions chlorure dans le milieu est élevée (Jayson *et al.*, 1973 ; Xu et Barker., 2003 ; Delaat *et al.*, 2004) :



Un autre radical $\text{Cl}_2^{\circ-}$ peut se former à partir de la combinaison des Cl° mais il est beaucoup moins réactif. Le radical chlorure formé est impliqué dans une série de réactions réversibles :



Dans le cas du formazan, l' (HO°), responsable de l'oxydation de l'ion chlorure, se formerait en faible quantité par dismutation du $\text{O}_2^{\circ-}$. Le radical chlorure formé entrerait alors en compétition avec l' O_2 vis-à-vis du fer et réduirait ainsi l'oxydation du fer par la R10. Cette dernière étant la voie principale de production d' $\text{O}_2^{\circ-}$, le « ralentissement » de la R10 entraîne une diminution des $\text{O}_2^{\circ-}$ dans le milieu.

Dans le cas du HTP, l' (HO°) est produit en forte quantité par la R1. Le radical chlorure formé réagit avec le H_2O_2 et le Fe II. Il se trouve que ces derniers (H_2O_2 , Fe II) sont les réactants de la R1, principale voie de production du (HO°) dans le milieu. Le radical chlorure réagit probablement aussi avec le Fe III, ce qui ralentirait aussi par la R2. Ainsi, la production du HTP diminue pour des concentrations en NaCl plus élevées.

La constante de vitesse de la réaction d'oxydation du Cl^- par le (HO°) est méconnue et celles des réactions d'oxydation du Fe II et du H_2O_2 par Cl° sont incertaines ($1.10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5,9.10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Xu et Barker., 2003 ; Delaat *et al.*, 2004). Il est alors difficile d'estimer par le calcul l'ampleur de l'impact de ces réactions dans le système et leurs contributions à la baisse du formazan ou du HTP. Nos résultats sont toutefois en cohérence avec l'ampleur de la réduction d'oxydation des lipides constatée sur des viandes suite à l'ajout de NaCl.

Un effet inhibiteur du NaCl sur l'oxydation des lipides dans certaines conditions. A titre d'exemple, King et Basch.(1990) ont montré un effet inhibiteur d'une forte concentration en NaCl (> à 2% en masse de NaCl dans la viande hachée du porc) sur l'oxydation des lipides. Sarraga *et al.* (2002) ont observé également un effet antioxydant du NaCl dans la viande de porc séchée (3% en masse de NaCl). Sharedeh *et al.* (2015) ont étudié l'effet du pH (4,3 ; 5,4 ; 6,5) et du NaCl (0,9% et 2% en masse) sur l'oxydation des lipides de viande de bœuf. Quel que soit le pH, la baisse de l'oxydation des lipides suite à l'augmentation de la concentration en NaCl était d'environ 20%.

Il faut noter cependant que d'autres auteurs ont observé un rôle pro-oxydant du NaCl sur les lipides des viandes. Ils ont alors expliqué leurs résultats par le décrochage du fer hémunique (Kannel *et al.*, 1991) ou par la dégradation de l'activité des enzymes antioxydantes (Gheisari *et al.*, 2002). Il faudrait donc poursuivre cette étude en ajoutant au milieu mimétique ces composés.

IV.3.4 Conclusion

Cette étude a permis de quantifier les radicaux libres oxygénés issus de l'oxydation du fer à différents pH et à différentes concentrations en chlorure par l'utilisation des sondes.

La concentration en formazan augmentait avec le pH alors que celle du HTP suivait l'allure d'une cloche : une faible concentration à pH 3,5 et 6,5 et un niveau plus élevé à pH 5. L'hypothèse de la conversion de O_2° en (HO°) a été proposée par certains auteurs. Toutefois, pour mieux expliquer le fléchissement de la concentration en HTP entre pH 5 et 6,5, il faudrait de nouvelles mesures d'HTP à des intervalles de pH plus restreints compris entre 5,5 et 6,5 couvrant ainsi le pH de la viande maturée et de la viande cuite. Il faudrait également faire des simulations en variant P2 et P3 puisque la réactivité du fer change en fonction du pH.

Ces mesures ont également montré un rôle antioxydant du chlorure sur le formazan et le HTP. L'introduction des réactions d'oxydation des ions chlorure par le (HO°) et les réactions d'oxydation du Fe II et du H_2O_2 par le radical chlorure formé permettra d'un côté d'ajuster les

valeurs des constantes de vitesses de ces réactions décrites dans la littérature et de prédire la production en radicaux libres oxygénés pour d'autres concentrations en chlorure.

La méthode de détection des radicaux libres par des sondes chimiques testées dans le cadre de cette étude a été appliquée pour caractériser la production des radicaux libres dans les conditions du tube digestif (chapitre IV.4).

IV.4 Evaluation de l'impact du système Fenton sur la digestion de la viande in vitro dans un modèle gastro-intestinal (Oueslati *et al.*, 2016)

Cette étude est une application de la méthode de détection des radicaux libres avec des radicaux libres des sondes chimiques mise au point dans les parties précédentes. Les conditions physico-chimiques étudiées sont des conditions gastriques avec une solution saline (KCl, NaCl, CaCl₂) à 20 mM de phosphate et un pH initial égal à 3,5. Le pH est augmenté par ajout de NaOH jusqu'à 6,5 pour mimer la phase intestinale. L'effet des radicaux libres produits sur l'oxydation des lipides et des protéines et l'effet des antioxydants sur ces oxydations sont présentés.

Il a été constaté que, dans des conditions gastriques, la concentration du couple ($O_2^{\circ} / HO_2^{\circ}$) est plus élevée que celle du (HO°). En accord avec les mesures faites avec le modèle mimétique de la viande à 37°C, les cinétiques de production des radicaux libres sont semblables à pH 3,5 et 6,5, bien que la contribution des réactions du système réactionnel est différente. Les oxydations générées par ces radicaux libres ont été estimées sur des myofibrilles préparées à partir de muscle *rectus femoris* de porc. Ainsi, l'oxydation des lipides et des protéines myofibrillaires augmente avec le temps et la concentration des oxydants avec un impact négatif sur la digestibilité des protéines myofibrillaires. Les antioxydants d'origine végétale ont considérablement diminué la production de radicaux libres et l'oxydation des lipides.



Impact of the Fenton process in meat digestion as assessed using an *in vitro* gastro-intestinal model



Khaled Oueslati, Diane de La Pomélie, Véronique Santé-Lhoutellier, Philippe Gatellier*

INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122 Saint Genès-Champagnelle, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2016
Received in revised form 13 April 2016
Accepted 13 April 2016
Available online 18 April 2016

Keywords:

Digestibility
Free radicals
Lipid oxidation
Protein oxidation

ABSTRACT

The production of oxygen free radicals catalysed by non-haem iron was investigated in an *in vitro* mimetic model of the digestive tract using specific chemical traps. Superoxide radicals ($O_2^{\cdot -}$) and their protonated form (hydroperoxyl radicals, HO_2^{\cdot}) were detected by the reduction of nitroblue tetrazolium into formazan, and hydroxyl radicals (OH^{\cdot}) were detected by the hydroxylation of terephthalate. Under gastric conditions, $O_2^{\cdot -}/HO_2^{\cdot}$ were detected in higher quantity than OH^{\cdot} . Increasing the pH from 3.5 to 6.5 poorly affected the kinetics of free radical production. The oxidations generated by these free radicals were estimated on myofibrils prepared from pork *rectus femoris* muscle. Myofibrillar lipid and protein oxidation increased with time and oxidant concentration, with a negative impact on the digestibility of myofibrillar proteins. Plant food antioxidants considerably decreased free radical production and lipid oxidation but not protein oxidation.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Meat is an important source of iron in the human diet. Iron is an essential element for the human body. It is required for many enzymes that are critical for cellular function, and plays a fundamental role in oxygen transport. Nevertheless, iron can also be toxic by causing excessive oxidation. Meat iron exists in two forms: haem iron (in myoglobin) and non-haem iron, also called free iron. The total iron content and the ratio between haem and non-haem iron depend on animal species and muscle type (Lombardi-Boccia, Martinez-Dominguez, & Aguzzi, 2002; Min, Nam, Cordray, & Ahn, 2008). Both haem and non-haem iron are oxidation catalysts. Superoxide radical is produced during oxymyoglobin autoxidation (Sato & Shikama, 1981) and the metmyoglobin formed can react with hydrogen peroxide to give a ferryl-myoglobin radical (Kanner & Harel, 1985). Non-haem iron can react with oxygen to give the superoxide radical or its protonated form at low pH (the hydroperoxyl radical), and can react with hydrogen peroxide to give the hydroxyl radical. These reactions belong to the Fenton chemistry (Fenton, 1894). All these free radicals are the precursors of the cascade of reactions leading to lipid and protein oxidation during meat storage and cooking. The decrease of amino acid and fatty acid bioavailability has a negative effect on the nutritional value of meat. Moreover, besides less efficient assimilation, oxida-

tions may have a negative impact on human health because of the implication in colon cancer of certain aldehydes (malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal) produced during lipid oxidation (Guéraud et al., 2010), and aromatic amino acid oxidation products like indole and kynurenine (Chung & Gadupudi, 2011). The oxidative process, initiated during meat storage and cooking, can then develop during digestion. Indeed, the physicochemical conditions observed in the stomach, such as oxygen pressure, a high level of hydrogen peroxide and a low pH, favour the propagation of oxidation (Kanner & Lapidot, 2001; Nalini, Ramakrishna, Mohanty, & Balasubramanian, 1992). Moreover, the digestive tract is characterised by the enzymatic degradation of lipids and proteins, rendering fatty acids and amino acids more sensitive to free radical attack. In balanced meals, plant foods also provide iron, but its irreversible chelation with phytate almost completely blocks the generation of free radicals via Fenton reactions (Graf, Empson, & Eaton, 1987). Plant foods are also an important source of various antioxidants, like vitamins, polyphenols and carotenoids, while only a few are provided by meat, like thiols, antioxidant peptides (carnosine, anserine) and vitamin E.

In vitro digestion models are widely used to study the chemical changes, digestibility, and release of food components under simulated gastro-intestinal conditions. Such models provide a useful alternative to animal and human models, even if it is difficult to accurately simulate the complexity of the digestive tract. In this context, myoglobin has been used as an initiator of lipid peroxidation in a large number of gastric fluid models (Kanner & Lapidot,

* Corresponding author.

E-mail address: Philippe.gatellier@clermont.inra.fr (P. Gatellier).

2001; Kenmogne-Domguia, Meynier, Boulanger, & Genot, 2012; Lapidot, Granit, & Kanner, 2005). Nevertheless, the use of myoglobin in digestive oxidation models is questionable. Indeed, many factors can degrade myoglobin during meat processes and digestion. Meat is almost always cooked before consumption. Heating converts a large part of the myoglobin haem iron into insoluble haem iron (haematin) and accelerates in parallel the release of iron from haem (Purchas, Simcock, Knight, & Wilkinson, 2003). Kristensen and Purslow (2001) observed a decrease in haem iron content of 62% after heating meat at 80 °C for 2 h. Moreover, hydrogen peroxide, lipid peroxide, and their decomposition products, produced in large amounts in gastric fluid (Nalini et al., 1992), can degrade the protoporphyrin ring which releases the iron atom (Min et al., 2008; Nagababu & Rifkind, 2004). The low pH of the stomach favours this phenomenon. Therefore, through the Fenton reaction, non-haem iron is probably the most important catalyst in oxidation processes during digestion. Despite this, the ability of non-haem iron to generate oxygen free radicals under gastro-intestinal conditions remains poorly documented and has to be clarified to fully understand the oxidative process during digestion.

The aim of this study was to characterise, in an *in vitro* model system, the oxidative process initiated by non-haem iron under selected physicochemical conditions observable in the digestive tract, and with levels of oxidants and antioxidants, representative of a balanced meal. The production kinetics of oxygen free radicals (O_2^- , HO_2 and OH^*) were evaluated using specific chemical traps. Myofibrillar protein and lipid oxidation was determined and its impact on protein digestibility was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Measurement of free radical production

Free radical production was evaluated in a saline solution KCl/NaCl/CaCl₂ (2/120/6 mM) supplemented with 20 mM sodium phosphate. The pH was initially fixed at 3.5 to reflect the middle phase of the gastric digestion and raised to 6.5, by adding 0.16% (v/v) of 10 N NaOH, to reflect the intestinal phase. All the kinetics were evaluated for 2 h in each phase. The temperature was fixed at 37 °C. The initial concentration of dissolved oxygen at this temperature was 0.21 ± 0.01 mM (measured with a luminescent dissolved oxygen probe; HQ440d; Hach Company, Loveland, CO). Two concentrations (0.1 and 0.2 mM) of oxidant, consisting of an equimolecular mixture of ferrous iron (FeSO₄) and H₂O₂, were compared to a control without oxidant. The effect of antioxidants was tested by adding a mixture of Trolox C (water-soluble analogue of vitamin E) and plant antioxidants, including β -carotene and various polyphenols (caffeic acid, rutin, chlorogenic acid, and quercetin). Trolox C was used instead of vitamin E because of the precipitation of vitamin E in aqueous medium. This mixture of antioxidants reflects the different groups of antioxidants provided by a balanced meal. These antioxidants display various inhibiting effects on free radical production. Vitamin E scavenges lipid-derived free radicals, while carotenoids and polyphenols are more specific of hydroxyl and superoxide radicals. A stock solution ($\times 100$) of these antioxidants was prepared in methanol and each antioxidant was added at a final concentration of 0.01 mM. Free radical production was evaluated with two specific chemical traps. O_2^- and its protonated form (HO_2) were detected together by the reduction of nitroblue tetrazolium NBT (0.5 mM) to formazan (Auclair & Voisin, 1985). One mole of NBT reacts with two moles of radical to give one mole of formazan. The production of formazan was evaluated at 530 nm with an absorption coefficient of $12.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. NBT was purchased from Sigma-Aldrich (St

Louis, MO). Triton X 100 was added (at a concentration of 1/1000) to stabilise the insoluble formazan in its colloidal form. Absorbance measurements were performed on a Jasco V-770 spectrometer equipped with a Peltier temperature controller and a magnetic stirrer (Jasco, Tokyo, Japan). OH^* formation was evaluated by the hydroxylation of terephthalate (1 mM) into hydroxy-terephthalate (Saran & Summer, 1999). The level of hydroxy-terephthalate in the samples was determined by fluorescence spectroscopy ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm) and the comparison with a calibration curve performed in parallel with commercial hydroxy-terephthalate. The terephthalate and hydroxy-terephthalate were purchased from Sigma-Aldrich. The fluorescence measurements were performed on a Jasco FP-8300 spectrofluorometer equipped with a Peltier temperature controller and a magnetic stirrer. When the antioxidants were added, their absorbance or fluorescence was subtracted by measuring in parallel a control with antioxidants and the chemical traps but without oxidants.

2.2. *In vitro* digestion

To assess oxidation during digestion, the previous model (Section 2.1) was completed by adding myofibrils. Myofibrils were prepared from pork *rectus femoris* muscle after 5 days ageing at 4 °C under air-permeable film. Myofibril extraction was performed using the method of Pietrzak, Greaser, and Sosnicki (1997). We then checked that the myofibril preparations were free of haem iron by absorbance measurement of the Soret band at 410 nm. The myofibrillar protein concentration was evaluated by the biuret method (Gornall, Bardawill, & David, 1949) and the myofibrillar lipid concentration was evaluated by a Folch extraction (Folch, Lees, & Sloane-Stanley, 1957) followed by a gravimetric measurement. In the gastric phase (corresponding to the first two hours of incubation at pH 3.5) the myofibrillar protein and lipid concentrations were 7.71 and 2.05 mg/ml, respectively. Pepsin from porcine gastric mucosa (Sigma-Aldrich P6887) was added at a final concentration of 2 mg/ml (7400 units/ml). In the intestinal phase (after raising the pH to 6.5), porcine bile extract (Sigma-Aldrich B8631) and pancreatin from porcine pancreas (Sigma-Aldrich P7545) were added at the respective final concentrations of 8.81 and 0.52 mg/ml. The dilution of the different components (oxidants, antioxidants, proteins, and lipids) of the medium, due to the addition of NaOH, bile juice and pancreatin, was 29%. Incubations were performed at 37 °C under agitation. Aliquots taken at different times (0, 30, 60, 120, 150, 180, and 240 min) of incubation for biochemical analysis were immediately frozen at -80 °C and stored at the same temperature until use.

2.3. Oxidation measurement

Lipid oxidation was measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) method according to Lynch and Frei (1993). The results were expressed as nanomoles of malondialdehyde versus mg of lipids. Cysteine oxidation was evaluated by the decrease of free thiols. Free thiols were measured by a modification of Ellman's method using 2,2'-dithiobis(5-nitroimidazole) (DTNP) (Morzel, Gatellier, Sayd, Renerre, & Laville, 2006). The results were expressed as the percentage of the initial free thiols. Protein carbonyl groups were measured by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form protein hydrazones according to the method of Oliver, Alin, Moerman, Goldstein, and Stadtman (1987).

2.4. Proteolysis measurement

The level of proteolysis was determined by the fluorescamine-specific labelling of *N*-terminal α -amino groups of peptides and amino acids (Harkouss, Mirade, & Gatellier, 2012). The proteolysis index was expressed as the percentage ratio of the *N*-terminal α -amino group content (in glycine equivalent) to total protein content.

2.5. Statistical analysis

For each experimental condition, values are reported as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of 4 independent determinations. To assess the effects of oxidants or antioxidants, data were analysed by analysis of variance (ANOVA) with oxidants or antioxidants as independent variables and time as repeated variable. The Student *t*-test was used to determine the levels of statistical significance between groups when a significant effect of treatment was detected. Differences were considered as significant for $p < 0.05$. The relationships between the different parameters were assessed by calculating the Pearson correlation coefficients.

3. Results and discussion

3.1. Justification of the experimental conditions

These experiments were conducted under conditions representative of some of the physicochemical conditions observed in a bolus but of course they were not intended to be exhaustive for every condition observed with different meals. The buffer contained different salts representative of gastrointestinal osmolarity (Kenmogne-Domguia et al., 2012). Phosphate salt was added to reflect the buffer capacity of meat. pH 3.5 was representative of the pH in the stomach and pH 6.5 was chosen to represent the pH in the small intestine. Concentrations of iron of 0.1 and 0.2 mM were representative of the total iron in the Western diet. It is necessary to take into account that gastric juice also contains a significant amount of endogenous iron. Nalini et al. (1992) reported iron contents from 0.005 to 0.14 mM in human gastric juices after an overnight fast. Iron was added in its ferrous form because, due to the low pH and to a high level of endogenous ascorbate (from 0.003 to 0.12 mM), the stomach has a powerful ferric iron reducing capacity (Nalini et al., 1992). Ascorbate can also be provided in large quantities by plant foods. Although ascorbate is an unstable reducing agent, most iron is in its ferrous form in the stomach, at least at the beginning of the gastric digestion. In this study, we decided to add hydrogen peroxide at the same concentration as iron. Harel and Kanner (1985) estimated the production of H_2O_2 in ground turkey muscle at 0.045 mM/h at 37 °C and at pH 5.6. In addition to this exogenous H_2O_2 , the stomach also contains a high level of endogenous H_2O_2 . Nalini et al. (1992) found 0.2 mM of H_2O_2 in human gastric juice. When added, antioxidants were also at a realistic level (0.01 mM) in a mixture representative of different plant foods. In this model, myofibrils were chosen as the target of the free radicals, instead of the whole meat extract, to prevent interferences between haem and non-haem iron in the oxidative process and to prevent the effect of endogenous antioxidants. In raw meat, myofibrillar proteins represent almost 60% of total proteins. Cooking can increase this percentage, due to the loss of sarcoplasmic proteins in juice.

3.2. Free radical production

Fig. 1 shows the cumulative amount of $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ radicals trapped by NBT during incubation. In the control, without oxidant

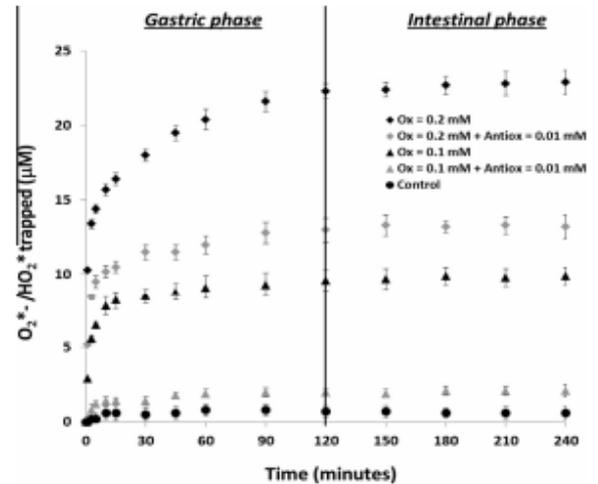


Fig. 1. Detection of superoxide/hydroperoxyl radicals with the NBT probe in the gastric and intestinal phases in the presence of different amounts of oxidants ($Ox = Fe^{2+}/H_2O_2$) and plant antioxidants (Antiox). Values are mean \pm SEM of four independent determinations.

(Fe^{2+}/H_2O_2), a low level of $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ was detected, which could correspond to the presence of iron traces in the buffer. A small amount of iron (0.74 μM) was measured in the same buffer by Promeprat (2013). The level of $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ detected increased significantly with time ($p < 0.001$) and with oxidant concentration ($p < 0.001$), with a significant interaction ($p < 0.001$) occurring between these two parameters. The level of radicals detected with 0.2 mM of oxidants was twice as high as with 0.1 mM. In a preliminary investigation (Gatellier et al., 2015), where oxidants and pH were tested over a wider range, we determined at the end of the gastric phase the following relation between the level of detected $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ and the pH and oxidant content:

$$[O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}] \text{ mM} = (0.195 - 0.025 \text{ pH}) \times [\text{Oxidants}]$$

This equation allows extrapolating the kinetics of $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ formation to physicochemical conditions that were not tested in this study.

The passage in the intestinal phase had little impact on the kinetics. Only a slight increase (around 3%) was observed in the intestinal phase in the presence of oxidants, demonstrating that considerably more free radicals were produced under gastric conditions than under intestinal conditions. This result can be explained by the rapid conversion of the ferrous iron into the less reactive ferric iron and to the rapid decomposition of H_2O_2 in the gastric phase.

Table 1
The main reactions implicated in Fenton chemistry (from the Promeprat PhD thesis, 2013).

1	$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + OH^{\cdot} + HO^{\cdot}$
2	$Fe(II) + O_2 \rightarrow Fe(III) + (O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot})$
3	$Fe(III) + H_2O_2 \rightarrow Fe(II) + H^{\cdot} + (O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot})$
4	$HO^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow H_2O + (O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot})$
5	$(O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}) + (O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}) \rightarrow H_2O_2 + O_2$
6	$Fe(III) + (O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}) \rightarrow Fe(II) + O_2 + H^{\cdot}$
7	$Fe(II) + (O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}) \rightarrow Fe(III) + H_2O_2$
8	$Fe(II) + (O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}) \rightarrow Fe(III) + HO_2^{\cdot}$
9	$Fe(II) + HO^{\cdot} \rightarrow Fe(III) + HO^{\cdot}$
10	$HO^{\cdot} + HO^{\cdot} \rightarrow H_2O_2$
11	$HO^{\cdot} + (O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}) \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Table 1 (from the Promeprat PhD thesis, 2013, carried out in our laboratory) lists the main reactions involved in iron-catalysed free radical chemistry. Many reactions can be derived from the reaction of ferrous iron with hydrogen peroxide (1), named the Fenton reaction, and this whole reaction system is called Fenton chemistry. The superoxide radical and its protonated form are mainly produced by the reaction of ferrous iron with dissolved oxygen according to reaction (2). The protonation/deprotonation equilibrium of the superoxide radical exhibits a pK_a of around 4.8. Consequently the protonated form was dominant in the gastric phase (95%) and in the minority (2%) in the intestinal phase. When the proportion of H_2O_2 is very high compared to iron, reactions (3) and (4) can also increase the level of the $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ radicals. These reactions can come into competition with many other reactions thereby decreasing $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ detected. A large fraction of $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ can disproportionate into hydrogen peroxide and oxygen according to reaction (5). Reaction (5) has an optimum pH at 4.8 and the yields of disproportionation are 15% and 17% at pH 3.5 and 6.5, respectively (Backer & Gebicki, 1984). $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ can also be deactivated by reaction with Fe^{3+} in a recycling reaction (6) or by reaction with excess Fe^{2+} (7 and 8). The superoxide radical has been described as only slightly reactive towards lipids and proteins. The kinetic constants of reactions of $O_2^{\cdot-}$ with biomolecules are generally lower than $10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ (Bielski, Arudi, & Sutherland, 1983; Schaich, 2005). Its implication in the oxidative process is mostly due to the combination of reactions (5) and (1), leading to the powerful oxidant hydroxyl radical (Schaich, 2005). Due to a higher oxido-reduction potential, the protonated form is described as being more reactive and can directly oxidise fatty acids with kinetic constants of about $10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ (Bielski et al., 1983; Schaich, 2005).

Fig. 2 shows the cumulative amount of OH^{\cdot} which had reacted with the terephthalate probe during incubation. In the control group without oxidants, a low level of OH^{\cdot} was observed, probably due, once again, to iron traces. As observed with the superoxide radical, the level of OH^{\cdot} detected increased significantly with time ($p < 0.001$) and with oxidant concentration ($p < 0.001$). Almost all OH^{\cdot} was produced in the first 20 min under all conditions. The pH change had little effect on the kinetics and only a slight increase (around 5.5%) was observed in the intestinal phase in the presence

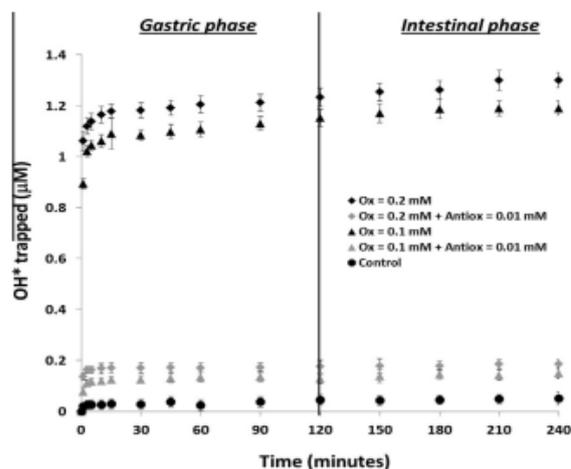


Fig. 2. Detection of hydroxyl radicals with the terephthalate probe in the gastric and intestinal phases in the presence of different amounts of oxidants ($Ox = Fe^{2+}/H_2O_2$) and plant antioxidants (Antiox). Values are mean \pm SEM of four independent determinations.

of oxidants. Once again, this result could be explained by the rapid decrease of the reactants in the gastric phase. The differences observed in OH^{\cdot} detection between the two oxidant-treated groups were less pronounced than with $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$. At the end of incubation, the 0.2 mM group exhibited a free radical content only 9.2% higher than that of the 0.1 mM group. Using another chemical trap, Nalini et al. (1992) observed similar production of OH^{\cdot} in human gastric juices after an overnight fast.

The hydroxyl radical can only be produced by the Fenton reaction (1), but its level is modulated by many reactions (4, 9, 10, and 11). Hydroxyl radicals are very reactive towards lipids and proteins. For example, kinetic constants from $4 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ and $1.1 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ were reported with cysteine and linoleic acid, respectively (Gardès-Albert & Jore, 2005). Figs. 1 and 2 show that OH^{\cdot} was trapped in a lower amount than $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ but, due to the difference in the kinetic constants, OH^{\cdot} was probably the main initiator of oxidation in our model.

The mixture of antioxidants tested in this study significantly decreased ($p < 0.001$) the detection of all the oxygen free radicals, whatever the level of oxidants used (Figs. 1 and 2). This decrease can be attributed to the competition between the antioxidants and the chemical traps (NBT and terephthalate) regarding the free radicals. Polyphenols are also iron-chelating agents and can thus decrease iron reactivity. However, as observed previously, when used separately, β -carotene and the different polyphenols enhance the production of superoxide radicals (Gatellier et al., 2015). This phenomenon was attributed to the iron-reducing capacity of these antioxidants, which can reactivate the Fenton chemistry. In this previous study, Trolox C was the only antioxidant able to reduce the production of superoxide radicals. This contrasting effect observed in the two studies demonstrates that the pro- or antioxidant activities assigned to these molecules are dependent on the composition of the medium.

3.3. Lipid oxidation

Fig. 3 shows the evolution of the amount of TBA-RS during incubation. A significant effect of oxidants ($p < 0.001$) and time ($p < 0.001$) on the level of TBA-RS was observed with a significant interaction between these two parameters ($p < 0.001$). In the gastric phase, the control group exhibited only a slight increase of

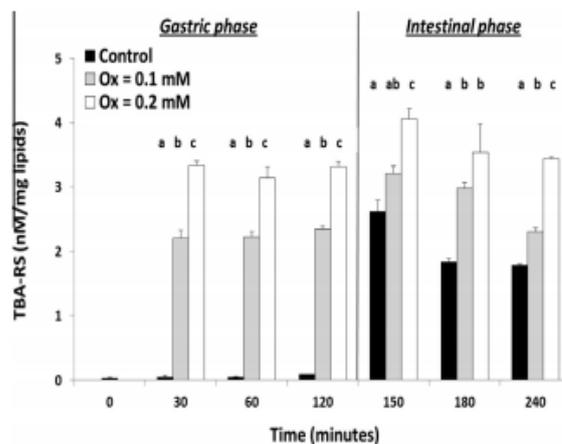


Fig. 3. Evaluation of myofibrillar lipid oxidation in the gastric and intestinal phases in the presence of different amounts of oxidants ($Ox = Fe^{2+}/H_2O_2$). Values are mean \pm SEM of four independent determinations. For each time, values not bearing common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

TBA-RS while the two oxidant-treated groups exhibited a large and rapid increase of myofibrillar lipid oxidation. This increase was more pronounced with the higher level of oxidants and, in the gastric digestion, the three groups exhibited significant differences. This evolution of lipid oxidation in the gastric phase may be related to the detection of oxygen free radicals (Figs. 1 and 2). An excellent correlation coefficient was observed in this gastric phase between TBA-RS and the levels of O_2^-/HO_2^+ ($r = 0.95$, $p < 0.001$) and between TBA-RS and the levels of OH^* ($r = 0.97$, $p < 0.001$). The passage in the intestinal phase was marked by a large increase of TBA-RS in the control group, while the two oxidant-treated groups displayed only a slight increase. We have no clear explanation for this sudden increase with the increase of pH in the control group. Perhaps severe lipolysis in the intestinal phase rendered the fatty acids more sensitive to the low free radical production observed in this control group. After 180 min incubation, a slight decrease of TBA-RS was observed in all groups. This biphasic evolution of TBA-RS was observed during meat cooking (Gatellier, Santé-Lhoutellier, Portanguen, & Kondjoyan, 2009). The initial increasing phase corresponded to the accumulation of aldehydes, essentially malondialdehyde and hydroxynonenal, which have been described as the resulting end products of polyunsaturated fatty acid oxidation in meat (Gray & Monahan, 1992; Sakai, Kuwazuru, Yamauchi, & Uchida, 1995). For long incubations, the decrease in the TBA value indicated an interaction of these aldehydes with the free amino groups or the free thiol groups of proteins, preventing their reaction with TBA (Gatellier, Kondjoyan, Portanguen, & Santé-Lhoutellier, 2010). Such interactions have been identified as the major cause of protein aggregation in cooked meat (Promeyrat et al., 2010). Despite this, the correlations measured, on the overall kinetic, between TBA-RS and the level of free radicals remained highly significant ($r = 0.82$, $p < 0.001$ for TBA-RS and O_2^-/HO_2^+ , and $r = 0.85$, $p < 0.001$ for TBA-RS and OH^*).

ANOVA revealed a significant protective effect ($p < 0.001$) of antioxidants when incubations were performed in the presence of 0.2 mM of oxidants (results not shown). In this case, the antioxidants led to a significant reduction of the TBA-RS of 45% at the end of gastric digestion and to a significant reduction of 55% at the end of intestinal digestion. The ANOVA did not reveal a significant effect of antioxidants in the presence of 0.1 mM of oxidants, perhaps due to the lower magnitude of TBA-RS development under this condition. Nevertheless, in this case we observed a 40% decrease of TBA-RS at the end of gastric digestion. We attribute this protective effect to the lower production of free radicals in the presence of antioxidants, as observed in Figs. 1 and 2. These results agree with those previously reported in the gastric environment, showing a protective effect of polyphenols against metmyoglobin-induced lipid oxidation (Kanner & Lapidot, 2001).

3.4. Free thiol oxidation

The susceptibility of myofibrillar proteins to oxidation was monitored by estimating the free thiol groups (Fig. 4). In proteins, free thiols originated from cysteine. An ANOVA showed a significant effect of oxidants ($p = 0.003$) and time ($p < 0.001$) on the level of free thiols, with considerable interaction between them ($p < 0.001$). The decrease of free thiols, widely initiated in the gastric phase, continued in the intestinal phase. In the latter phase, the proteins of the two oxidant-treated groups always had significantly lower free thiol levels than the proteins of the control group. The correlations observed between the levels of free thiols and O_2^-/HO_2^+ ($r = -0.41$, $p < 0.01$) and between the levels of free thiols and OH^* ($r = -0.44$, $p < 0.01$) were lower than those previously observed between lipid oxidation and free radicals. A substantial time lag between free radical production, especially OH^* production, and the decrease of free thiols was observed. After 30 min,

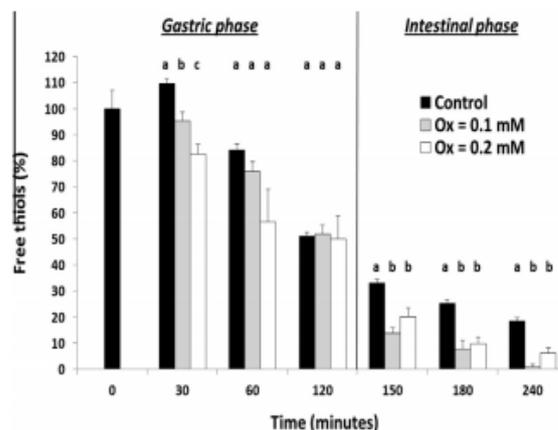


Fig. 4. Evaluation of myofibrillar protein oxidation in the gastric and intestinal phases in the presence of different amounts of oxidants ($Ox = Fe^{2+}/H_2O_2$). Values are mean \pm SEM of four independent determinations. For each time, values not bearing common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

OH^* production had already reached its maximum, whereas the thiols were still not oxidised. This result clearly shows that OH^* acts only as a precursor of the oxidative reactions leading to the decrease of thiols. Other radicals, which were not analysed in this study, like radicals stemming from lipid peroxidation (L^* , LO^* , and LOO^*) could be implicated in thiol oxidation, leading to the formation of disulfide bridges. Moreover, free thiols could react with the aldehyde products of lipid peroxidation preventing their reaction with the DTNP probe. This hypothesis was confirmed by the inverse correlation ($r = -0.66$, $p < 0.001$) observed between the content of free thiol groups and the level of TBA-RS. The formation of disulfide bridges as well as the interaction of free thiols with aldehydes can promote protein aggregation (Promeyrat et al., 2010).

Contrary to the results observed for lipid oxidation (Section 3.3), no significant effect of antioxidants was observed on the free thiol levels (results not shown). We have no explanation for this lack of antioxidant effect on the free thiols, but this result was in good agreement with our previous studies showing that an animal diet rich in antioxidants protected lipids from oxidation but not proteins, likewise during refrigerated meat storage (Santé-Lhoutellier, Engel, & Gatellier, 2008) and during *in vitro*-induced oxidation (Mercier, Gatellier, & Renner, 2004).

3.5. Protein carbonylation

For the sake of brevity the kinetics of protein carbonylation are not displayed and the results are discussed succinctly. ANOVA showed a significant effect of oxidants ($p < 0.001$) on the level of protein carbonyls only when the control group was compared to the 0.2 mM-oxidant group. In this case, the oxidants led to carbonyl overproduction of 78% at the end of the gastric digestion and 46% at the end of the intestinal phase. As observed with free thiols no significant effect of antioxidants was noted.

In meat, the oxidation of numerous amino acids leads to protein carbonylation (Estévez, 2011). Among these, basic amino acids (lysine, histidine, and arginine) and threonine are essential for humans and their oxidation leads to a large decrease in the nutritional value of meat. Protein carbonyls can react with free amino groups of non-oxidised lysine to form Schiff bases (Estévez, 2011) and this reaction is also a major cause of protein aggregation.

3.6. Proteolysis of the myofibrillar proteins

ANOVA showed a significant effect of oxidants ($p = 0.037$) and time ($p < 0.001$) on proteolysis with a significant interaction between them ($p < 0.001$). Fig. 5 shows a stepped increase of proteolysis. In the gastric phase, the levels of proteolysis observed from the first 30 min of incubation almost reached their maximum value. The extent of proteolysis was lower in the 0.2 mM oxidant-treated group while no difference was observed between the two other groups. The passage in the intestinal phase led to a rapid increase of proteolysis, especially in the control group, without subsequent changes. The gastro-intestinal model used in this study allowed a better understanding of the interactions between protein oxidation and digestion. After 180 min of incubation, proteolysis was significantly higher in the control group than in the two oxidant-treated groups. These results clearly show the negative impact of oxidative stress on proteolysis efficiency. Protein aggregation due to amino acid oxidation and complexation of protein with aldehydes of lipid peroxidation is known to be the major cause of lower susceptibility to proteolysis (Santé-Lhoutellier, Aubry, & Gatellier, 2007). The implication of these two phenomena in the decrease of proteolysis can be supported by the significant correlations obtained, at the end of incubation (240 min), between proteolysis and TBA-RS ($r = -0.76$, $p < 0.001$) and, to a lesser extent, between proteolysis and free thiol content ($r = 0.60$, $p < 0.05$). No significant correlation was obtained with carbonyls. However, it should be stressed that proteases, added in the model, are sensitive to the oxidative process. This could explain the stepwise evolution observed in the two phases with early intensive proteolysis followed by a slowdown of proteolytic activity due to enzyme oxidation. Proteolysis probably increases more smoothly *in vivo* because of the continuous production of digestive juices in the stomach and intestine. In the present study, it was not possible to make allowances for the myofibrillar protein changes or for the degradation of proteases in the reduction of proteolysis observed in the presence of oxidants.

ANOVA revealed a significant effect ($p < 0.001$) of antioxidants on proteolysis only when incubations were performed in the presence of 0.2 mM of oxidants (results not shown). In this case antioxidants led to a 98% increase of proteolysis at the end of gastric digestion and to an 89% increase at the end of intestinal digestion.

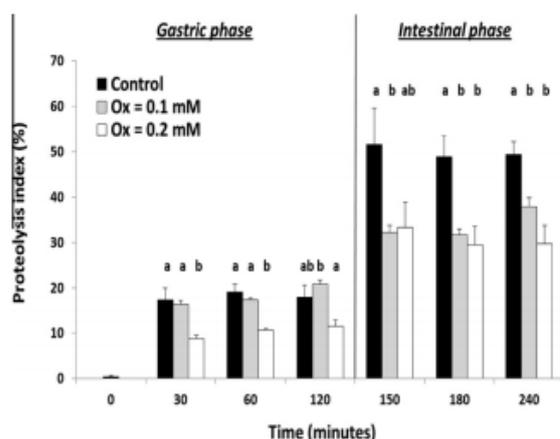


Fig. 5. Evaluation of proteolysis in the gastric and intestinal phases in the presence of different amounts of oxidants (Ox = $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$). Values are mean \pm SEM of four independent determinations. For each time, values not bearing common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

With 0.1 mM of oxidants only a slight and non-significant increase of proteolysis of 17%, due to antioxidants, was observed at the end of the gastric phase. This observation could be connected to the similar effect of antioxidants on TBA-RS, showing a protective effect only in the 0.2 mM oxidant-treated group.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this study was the first to investigate free radical production initiated by non-haem iron under mimetic gastrointestinal conditions. This study clearly showed that the free radical detection techniques presented could lead to better understanding of the major biochemical processes taking place during human digestion. Fenton chemistry is complex and capable of generating superoxide, hydroperoxyl, and hydroxyl radicals and different iron oxidation states. The mechanism and how it is affected by different antioxidants and the interpretation of results obtained in biological systems are still under debate in the literature. To better understand this process in meat products and predict oxidations under different conditions, we are developing, in parallel, a mathematical model to simulate Fenton chemistry. When completed, this mathematical tool will allow extrapolating the kinetic results to different conditions that exist in practice during meat processes and meat digestion, in order to provide recommendations for food associations.

Conflict of interest

There are no conflicts of interest.

Acknowledgement

This study was supported by the CEPIA department of the INRA institute.

References

- Auclair, C., & Voisin, E. (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In R. A. Greenwald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 123–132). Boca Raton, FL, USA: CRC Press Inc.
- Backer, M. S., & Gebicki, J. M. (1984). The effect of pH on the conversion of superoxide to hydroxyl free radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 25, 234–258.
- Bielski, B. H., Arudi, R. L., & Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO_2/O_2 with unsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 4759–4761.
- Chung, K. T., & Gadupudi, G. S. (2011). Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52, 81–104.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, 89, 259–279.
- Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899–911.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Gardès-Albert, M., & Jore, D. (2005). Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In *Radicaux libres et stress oxydant* (pp. 1–22). Tec & Doc, Editions Médicales Internationales, Lavoisier Eds.
- Gatellier, P., Meynier, A., Dufour, C., Caris, C., Goupy, P., Daudin, J. D., et al. (2015). Characterisation of the free radical chemistry in physicochemical conditions of the digestive tract. In *61th International Congress of Meat Science and Technology*, Clermont-Ferrand, France (pp. 254).
- Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S., & Santé-Lhoutellier, V. (2010). Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. *Meat Science*, 85, 645–650.
- Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., Portanguen, S., & Kondjoyan, A. (2009). Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. *Meat Science*, 83, 651–656.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177, 751–766.
- Graf, E., Empson, K. L., & Eaton, J. W. (1987). Phytic acid. A natural antioxidant. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 11647–11650.

- Gray, J. L., & Monahan, F. J. (1992). Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 3, 315–324.
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Fekl, P. M., Huc, L., et al. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research*, 44, 1098–1124.
- Harel, S., & Kanner, J. (1985). Muscle membranal lipid peroxidation initiated by H2O2 activated metmyoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 1188–1192.
- Harkouss, R., Mirade, P. S., & Gatellier, P. (2012). Development of a rapid, specific and efficient procedure for the determination of proteolytic activity in dry-cured ham: Definition of a new proteolysis index. *Meat Science*, 92, 84–88.
- Kanner, J., & Harel, S. (1985). Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237, 314–321.
- Kanner, J., & Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical in Biology and Medicine*, 31, 1388–1395.
- Kenmogne-Domguia, H. B., Meynier, A., Boulanger, C., & Genot, C. (2012). Lipid oxidation in food emulsion under gastrointestinal simulated conditions: The key role of endogenous tocopherol and initiator. *Food Digestion*, 3, 46–52.
- Kristensen, L., & Purslow, P. P. (2001). The effect of processing temperature and addition of mono- and di-valent salts on the haem- nonhaem-iron ratio in meat. *Food Chemistry*, 73, 433–439.
- Lapidot, T., Granit, R., & Kanner, J. (2005). Lipid hydroperoxidase activity of myoglobin and phenolic antioxidants in simulated gastric fluid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3391–3396.
- Lombardi-Boccia, G., Martinez-Dominguez, B., & Aguzzi, A. (2002). Total haem and non-haem iron in raw and cooked meats. *Journal of Food Science*, 67, 1738–1741.
- Lynch, S. M., & Frei, B. (1993). Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low-density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 34, 1745–1751.
- Mercier, Y., Gatellier, P., & Renere, M. (2004). Lipid and protein oxidation *in vitro*, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, 66, 467–473.
- Min, B., Nam, K. C., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2008). Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *Journal of Food Science*, 73, 439–446.
- Morzel, M., Gatellier, Ph., Sayd, T., Renere, M., & Laville, E. (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science*, 73, 536–543.
- Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2004). Haem degradation by reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6, 967–978.
- Nalini, S., Ramakrishna, B. S., Mohanty, A., & Balasubramanian, K. A. (1992). Hydroxyl radical formation in human gastric juice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 7, 497–501.
- Oliver, C. N., Alin, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., & Stadtman, E. R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488–5491.
- Pietrzak, M., Greaser, M. L., & Sosnicki, A. A. (1997). Effect of rapid rigor mortis processes on protein functionality in pectoralis major muscle of domestic turkeys. *Journal of Animal Science*, 75, 2106–2116.
- Promeyrat, A. (2013). *Analyse et modélisation des mécanismes à l'origine des modifications des protéines lors du chauffage du tissu musculaire*. Thesis of the University of Clermont-Ferrand, Doctoral school of Sciences de la Vie et de la Santé.
- Promeyrat, A., Gatellier, P., Lebret, B., Kajak-Siemaszka, K., Aubry, L., & Sante-Lhoutellier, V. (2010). Evaluation of protein aggregation in cooked meat. *Food Chemistry*, 121, 412–417.
- Purchas, R. W., Simcock, D. C., Knight, T. W., & Wilkinson, B. H. P. (2003). Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 827–837.
- Sakai, T., Kuvazuru, S., Yamauchi, K., & Uchida, K. (1995). A lipid peroxidation derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal and ω6 fatty acids contents in meats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1379–1380.
- Santé-Lhoutellier, V., Aubry, L., & Gatellier, P. (2007). Effect of oxidation on *in-vitro* digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5343–5348.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., & Gatellier, P. (2008). Assessment of the influence of diet on lamb meat oxidation. *Food Chemistry*, 109, 573–579.
- Saran, M., & Summer, K. H. (1999). Assaying for hydroxyl radicals. Hydroxylated terephthalate is a superior fluorescence marker than hydroxylated benzoate. *Free Radical Research*, 31, 429–436.
- Satoh, Y., & Shikama, K. (1981). Autoxidation of oxymyoglobin. A nucleophilic displacement mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 10272–10277.
- Schaich, K. M. (2005). Lipid oxidation: Theoretical aspects. In Fereidoun Shahidi (Ed.), *Bailey's industrial oil and fat products* (pp. 269–355). Hardcover Eds.

Discussion générale

V. Discussion générale

Les procédés de conservation, de transformation et la digestion de la viande se caractérisent par l'oxydation des protéines et des lipides, entraînant entre autre une perte de la qualité nutritionnelle des produits carnés. Le fer, en interaction avec l'oxygène ou les peroxydes, conduit à la production de radicaux libres initiateurs de ces oxydations. De ce fait, l'objectif de ce travail était de comprendre les effets des conditions physicochimiques et les mécanismes gouvernant la phase d'initiation des oxydations caractérisée par la formation des radicaux libres. L'approche adoptée utilisant en association des expérimentations sur un milieu modèle bien contrôlé et la modélisation mathématique a permis de comprendre le fonctionnement du milieu expérimental et de prédire de manière satisfaisante l'effet de la composition et des conditions physico-chimiques sur les phénomènes oxydatifs dans la viande. Ce travail de modélisation de la phase d'initiation des oxydations dans la viande est novateur et s'inscrit dans la continuité de la thèse d'Aurélié Promeprat. En effet, à notre connaissance, aucune étude similaire n'a été réalisée sur des matrices carnées.

Etudier la phase d'initiation des oxydations consiste dans notre cas à étudier la chimie de Fenton. Plusieurs domaines se sont intéressés à la production des radicaux libres par la chimie de Fenton tel que la biologie médicale et les traitements des eaux usées (Zhuang *et al.*, 2016 ; Munoz *et al.*, 2016 ; Abou-Elela *et al.*, 2016 ; Garcia-Segura *et al.*, 2016 ; Giannakis *et al.*, 2017). Mais, le pH utilisé pour le traitement des eaux usées est acide, pour une meilleure efficacité de production des (HO°). En outre, la composition chimique des eaux usées est complètement différente de celle de la viande (teneur en phosphate, en sulfate...). L'ensemble de ces différences rendent l'exploitation des paramètres cinétiques tels qu'ils sont décrits dans ces études difficile.

Par ailleurs, des études ont été menées sur la viande afin de caractériser l'impact des traitements thermiques sur sa qualité nutritionnelle (Astruc *et al.*, 2007 ; Chelh *et al.*, 2006 ; Filgueras *et al.*, 2011 ; Gatellier *et al.*, 2009 ; Ganhão *et al.*, 2010 ; Gatellier *et al.*, 2010 ; Haak *et al.*, 2006 ; Jongberg *et al.*, 2011 ; Kajak-Siemaszko *et al.*, 2011 ; Promeprat *et al.*, 2010 ; Bax M-L *et al.*, 2012).

Dans ces études, les effets observés sur la viande étaient affectés par la variabilité biologique des échantillons. Par ailleurs, du fait de sa composition, les phénomènes d'oxydation dans la viande sont extrêmement complexes et plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine des oxydations du fer et des changements physicochimiques des protéines et des lipides. Par

exemple, les oxydations des lipides et de la myoglobine sont fortement liées et favorisent l'oxydation et l'agrégation des protéines (Batifoulier *et al.*, 2002 ; Lund *et al.*, 2011 ; Faustman *et al.*, 2003 ; Sun *et al.*, 2010). En plus, les oxydations des lipides augmentent lors de la conservation. D'autre part, le lien entre la teneur en fer (héminique et non héminique) et l'oxydation des lipides n'a pas pu être démontré (Purohit *et al.*, 2015). Il s'avère donc qu'il est difficile de découpler ces phénomènes oxydatifs dans la viande.

C'est pourquoi, un modèle mimétique de la viande a été utilisé pour caractériser et quantifier l'effet des paramètres physicochimiques et des concentrations des réactants associés aux procédés de conservation et de transformation sur la production des radicaux libres. Ce modèle expérimental a permis une analyse plus précise qu'avec le tissu musculaire des mécanismes à l'origine de l'oxydation du fer et la production des radicaux superoxydes et hydroxyles. Cette analyse a permis, le développement d'un modèle mathématique stœchio-cinétique de prédiction des phénomènes se produisant dans le modèle mimétique en fonctions des différentes conditions physico-chimiques : concentrations des réactants, température, pH, force ionique... Pour ce faire, la majorité des expérimentations a été effectuée sur un modèle mimétique tamponnée à pH 6 dans lequel le fer ainsi que d'autres composés (H_2O_2) ont été ajoutés, en concentrations physiologiques. La maîtrise des conditions expérimentales dans ce modèle mimétique a permis d'ajuster la valeur de certains paramètres inconnus du modèle mathématique.

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature pour détecter les radicaux superoxydes et hydroxyles dont la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). Or, cette méthode est applicable lorsque les radicaux libres sont produits en quantités relativement élevées et est plus adaptée à des milieux complexes.

Pour l'étude des cinétiques dans un milieu simple, la méthode des sondes est plus adéquate. Dans cette étude, le NitroBlueTetrazolium (NBT) a été choisi pour sa spécificité aux radicaux superoxydes, sa solubilité dans l'eau, sa stabilité thermique (Altman, 1976). D'autre part, son mécanisme de réaction avec l'anion ($O_2^{\circ -}$) est connu.

Dans cette étude, la sonde qui a été choisie pour détecter les radicaux hydroxyles est le téréphtalate (TP). Il s'agit d'une sonde aromatique cyclique fluorogène utilisée dans des milieux biologiques et est considérée spécifique et sensible au (HO°). La fixation du (HO°) sur un cycle aromatique induit la formation d'un seul et même produit, 2-hydroxytéréphtalate (HTP). Il a été vérifié que le TP se dégrade, en présence d' H_2O_2 à 75°C.

La première série d'expériences mesurées sur un milieu mimétique de la viande a permis d'évaluer l'incidence des différentes conditions physico-chimiques et celle des principaux composés pro- ou antioxydants de la viande (fer, peroxyde d'hydrogène et AO) sur la production des radicaux libres. Cette étude a permis d'identifier :

un effet de la température et de la concentration des réactants sur la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles dont la production est essentiellement liée aux concentrations initiales des métaux et des catalyseurs d'oxydation (Fe II, H₂O₂, O₂) ;

une incidence des complexes du Fe II et du Fe III sur la vitesse de production des radicaux libres. ;

un effet promoteur ou inhibiteur des antioxydants, sur la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles.

Ces conclusions étaient comparables avec les résultats obtenus dans des conditions à peu près similaires par Bouasla *et al.* (2012). Les cinétiques de production des radicaux hydroxyles étaient caractérisées par 2 phases : une phase rapide suivie d'une phase lente. La phase rapide pourrait s'expliquer par une oxydation très rapide des complexes de Fe II les plus réactifs, tant dis que la diminution de la vitesse de production du (HO°) serait due à l'oxydation des complexes de Fe II les moins réactifs et à la réduction du Fe III précipité par H₂O₂ (Kwan *et al.*, 2002).

Les effets des AO (enzymes, peptides, vitamines, polyphénols et caroténoïdes) sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles observés dans cette études sont également en accord avec la littérature (Gatellier *et al.*, 2004 ; Mercier *et al.*, 2001 ; Thérond & Bonnefont-Rousselot., 2005 ; Decker *et al.*, 2000 ; Ngapo & Gariépy, 2008 ; Purchas *et al.*, 2004 ; Khalil *et al.*, 2002 ; Polyakov *et al.*, 2001).

À basse température, les densités optiques DO mesurées étaient proches du bruit de fond. Lors de sa conversion en concentration en formazan, une faible variation de cette DO implique des différences importantes et entraîne également des écarts types élevés.

D'autre part, certains AO tels que le glutathion et l'asocorbate réduisent le NBT. Ce phénomène a été pris en compte avec un témoin adéquat mais ceci n'exclut pas une imprécision des résultats finaux.

Dans notre étude, nous nous sommes également intéressés aux effets du chlorure et du pH sur la production des radicaux superoxydes et hydroxyles. D'après la littérature, les ions chlorures sont oxydés par H₂O₂ formant ainsi des radicaux chlorures. Ceux-ci réagissent avec le Fe²⁺ au détriment des autres oxydants du milieu (O₂, H₂O₂) (Jayson *et al.*, 1973 ; Yu et Back, 2003 ;

Delaat *et al.*, 2004). Nos mesures ont montré, conformément à la littérature, une baisse de la production des radicaux libres lorsque la concentration en chlorure croît.

Enfin, les mesures en fonction du pH confirment le lien entre la production des radicaux hydroxyles et la conversion $O_2^{\circ-}/HO^{\circ}$ décrit par Backer (1984). L'évolution biphasique du taux d' OH° piégés avec le pH (un taux très faible à pH 3,5 qui augmente considérablement à pH 5 et rechute à pH 6,5). Ce phénomène s'explique par la conversion d'une partie des radicaux superoxydes en radicaux hydroxyles (Backer et Gebicki ; 1984 et 1986).

La formation des radicaux libres, observée dans le milieu mimétique de la viande a été modélisée en réalisant une description la plus complète possible de ces phénomènes complexes par un ensemble d'équations aux dérivées ordinaires. La construction du modèle a nécessité une analyse bibliographique qui a permis de (a) réviser le schéma réactionnel de la chimie de Fenton, et proposer ceux relatifs aux sondes NBT et TP et aux antioxydants (b) cerner les valeurs des k et E_a les plus incertaines des réactions du système Fenton, (c) ajouter au modèle précédent des fonctions pour tenir compte de la dépendance des constantes k vis-à-vis du pH de certaines réactions du modèle (d) introduire le concept de réactivité du fer en s'appuyant sur les études relatives à la complexation et à la précipitation du fer en solutions aqueuses. Cette analyse de la bibliographie a malheureusement souvent été limitée par le fait que : (1) de nombreuses études portent sur des réactions apparentes qui combinent plusieurs réactions élémentaires, (2) les valeurs des constantes de vitesse étaient déterminées dans des conditions d'oxygénation, de pH et dans des milieux tampons qui ne reflétaient pas la composition de la viande. Enfin les études de la littérature ont souvent été effectuées à une seule température (en général à température ambiante), ce qui ne permettait pas de connaître la valeur de l'énergie d'activation. Un recueil de valeurs consolidées des constantes de vitesse a toutefois pu être établi pour la majorité des réactions élémentaires du modèle, un intervalle de valeurs étant proposé dans le cas où la littérature était la plus incertaine.

Le modèle retenu comprend 6 réactions élémentaires du cycle redox du fer, 5 réactions inter-radicalaires et des réactions relatives aux deux sondes NBT (2 réactions bilan) et TP (7 réactions élémentaires). Le modèle a été complété par le schéma réactionnel de chacun des antioxydants AO ajouté. Nous avons également introduit la loi de Henry, la fonction pH et les coefficients de réactivité du fer pour prendre en compte les impacts de l'oxygène, du pH et de l'évolution des complexes et de la réactivité du fer dans le milieu.

Une première étude de sensibilité a permis d'identifier les valeurs de k et des E_a les plus influentes et d'évaluer l'impact de la variation des valeurs des coefficients de réactivité du Fe

II et du Fe III (P2 et de P3) sur les cinétiques de production du formazan et du HTP. Les valeurs incertaines des constantes réactionnelles k et des énergies d'activation E_a ainsi que des P2 et P3 ont ensuite été ajustées en utilisant des algorithmes basés sur des méthodes de recherche de minima locaux (méthodes de minimisation des gradients).

Un des points clés dans le déroulement des réactions de Fenton est la réactivité du fer, qui doit prendre en compte la formation des complexes de fer en solution aqueuse et les phénomènes de précipitation. Les résultats de la littérature sur la complexation du Fer II, comme ceux de Morgan *et al.* (2007), ne sont pas extrapolables au milieu mimétique de la viande, car ils ont été obtenus dans des solutions aqueuses très diluées de composition très différente de celle du milieu mimétique (teneur en phosphate...). Nous avons donc tenté d'estimer expérimentalement la quantité de fer précipité en filtrant notre milieu modèle. Les résultats montrent qu'une très grande partie du fer est insoluble lorsque le pH est égal à 6. Le logiciel Minteq qui permet de simuler les équilibres thermodynamiques des différentes espèces en solution a alors été utilisé pour aller plus loin. Les résultats simulés montrent que dans notre milieu modèle la quantité de fer insoluble augmentait très fortement lorsque la valeur du pH variait de 3 à 6. A pH 6 la totalité du Fe III était insoluble et seuls 5% de la concentration en Fe II était soluble. Une augmentation de la valeur du pH de 3 à 6 s'accompagnait aussi d'une variation de la proportion des différentes formes de complexes de fer solubles. L'ensemble de ces résultats prouvait que dans notre milieu mimétique de viande (tampon phosphate et pH 6) la quantité de fer réactif devait toujours être bien inférieure à la concentration en fer ajoutée. Une première phase d'optimisation des paramètres P2 et P3 a abouti à une valeur de ces paramètres d'environ 0,05. Ceci correspond pour P2 à la fraction de Fe II soluble à pH 6, tandis qu'une valeur identique pour P3 signifie qu'une fraction du Fe III précipité reste réactive.

L'introduction de ces valeurs de P2 et P3 dans le modèle et la recherche de « valeurs optimales » pour les constantes de vitesse des réactions 2, 5 et 10 conduit à une cohérence entre les concentrations en formazan et en HTP simulées et mesurées après 30 minutes d'expérience. Les différences entre modèle et expérience sont plus marquées pour les temps expérimentaux les plus courts, pour les concentrations en Fer les plus élevées, et pour les températures les plus extrêmes de notre plan expérimental. Il est également difficile de simuler avec précision à la fois les cinétiques de production de formazan et de HTP en utilisant le même jeu de paramètres. Ces écarts pour la réaction de Fenton entre les résultats simulés et expérimentaux peuvent avoir plusieurs causes potentielles. Le fait que les écarts évoluent au cours du temps pourraient être liés à une variation de la réactivité des formes de fer dans le milieu. La difficulté à simuler en

même temps la formation de formazan et d'HTP a plusieurs explications possibles. Chacun de ces composés est une sonde introduite en solution pour piéger respectivement les radicaux superoxydes et hydroxyles dont la formation mets en jeux des réactions propres à la sonde avec des constantes de vitesse parfois mal connues. La formation des deux types de radicaux n'est également peut-être pas sensible de la même manière aux différents complexes du Fe II ou du Fe III en solution. Cela plaiderait alors pour des valeurs de P2 et de P3 légèrement différentes pour chacun des radicaux.

Enfin le fait que les écarts entre simulations et expériences soient plus importants à 4°C et à 60°C qu'à 25°C ou 30°C pourraient être dû à ce que les énergies d'activation de certaines réactions comme les réactions radicalaires ont été négligées lors de nos simulations. La sensibilité des résultats à cette hypothèse mériterait sans doute d'être testée. Une évolution de la réactivité du Fer à la température pourrait être également une explication aux écarts constatés. Pour progresser plus avant dans ces hypothèses des études de sensibilité et d'identification des différents paramètres pourraient être faites en considérant séparément chacun des types de radicaux et en faisant varier la réactivité du fer en fonction du temps et/ou de la température. Les énergies d'activation de certaines réactions négligées jusqu'alors pourraient être réintroduites dans le modèle. Des techniques mathématiques plus sophistiquées d'identification de la valeur des paramètres pourraient également être utilisées (algorithme génétique, avec visualisation du front de Pareto...).

D'un point de vue expérimental, par exemple, des mesures du fer soluble dans un système expérimental simplifié composé des réactifs de Fenton, en solution dans le tampon phosphate à pH 6, en utilisant un filtre dont le diamètre des pores est de 0,02µm comme ça été fait par (Kwan *et al.*, 2002). Ce filtre plus fin permettrait de piéger d'autres complexes de fer insolubles tel que les agrégats colloïdaux et d'obtenir une dynamique plus précise de l'évolution du fer soluble au cours du temps. Une autre technique (Stop-Flow) peut être utilisée pour obtenir plus de précision sur les pentes à temps très courts notamment pour des concentrations élevées en réactants (H₂O₂) et pour des fortes températures (60°C...). Cet instrument à débit interrompu est un dispositif de mélange rapide utilisé pour étudier la cinétique chimique des réactions rapides en solution.

L'intégration des réactions élémentaires liées à l'ajout de chacun des AO dans le milieu mimétique a conduit dans un certain nombre de cas à une adéquation entre les résultats simulés et les résultats expérimentaux. Le modèle rend bien compte du pouvoir inhibiteur de la catalase, la carnosine et du GSH sur la production d'HTP. Le modèle rend également compte de l'effet

promoteur de l'ensemble des AOs sur la formation du formazan à l'exception de la SOD. La précision des prédictions dépend de la nature de l'AO. Le modèle rend partiellement compte des changements des effets des AO dus à la variation de la température. Les inadéquations entre les résultats mesurés et calculés des AO seraient principalement liées aux incertitudes des constantes réactionnelles trouvées dans la littérature et à des simplifications du schéma réactionnel de chacun des AO.

D'un point de vue pratique le travail effectué dans cette thèse permettra de simuler la formation des radicaux superoxydes et hydroxyles issus de la présence du fer libre et de la chimie de Fenton. Dans la viande la présence de fer libre s'accompagne de celle du fer héminique contenu dans la myoglobine. Les réactions d'oxydation de la myoglobine seront ajoutées à celles de Fenton pour prédire l'évolution des viandes. Des expériences ont déjà été effectuées en milieu liquide pour obtenir les cinétiques d'oxydation de la myoglobine et pouvoir compléter le modèle existant. Les prédictions obtenues en milieu liquide seront ensuite validées en milieu solide sur de véritables pièces de viandes. Notre modèle pourrait par la suite être complété par des réactions impliquant d'autres composés fonctionnels du tissu musculaires (lipides...).

L'objectif final est de fournir aux industriels de la filière viande des données sur les conditions de conservation et de transformation qui permettent de préserver au mieux les qualités du produit mais également d'étendre l'approche suivie à d'autres filières utilisant la chimie de Fenton. Un projet a d'ailleurs commencé pour utiliser le modèle développé dans cette thèse comme une base à compléter pour simuler la dégradation des matériaux ligno-cellulosiques. Enfin, l'étude de la qualité nutritionnelle des aliments ne s'arrête pas à l'assiette. L'étude expérimentale effectuée dans les conditions du tube digestif montre que les radicaux de Fenton peuvent également se former à ce niveau. Il serait intéressant de comparer les quantités de radicaux mesurées dans ces expériences à celles produites par le modèle développé au cours de cette thèse.

Références bibliographiques

- Abou-Elela, S. I., Ali, M. E. M., & Ibrahim, H. S. (2016). Combined treatment of retting flax wastewater using Fenton oxidation and granular activated carbon. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(4), 511-517.
- Aktaş N., A. M., Kaya M. (2003). The Effect of Organic Acid Marination on Tenderness, Cooking Loss and Bound Water Content of Beef. *Journal Of Muscle Foods*, 14, 181-194.
- Altman, F. P. (1976). Tetrazolium Salts and formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9(3), III-51.
- Aristoy, M. C., & Toldra, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*, 50(3), 327-332.
- Aristoy, M. C., & Toldra, F. (2004). Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Science*, 67(2), 211-217.
- Armstrong, J. S., & Whiteman, M. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria. *Methods Cell Biol*, 80, 355-377.
- Astruc, T., Gatellier, P., Labas, R., Lhoutellier, V. S., & Marinova, P. (2010). Microstructural changes in m. rectus abdominis bovine muscle after heating. *Meat Science*, 85(4), 743-751.
- Astruc, T., Marinova, P., Labas, R., Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2007). Detection and localization of oxidized proteins in muscle cells by fluorescence microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9554-9558.
- Astruc, T., Peyrin, F., Venien, A., Labas, R., Abrantes, M., Dumas, P., & Jamme, F. (2012). In situ thermal denaturation of myofibre sub-type proteins studied by immunohistofluorescence and synchrotron radiation FT-IR microspectroscopy. *Food Chemistry*, 134(2), 1044-1051.
- Auclair, C., & Voisin, E. (1985). *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*: In: Greenwald, R. A. (Eds.) Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc., .
- Auclair, C., Torres, M., & Hakim, J. (1978). Superoxide anion involvement in NBT reduction catalyzed by nadph-cytochrome P-450 reductase: A pitfall. *Febs Letters*, 89(1), 26-28.
- Baker, M. S., & Gebicki, J. M. (1984). The effect of pH on the conversion of superoxide to hydroxyl free radicals. *Arch Biochem Biophys*, 234(1), 258-264.

- Baker, M. S., & Gebicki, J. M. (1986). The effect of pH on yields of hydroxyl radicals produced from superoxide by potential biological iron chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246(2), 581-588.
- Barb W.G., B. J. H., George P., et Hargrave K.R. . (1951). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide: Part II. The ferric ion reaction *Trans. Faraday Soc*, 47, 591-616. .
- Bastide, N. M., Pierre, F. H., & Corpet, D. E. (2011). Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4(2), 177-184.
- Batifoulier, F., Mercier, Y., Gatellier, P., & Renerre, M. (2002). Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H₂O₂-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle. *Meat Science*, 61(4), 389-395.
- Bauchart, C., Savary-Auzeloux, I., Mirand, P. P., Thomas, E., Morzel, M., & Remond, D. (2007). Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. *Journal of Nutrition*, 137(3), 589-593.
- Bax, M. L., Aubry, L., Ferreira, C., Daudin, J. D., Gatellier, P., Remond, D., & Sante-Lhoutellier, V. (2012). Cooking Temperature Is a Key Determinant of in Vitro Meat Protein Digestion Rate: Investigation of Underlying Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2569-2576.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 44(1), 276-287.
- Berri, C., Jehl, N. (2001). Facteurs de variation de la qualité technologique et organoleptique des viandes de poulets. *Journées de la Recherche Avicole*, 8.
- Bielski, B. H. J. (1978). Reevaluation of the spectral and kinetic properties of HO₂^o and of O₂^o-free radicals. *photochem.photobiol*, 28, 645-649.
- Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E., Arudi, R. L., & Ross, A. B. (1985). Reactivity of HO₂/O₂ Radicals in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 14, 1041-1100.
- Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E., Arudi, R. L., & Ross, A. B. (1985). Reactivity of HO₂/O₂ Radicals in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 14(4), 1041-1100.

- Bielski, B. H. J., Comstock, D. A., & Bowen, R. A. (1971). Ascorbic acid free radicals. I. Pulse radiolysis study of optical absorption and kinetic properties. *Journal of the American Chemical Society*, 93(22), 5624-5629.
- Bielski, B. H. J., & Richter, H. W. (1977). Study of the superoxide radical chemistry by stopped-flow radiolysis and radiation induced oxygen consumption. [Electron beams]. *Journal Name: J. Am. Chem. Soc.; (United States); Journal Volume: 99:9, Medium: X; Size: Pages: 3019-3023.*
- Bielski, B. H. J., Shiue, G. G., & Bajuk, S. (1980). Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂- and O₂- radicals. *The Journal of Physical Chemistry*, 84(8), 830-833.
- Biondi, R., Ambrosio, G., Liebgott, T., Cardounel, A. J., Bettini, M., Tritto, I., & Zweier, J. L. (2006). Hydroxylation of D-phenylalanine as a novel approach to detect hydroxyl radicals: application to cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res*, 71(2), 322-330.
- Bjorkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J., & Vandamme, P. (2000). Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Appl Environ Microbiol*, 66(9), 3764-3772.
- Blanchard, P. J., & Mantle, D. (1996). Comparison of proteolytic enzyme levels in chicken, pig, lamb and rabbit muscle at point of slaughter : role in meat tenderisation post mortem. *Journal of Science and Food Agriculture*, 71, 83-91.
- Bouasla, C., Ismail, F., & El-Hadi-Samar, M. (2012). Effects of operator parameters, anions and cations on the degradation of AY99 in an aqueous solution using Fenton's reagent. Optimization and kinetics study. *International Journal of Industrial Chemistry*, 3(15), 1-11.
- Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Radiation Research*, 145(5), 532-541.
- Buettner, G. R., & Schafer, F. Q. (2012). Ascorbate (Vitamin C), its Antioxidant Chemistry. In).
- Burke, R. M., & Monahan, F. J. (2003). The tenderisation of shin beef using a citrus juice marinade. *Meat Sci*, 63(2), 161-168.
- Carpenter, C. E., & Mahoney, A. W. (1992). Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 31(4), 333-367.

- Chan, K. M., & Decker, E. A. (1994). Endogenous Skeletal-Muscle Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(4), 403-426.
- Chan, W. K. M., Faustman, C., Yin, M., & Decker, E. A. (1997). Lipid oxidation induced by oxymyoglobin and metmyoglobin with involvement of H₂O₂ and superoxide anion. *Meat Science*, 46(2), 181-190.
- Chelh, I., Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2006). Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Science*, 74(4), 681-683.
- Chelh, I., Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2007). Characterisation of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils. *Meat Science*, 76(2), 210-215.
- Cheng, F. C., Jen, J. F., & Tsai, T. H. (2002). Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 781(1-2), 481-496.
- Cheng, Z. H., Zhou, H. P., Yin, J. J., & Yu, L. L. (2007). Electron spin resonance estimation of hydroxyl radical scavenging capacity for lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3325-3333.
- Clark, E. M., Mahoney, A. W., & Carpenter, C. E. (1997). Heme and total iron in ready-to-eat chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 124-126.
- Cross, A. J., Harnly, J. M., Ferrucci, L. M., Risch, A., Mayne, S. T., & Sinha, R. (2012). Developing a heme iron database for meats according to meat type, cooking method and doneness level. *Food Nutr Sci*, 3(7), 905-913.
- Czapski, G., & Ilan, Y. A. (1978). On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical. Can the haber–weiss reaction be the source of oh radicals? *Photochemistry and Photobiology*, 28(4-5), 651-653.
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1703(2), 93-109.
- Davies, M. J., Forni, L. G., & Willson, R. L. (1988). Vitamin-e Analog Trolox-C - Electron-Spin-Resonance and Pulse-Radiolysis Studies of Free-Radical Reactions. *Biochemical Journal*, 255(2), 513-522.
- De Laat, J., & Gallard, H. (1999). Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe(III) in Homogeneous Aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling. *Environmental Science & Technology*, 33(16), 2726-2732.

- De Laat, J., Gallard, H., Ancelin, S., & Legube, B. (1999). Comparative study of the oxidation of atrazine and acetone by H₂O₂/UV, Fe(III)/UV, Fe(III)/H₂O₂/UV and Fe(II) or Fe(III)/H₂O₂. In *Chemosphere*, vol. 39 (pp. 2693-2706).
- De Laat, J., & Gallard, H. (1999). Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe(III) in Homogeneous Aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling. *Environmental Science & Technology*, 33(16), 2726-2732.
- De Laat, J., Truong Le, G., & Legube, B. (2004). A comparative study of the effects of chloride, sulfate and nitrate ions on the rates of decomposition of H₂O₂ and organic compounds by Fe(II)/H₂O₂ and Fe(III)/H₂O₂. *Chemosphere*, 55(5), 715-723.
- Deby, C., & Dupont, G. (2011). L'oxygène et la vie: tome 1 - Initiation au métabolisme de l'oxygène. In).
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of Ferritin As A Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.
- Deguillaume, L., Leriche, M., & Chaumerliac, N. (2005). Impact of radical versus non-radical pathway in the Fenton chemistry on the iron redox cycle in clouds. *Chemosphere*, 60(5), 718-724.
- Djenane, D., Martinez, L., Sanchez-Escalante, A., Beltran, J. A., & Roncales, P. (2004). Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. *Food Chemistry*, 85(3), 453-459.
- Duesteberg, C. K., Mylon, S. E., & Waite, T. D. (2008). pH Effects on Iron-Catalyzed Oxidation using Fenton's Reagent. *Environmental Science & Technology*, 42(22), 8522-8527.
- Duesteberg, C. K., & Waite, T. D. (2007). Kinetic modeling of the oxidation of p-hydroxybenzoic acid by Fenton's reagent: Implications of the role of quinones in the redox cycling of iron. *Environmental Science & Technology*, 41(11), 4103-4110.
- Duesteberg, C. K., Cooper, W. J., & Waite, T. D. (2005). Fenton-Mediated Oxidation in the Presence and Absence of Oxygen. *Environmental Science & Technology*, 39(13), 5052-5058.
- Duesteberg, C. K., & Waite, T. D. (2006). Process Optimization of Fenton Oxidation Using Kinetic Modeling. *Environmental Science & Technology*, 40(13), 4189-4195.

- E. Page, S., A. Arnold, W., & McNeill, K. (2011). Assessing the Contribution of Free Hydroxyl Radical in Organic Matter-Sensitized Photohydroxylation Reactions. *Environ. Sci. Technol*, *45*, 2818–2825.
- Esnouf, C. (2012). Les nouveaux enjeux liés à la durabilité des systèmes alimentaires. *Innovations Agronomiques*, *24*, 121-132.
- Esteves, B. M., Rodrigues, C. S. D., Boaventura, R. A. R., Maldonado-Hódar, F. J., & Madeira, L. M. (2016). Coupling of acrylic dyeing wastewater treatment by heterogeneous Fenton oxidation in a continuous stirred tank reactor with biological degradation in a sequential batch reactor. *Journal of Environmental Management*, *166*, 193-203.
- Estevez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, *89*(3), 259-279.
- Estevez, M., Ventanas, S., & Heinonen, M. (2011). Formation of Strecker aldehydes between protein carbonyls - α -Aminoadipic and -glutamic semialdehydes - and leucine and isoleucine. *Food Chemistry*, *128*(4), 1051-1057.
- Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Maes, B., Hiele, M., Rutgeerts, P., & Ghoo, Y. (1998). Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein, related to gastric acid suppression therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *12*(10), 1011-1019.
- Fang, X., Mark, G., & Sonntag (von), C. (1996). OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions Part I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter. *Ultrasonics Sonochemistry*, *3*, 57-63.
- Faust, B. C., & Hoigné, J. (1990). Photolysis of Fe (III)-hydroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, *24*(1), 79-89.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, *86*(1), 86-94.
- Filgueras, R., Astruc, T., Labas, R., Venien, A., Peyrin, F., Zambiasi, R., & Sante-Lhoutellier, V. (2012). Relationship between histochemical, structural characteristics and oxidative stability of rhea limb muscles. *Food Chemistry*, *132*(3), 1387-1394.
- Filgueras, R., Gatellier, P., Aubry, L., Thomas, A., Bauchart, D., Durand, D., Zambiasi, R., & Sante-Lhoutellier, V. (2010). Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat

- during air- and vacuum-packaged storage: influence of muscle on oxidative processes. *Meat Science*, 86(3).
- Filgueras, R., Gatellier, P., Ferreira, C., Zambiasi, R. C., & Sante-Lhoutellier, V. (2011). Nutritional value and digestion rate of rhea meat proteins in association with storage and cooking processes. *Meat Science*, 89(1), 6-12.
- Filgueras, R., Gatellier, P., Zambiasi, R., & Sante-Lhoutellier, V. (2011). Effect of frozen storage duration and cooking on physical and oxidative changes in M-Gastrocnemius pars interna and M-Iliofibularis of rhea americana. *Meat Science*, 88(4), 645-651.
- Fletcher, D. L., Qiao, M., & Smith, D. P. (2000). The relationship of raw broiler breast meat color and pH to cooked meat color and pH. *Processing and products*, 79(5), 784-788.
- Florin, T. H. J., Neale, G., Goretski, S., & Cummings, J. H. (1993). The Sulfate Content of Foods and Beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 6(2), 140-151.
- Fowles, E. H., Gilbert, B. C., Giles, M. R., & Whitwood, A. C. (2007). The effects of chelating agents on radical generation in alkaline peroxide systems, and the relevance to substrate damage. *Free Radic Res*, 41(5), 515-522.
- Fridovic, I. (1978). Les superoxydes ou les dangers de la vie aérobie. In *La Recherche*, vol. 9 (pp. 743-749).
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*, 272(30), 18515-18517.
- Fridovich, I. (2013). Oxygen: How Do We Stand It? *Medical Principles and Practice*, 22(2), 131-137.
- Gallard, H. (1998). *Modélisation cinétique de la décomposition de H₂O₂ et de composés organiques en milieu aqueux par les procédés d'oxydation H₂O₂/Fe(II) et H₂O₂/Fe(III)*.
- Gallard, H. (1998). *Modélisation cinétique de la décomposition de H₂O₂ et de composés organiques en milieu aqueux par les procédés d'oxydation H₂O₂/Fe(II) et H₂O₂/Fe(III)*.
- Gallard, H., De Laat, J., & Legube, B. (1999). Étude comparative de la vitesse de décomposition de H₂O₂ et de l'atrazine par les systèmes Fe(III)/H₂O₂, Cu(II)/H₂O₂ et Fe(III)/Cu(II)/H₂O₂
- Comparative study of the rate of decomposition of H₂O₂ and of atrazine by Fe(III)/H₂O₂, Cu(II)/H₂O₂, Fe(III)/Cu(II)/H₂O₂. In *Revue des sciences de l'eau*, vol. 12 (pp. 713-728).

- Ganhao, R., Estevez, M., & Morcuende, D. (2011). Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials. *Food Chemistry*, *126*(2), 772-778.
- Garcia-Segura, S., Bellotindos, L. M., Huang, Y.-H., Brillas, E., & Lu, M.-C. (2016). Fluidized-bed Fenton process as alternative wastewater treatment technology—A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *67*, 211-225.
- Gardès-Albert, M., D., B.-R., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, *269-270*, 91-96.
- Gatellier, P. (2008). Effet de la cuisson de la viande sur l'oxydation des protéines. In *12 ème JSMTV*.
- Gatellier, P. (2011). Micronutriments (vitamines + minéraux) et composés bioactifs (acides aminés + peptides) dans la viande. In).
- Gatellier, P., Anton, M., & Renerre, M. (1995). Lipid-Peroxidation Induced by H₂O₂-Activated Metmyoglobin and Detection of A Myoglobin-Derived Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(3), 651-656.
- Gatellier, P., Gomez, S., Gigaud, V., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., & Santé-Lhoutellier, V. (2007). Use of a fluorescence front face technique for measurement of lipid oxidation during refrigerated storage of chicken meat. *Meat Science*, *76*(3), 543-547.
- Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S., Greve, E., Yoon, K., & Santé-Lhoutellier, V. (2009). Determination of aromatic amino acid content in cooked meat by derivative spectrophotometry: Implications for nutritional quality of meat. *Food Chemistry*, *114*(3), 1074-1078.
- Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S., & Santé-Lhoutellier, V. (2010). Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. *Meat Science*, *85*, 645-650.
- Gatellier, P., Mercier, Y., & Renerre, M. (1996). Comparison of different systems on lipid and protein oxidation. In, (pp. 127-128).
- Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2009). Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat Science*, *81*(2), 405-409.

- Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2010). Cuisson et sensibilité à la peroxydation des viandes. In Cemagref, Cirad, Ifremer & Inra (Eds.), *Muscle et viande de ruminant* Quae ed., (pp. 197-207).
- Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., Portanguen, S., & Kondjoyan, A. (2009). Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. *Meat Science*, 83(4), 651-656.
- Gatellier, P., Sayd, T., Chelh, I., & Santé-Lhoutellier, V. (2006). Effet de l'oxydation sur l'agregation et la protéolyse des protéines myofibrillaires. *11ème JSMTV*, 199-200.
- Gatellier, P., Sayd, T., Promeprat, A., Gobert, M., Chambon, C., & Santé-Lhoutellier, V. (2013). Identification de marqueurs protéomiques prédictifs de l'oxydation des viandes *Viandes et Produits Carnés*.
- Giannakis, S., Hendaoui, I., Jovic, M., Grandjean, D., De Alencastro, L. F., Girault, H., & Pulgarin, C. (2017). Solar photo-Fenton and UV/H₂O₂ processes against the antidepressant Venlafaxine in urban wastewaters and human urine. Intermediates formation and biodegradability assessment. *Chemical Engineering Journal*, 308, 492-504.
- Gobert, M., Gruffat, D., Habeanu, M., Parafita, E., Bauchart, D., & Durand, D. (2010). Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation. *Meat Science*, 85(4), 676-683.
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2-3), 45-80.
- González-Davila, M., Santana-Casiano, J. M., & Millero, F. J. (2005). Oxidation of iron (II) nanomolar with H₂O₂ in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(1), 83-93.
- Gustafsson, J. P. (2001). Modeling the Acid-Base Properties and Metal Complexation of Humic Substances with the Stockholm Humic Model. *Journal of Colloid and Interface Science*, 244(1), 102-112.
- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., & De Smet, S. (2006). Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Science*, 74(3), 476-486.

- Haak, L., Raes, K., Van Dyck, S., & De Smet, S. (2008). Effect of dietary rosemary and alpha-tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. *Meat Science*, 78(3), 239-247.
- Haber, F., & Weiss, J. (1934). *The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts* (Vol. 147).
- Haddou, M. (2010). *Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo Fenton et photocatalyse*. Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité chimique et Photochimique(IMRCP), UMR 5623.
- Haddou, M., Benoit-Marquié, F., Maurette, M.-T., & Oliveros, E. (2010). Oxidative Degradation of 2,4-Dihydroxybenzoic Acid by the Fenton and Photo-Fenton Processes: Kinetics, Mechanisms, and Evidence for the Substitution of H₂O₂ by O₂. *Helvetica Chimica Acta*, 93, 1067-1080.
- Hashizume, K., Ichikawa, K., Nishii, Y., Kobayashi, M., Sakurai, A., Miyamoto, T., Suzuki, S., & Takeda, T. (1992). Effect of administration of thyroxine on the risk of postpartum recurrence of hyperthyroid Graves' disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(1), 6-10.
- He, J., Yang, X., Men, B., & Wang, D. (2016). Interfacial mechanisms of heterogeneous Fenton reactions catalyzed by iron-based materials: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 39, 97-109.
- Hercberg, S., & Galan, P. (1989). Biochemical effects of iron deprivation. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 361, 63-70.
- Hiemstra, T., & van Riemsdijk, W. H. (2006). Biogeochemical speciation of Fe in ocean water. *Marine Chemistry*, 102(3-4), 181-197.
- Huang, S. C., & Kuo, J. C.-C. (2000). Concentrations and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. *Proceedings of the National Science Council Republic of China Part B Life Sciences*, 24(4), 193-201.
- Huang, X., Dai, J., Fournier, J., Ali, A. M., Zhang, Q., & Frenkel, K. (2002). Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(1), 84-92.

- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, *125*(1), 1-12.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, *57*, 395-418.
- Jayson, G. G., Parsons, B. J., & Swallow, A. J. (1973). Oxidation of ferrous ions by perhydroxyl radicals. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, *69*(0), 236-242.
- Jianguo, L., Jingbing, W., Mengmeng, Y., Hu, Z., Jianren, L., & Zhanfeng, C. (2010). Purification and characterization of superoxide dismutase from garlic. In *Food and Bioproducts Processing*.
- Jones, A. M., Griffin, P. J., & Waite, T. D. (2015). Ferrous iron oxidation by molecular oxygen under acidic conditions: The effect of citrate, EDTA and fulvic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *160*, 117-131.
- Jongberg, S., Skov, S. H., Thøgersen, M. A., Skibsted, L. H., & Lund, M. N. (2011). Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. *Food Chemistry*, *128*(2), 276-283.
- Juretic, H., Montalbo-Lomboy, M., van Leeuwen, J., Cooper, W. J., & Grewell, D. (2015). Hydroxyl radical formation in batch and continuous flow ultrasonic systems. *Ultrasonics Sonochemistry*, *22*(0), 600-606.
- Kajak-Siemaszko, K., Aubry, L., Peyrin, F., Bax, M. L., Gatellier, P., Astruc, T., Przybylski, W., Jaworska, D., Gaillard-Martinie, B., & Sante-Lhoutellier, V. (2011). Characterization of protein aggregates following a heating and freezing process. *Food Research International: 44 (10) 3160-3166*, *44*(10), 3160-3166.
- Kargiotou, C., Katsanidis, E., Rhoades, J., Kontominas, M., & Koutsoumanis, K. (2011). Efficacies of soy sauce and wine base marinades for controlling spoilage of raw beef. *Food Microbiol*, *28*(1), 158-163.
- Kaur, H. H., B. . (1994). *Oxygen Radicals in Biological Systems* (Vol. 233).
- Khalil, A. (2002). Mécanisme moléculaire de l'effet protecteur de la vitamine E dans l'athérosclérose. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 80 (pp. 662-669).

- Khan, A. U., & Kasha, M. (1994). Singlet Molecular-Oxygen in the Haber-Weiss Reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(26), 12365-12367.
- Kondjoyan, A., Chevolleau, S., Greve, E., Gatellier, P., Sante-Lhoutellier, V., Bruel, S., Touzet, C., Portanguen, S., & Debrauwer, L. (2010a). Formation of heterocyclic amines in slices of Longissimus thoracis beef muscle subjected to jets of superheated steam. *Food Chemistry*, *119*(1), 19-26.
- Kondjoyan, A., Chevolleau, S., Greve, E., Gatellier, P., Sante-Lhoutellier, V., Bruel, S., Touzet, C., Portanguen, S., & Debrauwer, L. (2010b). Modelling the formation of heterocyclic amines in slices of longissimus thoracis and semimembranosus beef muscles subjected to jets of hot air. *Food Chemistry*, *123*(3), 659-668.
- Kongkachuichai, R., Napatthalung, P., & Charoensiri, R. (2002). Heme and nonheme iron content of animal products commonly consumed in Thailand. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*(4), 389-398.
- Kono, Y. (1978). Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*, *186*(1), 189-195.
- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep*, *6*(4), 229-234.
- Koppenol, W. H., Butler, J., and van Leeuwen, J.W. (1978). The Haber-Weiss cycle. *Photochem. Photobiol*, *28*, 655-660.
- Kovács, A., Wojnárovits, L., Pálfi, T., Emi-Reynolds, G., & Fletcher, J. (2008). Pulse radiolysis of tetrazolium violet in aqueous and aqueous-alcoholic solutions under oxidative and reductive conditions. *Radiation Physics and Chemistry*, *77*(9), 1088-1092.
- Kuma, K., Nishioka, J., & Matsunaga, K. (1996). Controls on iron(III) hydroxide solubility in seawater: The influence of pH and natural organic chelators. *Limnology and Oceanography*, *41*(3), 396-407.
- Kuznetsov, A. V., Kehrer, I., Kozlov, A. V., Haller, M., Redl, H., Hermann, M., Grimm, M., & Troppmair, J. (2011). Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods. *Anal Bioanal Chem*, *400*(8), 2383-2390.

- Kwan, W. P., & Voelker, B. M. (2002). Decomposition of hydrogen peroxide and organic compounds in the presence of dissolved iron and ferrihydrite. *Environmental Science & Technology*, 36(7), 1467-1476.
- Kwan, W. P., & Voelker, B. M. (2003). Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems. *Environmental Science & Technology*, 37(6), 1150-1158.
- Kwan, W. P., & Voelker, B. M. (2004). Influence of Electrostatics on the Oxidation Rates of Organic Compounds in Heterogeneous Fenton Systems. *Environmental Science & Technology*, 38(12), 3425-3431.
- Kyla-Puhju, M., Ruusunen, M., Kivikari, R., & Puolanne, E. (2004). The buffering capacity of porcine muscles. *Meat Sci*, 67(4), 587-593.
- Layrisse, M., Martinez-Torres, C., Cook, J. D., Walker, R., & Finch, C. A. (1973). Iron fortification of food: its measurement by the extrinsic tag method. *Blood*, 41(3), 333-352.
- Le Truong, G., De Laat, J., & Legube, B. (2004). Effects of chloride and sulfate on the rate of oxidation of ferrous ion by H₂O₂. *Water Research*, 38(9), 2384-2394.
- Li, H., Jiang, W., Liu, Y., Jiang, J., Zhang, Y., Wu, P., Zhao, J., Duan, X., Zhou, X., & Feng, L. (2016). The metabolites of glutamine prevent hydroxyl radical-induced apoptosis through inhibiting mitochondria and calcium ion involved pathways in fish erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 92, 126-140.
- Liochev, S. I., Batinic-Haberle, I., & Fridovich, I. (1995). The effect of detergents on the reduction of tetrazolium salts. *Arch Biochem Biophys*, 324(1), 48-52.
- Liu, G., & Xiong, Y. L. (2000). Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and in vitro digestibility of oxidized Myosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 624-630.
- Liu, R.-h., Fu, S.-y., Zhan, H.-y., & Lucia, L. A. (2009). General Spectroscopic Protocol to Obtain the Concentration of the Superoxide Anion Radical. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(20), 9331-9334.
- Liu, X., Marrakchi, M., Jahne, M., Rogers, S., & Andreescu, S. (2016). Real-time investigation of antibiotics-induced oxidative stress and superoxide release in bacteria using an electrochemical biosensor. *Free Radical Biology and Medicine*, 91, 25-33.

- Liu, Z., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2010). Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10697-10704.
- Liu, Z., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2011). Morphological examinations of oxidatively stressed pork muscle and myofibrils upon salt marination and cooking to elucidate the water-binding potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13026-13034.
- Lombardi-Boccia, G., Martinez-Dominguez, B., & Aguzzi, A. (2002). Total Heme and Non-heme Iron in Raw and Cooked Meats. *Journal of Food Science*, 67(5), 1738-1741.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 83-95.
- Mei, L., Cromwell, G. L., Crum, A. D., & Decker, E. A. (1998). Influence of dietary beta-alanine and histidine on the oxidative stability of pork. *Meat Science*, 49(1), 55-64.
- Mei, L., Crum, A., & Decker, E. A. (1994). Development of lipid oxidation and inactivation of antioxidant enzymes in cooked pork and beef. *Journal of Food Lipids*, 1(4), 273-283.
- Mercier, Y., Gatellier, P., & Renerre, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, 66(2), 467-473.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Vincent, A., & Renerre, M. (2001). Lipid and protein oxidation in microsomal fraction from turkeys: influence of dietary fat and vitamin E supplementation. *Meat Science*, 58(2), 125-134.
- Millero, F. (2001). Speciation of metals in natural waters. *Geochemical Transactions*, 2(8), 56.
- Millero, F., & Izaguirre, M. (1989). Effect of ionic strength and ionic interactions on the oxidation of Fe(II). *Journal of Solution Chemistry*, 18(6), 585-599.
- Millero, F. J., & Sotolongo, S. (1989). The oxidation of Fe(II) with H₂O₂ in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 53(8), 1867-1873.
- Millero, F. J., Sotolongo, S., & Izaguirre, M. (1987). The oxidation kinetics of Fe(II) in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51(4), 793-801.
- Millero, F. J., Sotolongo, S., Stade, D. J., & Vega, C. A. (1991). Effect of ionic interactions on the oxidation of Fe(II) with H₂O₂ in aqueous solutions. *Journal of Solution Chemistry*, 20(11), 1079-1092.

- Millero, F. J., Yao, W., & Aicher, J. (1995). The speciation of Fe(II) and Fe(III) in natural waters. *Marine Chemistry*, 50(1–4), 21-39.
- Molette, C., Serieye, V., Rossignol, M., Babile, R., Fernandez, X., & Remignon, H. (2006). High postmortem temperature in muscle has very similar consequences in two turkey genetic lines. *Poult Sci*, 85(12), 2270-2277.
- Morgan, B., & Lahav, O. (2007). The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution – basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere*, 68(11), 2080-2084.
- Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M., & Laville, E. (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science*, 73(3), 536-543.
- Mozdzan, M., Szemraj, J., Rysz, J., & Nowak, D. (2005). Antioxidant properties of carnosine re-evaluated with oxidizing systems involving iron and copper ions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96(5), 352-360.
- Munoz, M., Garcia-Muñoz, P., Pliego, G., Pedro, Z. M. d., Zazo, J. A., Casas, J. A., & Rodriguez, J. J. (2016). Application of intensified Fenton oxidation to the treatment of hospital wastewater: Kinetics, ecotoxicity and disinfection. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(4, Part A), 4107-4112.
- Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2004). Heme degradation by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 6(6), 967-978.
- Navarrete, M., Rangel, C., Corchado, J. C., & Espinosa-Garcia, J. (2005). Trapping of the OH Radical by α -Tocopherol: A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(21), 4777-4784.
- Ngapo, T. M., & Gariépy, C. (2008). Carnosine and anserine in four classes of pork. In, vol. 7B.12.). Cape Town, South Africa 2008.
- Nichela, D., Haddou, M., Benoit-Marquié, F., Maurette, M.-T., Oliveros, E., & García Einschlag, F. S. (2010). Degradation kinetics of hydroxy and hydroxynitro derivatives of benzoic acid by fenton-like and photo-fenton techniques: A comparative study. *Applied Catalysis B: Environmental*, 98(3-4), 171-179.

- Ouali, A. (1991). Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *INRA Production Animale*, 4(3), 195-208.
- Ouali, A., Gatellier, P., & Dufour, E. (1988). Caractérisation des propriétés hydrophobes de la myosine de différents types musculaires. In *Viandes et Prod Carnés*, vol. 9 (pp. 198).
- Ouali, A., & Talmant, A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28(4), 331-348.
- Page, S. E., Arnold, W. A., & McNeill, K. (2010). Terephthalate as a probe for photochemically generated hydroxyl radical. *J Environ Monit*, 12(9), 1658-1665.
- Pavlov, A. R., Revina, A. A., Dupin, A. M., Boldyrev, A. A., & Yaropolov, A. I. (1993). The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1157(2), 304-312.
- Pegg, R. B., & Shahidi, F. (2004). Introduction. In *Nitrite Curing of Meat*, (pp. 1-5): Food & Nutrition Press, Inc.
- Pierre, J. L., & Fontecave, M. (1999). Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *Biometals*, 12(3), 195-199.
- Promeyrat, A. (2013).
Analyse et modélisation des mécanismes à l'origine des modifications des protéines lors du chauffage du tissu musculaire
- Promeyrat, A., Daudin, J. D., Astruc, T., Danon, J., & Gatellier, P. (2013). Kinetics of protein physicochemical changes induced by heating in meat using mimetic models: (2) effects of fibre type, peroxides and antioxidants. *Food Chem*, 138(4), 2283-2290.
- Promeyrat, A., Gatellier, P., Le Louët, L., Sante-Lhoutellier, V., & Daudin, J. D. (2010). A mimetic model is developed to study the physicochemical changes of meat proteins during heating. In).
- Purchas, R. W., Rutherford, S. M., Pearce, P. D., Vather, R., & Wilkinson, B. H. P. (2004). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q(10,) and creatine. *Meat Science*, 66(3), 629-637.
- Purchas, R. W., Simcock, D. C., Knight, T. W., & Wilkinson, B. H. P. (2003). Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(7), 827-837.

- Purohit, A., Singh, R., Kerr, W., & Mohan, A. (2015). Effects of heme and nonheme iron on meat quality characteristics during retail display and storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9(2), 175-185.
- Quintiliani, M., Badiello, R., Tamba, M., Esfandi, A., & Gorin, G. (1977). Radiolysis of glutathione in oxygen-containing solutions of pH7. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 32(2), 195-202.
- Ramirez, J. H., Duarte, F. M., Martins, F. G., Costa, C. A., & Madeira, L. M. (2009). Modelling of the synthetic dye Orange II degradation using Fenton's reagent: From batch to continuous reactor operation. In *Chemical Engineering Journal*, vol. 148 (pp. 394-404).
- Razagui, I. B., Barlow, P. J., & Taylor, K. D. A. (1992). A Spectrofluorometric Procedure for the Determination of Alpha-Tocopherol in Nutritional Supplement Products. *Food Chemistry*, 44(3), 221-226.
- Rémond, d., s.-a. I., Gatellier p., Santé-lhoutellier v. (2008). Propriétés nutritionnelles des peptides et protéines de la viande : impact des procédés de transformation. *Sciences du Muscle et Technologies des Viandes et Produits Carnés*, 33-40.
- Rennerre, M. (2002). Les oxydations lipidiques dans la viande. *Viandes et Produits Carnés*.
- Rennerre, M. (2010). Les oxydations lipidiques dans la viande. In *9^{èmes} Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la Viande*.
- Rennerre, M., Anton, M., & Gatellier, P. (1992). Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles. *Meat Science*, 32(3), 331-342.
- Rivas, F. J., Beltran, F. J., Frades, J., & Buxeda, P. (2001). Oxidation of p-hydroxybenzoic acid by Fenton's reagent. *Water Research*, 35(2), 387-396.
- Rivas, F. J., Beltran, F. J., Gimeno, O., & Frades, J. (2001). Treatment of Olive Oil Mill Wastewater by Fenton's Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1873-1880.
- Rivas, F. J., Navarrete, V., Beltrán, F. J., & García-Araya, J. F. (2004). Simazine Fenton's oxidation in a continuous reactor. *Applied Catalysis B: Environmental*, 48(4), 249-258.
- Rouet, V., Hamma-Kourbali, Y., Petit, E., Panagopoulou, P., Katsoris, P., Barritault, D., Caruelle, J. P., & Courty, J. (2005). A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J Biol Chem*, 280(38), 32792-32800.

- Rush, J. D., & Bielski, B. H. J. (1985). Pulse radiolytic studies of the reaction of perhydroxyl/superoxide O₂⁻ with iron(II)/iron(III) ions. The reactivity of HO₂/O₂⁻ with ferric ions and its implication on the occurrence of the Haber-Weiss reaction. *The Journal of Physical Chemistry*, 89(23), 5062-5066.
- Salminen, H., Estevez, M., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2006). Inhibition of protein and lipid oxidation by rapeseed, camelina and soy meal in cooked pork meat patties. *European Food Research and Technology*, 223(4), 461-468.
- Santana-Casiano, J. M., Gonzalez-Davila, M., & Millero, F. J. (2006). The role of Fe(II) species on the oxidation of Fe(II) in natural waters in the presence of O₂ and H₂O₂. *Marine Chemistry*, 99(1GÇô4), 70-82.
- Santana-Casiano, J. M., González-Dávila, M., & Millero, F. J. (2004). The oxidation of Fe(II) in NaCl–HCO₃⁻ and seawater solutions in the presence of phthalate and salicylate ions: a kinetic model. *Marine Chemistry*, 85(1–2), 27-40.
- Santana-Casiano, J. M., González-Dávila, M., Rodríguez, M. J., & Millero, F. J. (2000). The effect of organic compounds in the oxidation kinetics of Fe(II). *Marine Chemistry*, 70(1–3), 211-222.
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Grève, E., & Gatellier, P. (2008). Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1488-1494.
- Santé-Lhoutellier, V., Aubry, L., & Gatellier, P. (2007). Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5343-5348.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Aubry, L., & Gatellier, P. (2008). Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat Science*, 79(4), 777-783.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., & Gatellier, P. (2008). Assessment of the influence of diet on lamb meat oxidation. *Food Chemistry*, 109(3), 573-579.
- Schreurs NM, M. W., Tavendale MH, Lane GA, Barry TN, Cummings T, Fraser K, LópezVillalobos N, Ramírez-Restrepo CA. (1997). Skatole and indole concentration and

- the odour of fat from lambs that had grazed perennial ryegrass/white clover pasture or *Lotus corniculatus*. *Animal Feed Science and Technology*, 138, 254–271.
- Shaeib, F., Banerjee, J., Maitra, D., Diamond, M. P., & Abu-Soud, H. M. (2013). Impact of hydrogen peroxide-driven Fenton reaction on mouse oocyte quality. *Free Radical Biology and Medicine*, 58, 154-159.
- Sharedeh, D., Gatellier, P., Astruc, T., & Daudin, J. D. (2011). *Délicieux Prosafebeef: Identification of structural and biochemical changes in marinated beef*
Protein quality and microbiological changes in aerobically- or vacuum-packaged, irradiated fresh pork loins.
- Simpson, R. J., Mohamad-Ghaffer, A., & Khan, R. (1998). Glutathione and duodenal reduction and absorption of iron. *Biochem Soc Trans*, 26(4), S352.
- Šnyrychová, I., & Hideg, É. (2008). First Application of Terephthalate as a Fluorescent Probe for Hydroxyl Radicals in Thylakoid Membranes. In J. Allen, E. Gantt, J. Golbeck & B. Osmond (Eds.), *Photosynthesis. Energy from the Sun*, (pp. 1553-1556): Springer Netherlands.
- Spiro, R. G. (1967). Studies on the renal glomerular basement membrane. *J. Biol. Chem*, 242, 1915–1922.
- Stadtman, E. R. (1991). Ascorbic-Acid and Oxidative Inactivation of Proteins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6), S1125-S1128.
- Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of Free Amino-Acids and Amino-Acid-Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 797-821.
- Stadtman, E. R., Arai, H., & Berlett, B. S. (2005). Protein oxidation by the cytochrome P450 mixed-function oxidation system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 432-436.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 207-218.
- Steven, D. W. K. D. A. Iron Chelates and Unwanted Biological Oxidations.
- Stolze, K., Dadak, A., Liu, Y., & Nohl, H. (1996). Hydroxylamine and phenol-induced formation of methemoglobin and free radical intermediates in erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*, 52(12), 1821-1829.

- Sun, J. Z., Kaur, H., Halliwell, B., Li, X. Y., & Bolli, R. (1993). Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia in vivo. Direct evidence for a pathogenetic role of the hydroxyl radical in myocardial stunning. *Circ Res*, 73(3), 534-549.
- Suzuki, Y., Nakao, T., Maemura, H., Sato, M., Kamahara, K., Morimatsu, F., & Takamatsu, K. (2006). Carnosine and anserine ingestion enhances contribution of nonbicarbonate buffering. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 38(2), 334-338.
- Takahashi, A., Shibasaki-Kitakawa, N., & Yonemoto, T. (2003). A rigorous kinetic model for β -carotene oxidation in the presence of an antioxidant, α -tocopherol. In *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 80 (pp. 1241-1247).
- Tarpey, M. M., & Fridovich, I. (2001). Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res*, 89(3), 224-236.
- Tewari, R. K., Hadacek, F., Sassmann, S., & Lang, I. (2013). Iron deprivation-induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in *Brassica napus* leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 91(0), 74-83.
- Tewari, R. K., Kumar, P., Neetu, & Sharma, P. N. (2005). Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. *Plant Science*, 169(6), 1037-1045.
- Thayer, W. S. (1990). Superoxide-dependent and superoxide-independent pathways for reduction of nitroblue tetrazolium in isolated rat cardiac myocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276(1), 139-145.
- Trapp, J., & Millero, F. (2007). The Oxidation of Iron(II) with Oxygen in NaCl Brines. *Journal of Solution Chemistry*, 36(11), 1479-1493.
- Trefan, L., Bungler, L., Bloom-Hansen, J., Rooke, J., Salmi, B., Larzul, C., Terlouw, C., & Doeschl-Wilson, A. (2011). Meta-analysis of the effects of dietary vitamin E supplementation on alpha-tocopherol concentration and lipid oxidation in pork. *Meat Science*, 87(4), 305-314.
- Truong, G. L., De Laat, J., & Legube, B. (2004). Effects of chloride and sulfate on the rate of oxidation of ferrous ion by H₂O₂. *Water Res*, 38(9), 2383-2393.
- Truong, G. L., Laat, J. D., & Legube, B. (2004). Effects of chloride and sulfate on the rate of oxidation of ferrous ion by H₂O₂. *Water Research*, 38(9), 2384-2394.

- Van Laack, R. L., Liu, C. H., Smith, M. O., & Loveday, H. D. (2000). Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. *Poult Sci*, 79(7), 1057-1061.
- van Laack, R. L., Stevens, S. G., & Stalder, K. J. (2001). The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *J Anim Sci*, 79(2), 392-397.
- Velez, S., Nair, N. G., & Reddy, V. P. (2008). Transition metal ion binding studies of carnosine and histidine: Biologically relevant antioxidants. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 66(2), 291-294.
- von Wiren, N., Lauter, F. R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W., & Frommer, W. B. (2000). Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J*, 21(2), 167-175.
- W.J. Olsman, P. S. (1981). Developments in meat science. *Applied Science Publishers*, 2, 195–239.
- Walling, C. (1975). Fenton's reagent revisited. *Accounts of Chemical Research*, 8(4), 125-131.
- Walling, C., & Goosen, A. (1973). Mechanism of the ferric ion catalyzed decomposition of hydrogen peroxide. Effect of organic substrates. *J Am Chem Soc*.
- Wang, S., Yu, H., & Wickliffe, J. K. (2011). Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 2147-2151.
- Welch, K. D., Davis, T. Z., & Aust, S. D. (2002). Iron Autoxidation and Free Radical Generation: Effects of Buffers, Ligands, and Chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 360-369.
- Williams, P. G. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64(s4), S113-S119.
- Xu, C., Liu, S., Liu, Z., Song, F., & Liu, S. (2013). Superoxide generated by pyrogallol reduces highly water-soluble tetrazolium salt to produce a soluble formazan: A simple assay for measuring superoxide anion radical scavenging activities of biological and abiological samples. *Analytica Chimica Acta*, 793(0), 53-60.
- Young, J. F., Rosenvold, K., Stagsted, J., Nielsen, J. H., & Andersen, H. J. (2005). Significance of vitamin E supplementation, dietary content of polyunsaturated fatty acids, and preslaughter

- stress on oxidative status in pig as reflected in cell integrity and antioxidative enzyme activities in porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 745-749.
- Young, O. A., & Davey, C. L. (1981). Electrophoretic Analysis of Proteins from Single Bovine Muscle-Fibers. *Biochemical Journal*, 195(1), 317-327.
- Yu, X. Y., & Barker, J. R. (2003). Hydrogen peroxide photolysis in acidic aqueous solutions containing chloride ions. I. Chemical mechanism. *Journal of Physical Chemistry A*, 107(9), 1313-1324.
- Zhao, B., Wang, X., Shang, H., Li, X., Li, W., Li, J., Xia, W., Zhou, L., & Zhao, C. (2016). Degradation of trichloroacetic acid with an efficient Fenton assisted TiO₂ photocatalytic hybrid process: Reaction kinetics, byproducts and mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 289, 319-329.
- Zhuang, H., Han, H., & Shan, S. (2016). Treatment of British Gas/Lurgi coal gasification wastewater using a novel integration of heterogeneous Fenton oxidation on coal fly ash/sewage sludge carbon composite and anaerobic biological process. *Fuel*, 178, 155-162.

Annexe 1

Les calculs de simulation

La Figure 47 montre l'organisation du fichier d'entrée et la Figure 48 montre l'organigramme du programme Matlab® qui a été construit pour effectuer des calculs de simulation.

Température	60
pH	6
O ₂	1.0E+00
RéactFe-II	0.05
RéactFe-III	0.05
pKeau	13.0

	Teneur (M)
H ⁺	1.0E-06
OH ⁻	9.8E-08
O ₂	1.5E-04

N° réaction	Facteur pH	Energ.Activ kJ/mole	k (SI) pH=6, 25°C	Symbole du composé																	
				H+	OH-	O2	Fe2+	Fe3+	H2O2	HO*	HO2*/O2*	H2O	TP	HTP	Perdu1	HO-TP*	HO-TP-O2*	Perdu2	perdu3		
				Composé constant (0) ou variable (1)	1.00E-06	9.76E-08	1.47E-04	2.00E-04	0.00E+00	2.00E-04	1.00E-18	1.00E-18	5.50E+01	1.00E-03	0.00E+00	0.00E+00	1.00E-18	1.00E-18	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
				Concentration initiale (M)	1.00E-06	9.76E-08	1.47E-04	2.00E-04	0.00E+00	2.00E-04	1.00E-18	1.00E-18	5.50E+01	1.00E-03	0.00E+00	0.00E+00	1.00E-18	1.00E-18	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
1	1.0E+00	65	1.0E+02		0	1	0	-1	1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.0E+00	65	2.0E+00		1	0	0	1	-1	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1.0E+00	0	3.0E+07		0	0	0	0	0	-1	-1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1.0E+00	0	3.5E+08		0	1	0	-1	1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1.0E+00	0	7.0E+06		0	0	0	-1	1	1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1.0E+00	0	1.0E+04		1	0	1	1	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1.0E+00	65	3.0E+01		0	0	-1	-1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	1.0E+00	0	5.4E+06		0	0	1	0	0	1	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1.0E+00	0	5.0E+09		0	0	0	0	0	1	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1.0E+00	0	1.0E+10		0	0	1	0	0	0	-1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1.0E+00	40	1.0E-04		0	0	0.5	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	1.00E+00	0	2.8E+09		0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0
33	1.00E+00	0	1.6E+07		0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0
34	1.00E+00	0	3.4E+03		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0
35	1.00E+00	0	1.8E+02		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0
36	1.00E+00	0	5.0E+08		0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	1	0	0	0	0	0
37	1.00E+00	0	2.1E+02		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0
38	1.00E+00	0	6.3E+09		0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1

Figure 47 : Organisation du fichier d'entrée du programme de calcul.

Organisation générale

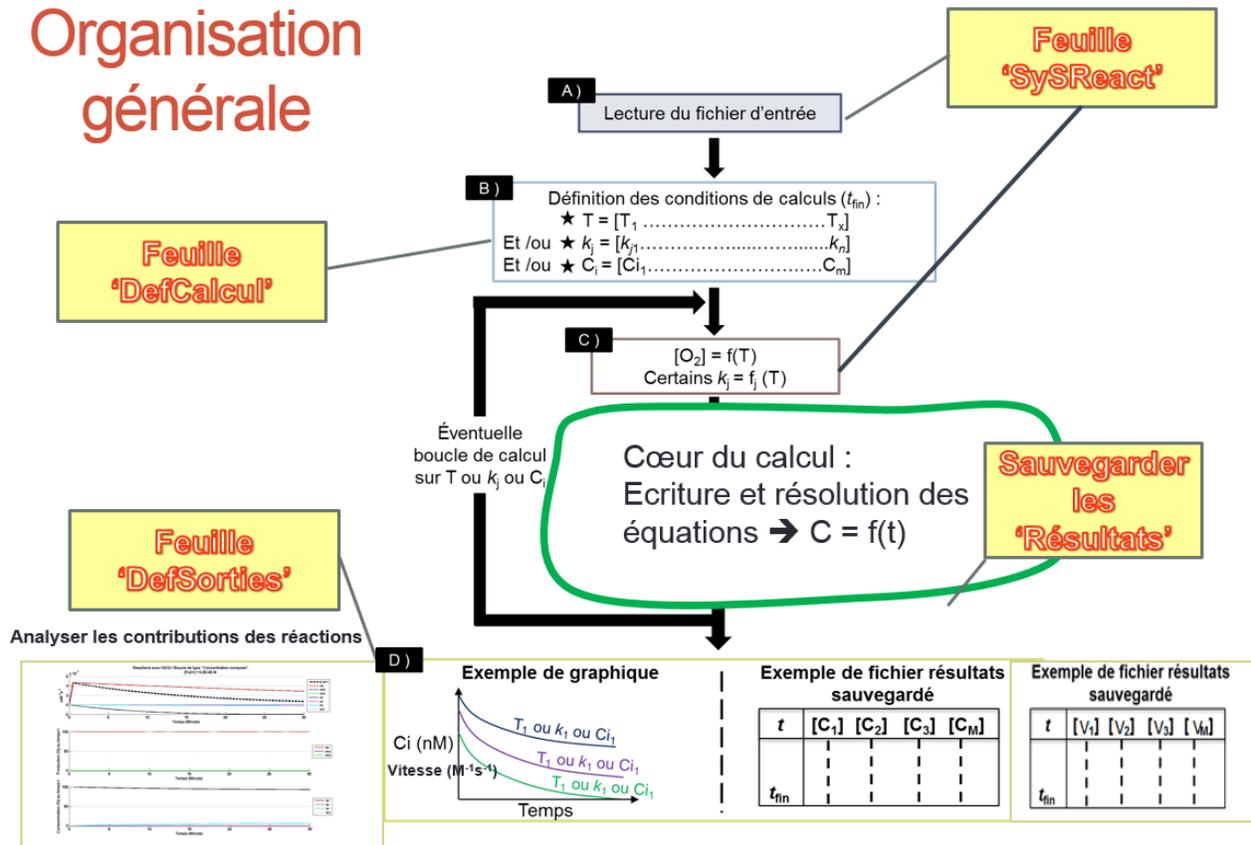


Figure 48 : Organigramme du programme Matlab® qui a été construit pour effectuer des calculs de simulation.

- I. La première colonne contient le numéro des N réactions du modèle ; un numéro unique qui a été attribué dans ce mémoire.
- II. La deuxième colonne contient le facteur pH qui prend en compte l'évolution de la proportion couple réactant acide base conjugué en fonction du pH. Dans notre étude le couple correspond à (HO_2°/O_2°)
- III. La troisième colonne contient les énergies d'activations
- IV. La quatrième colonne contient les constantes de vitesse à 25°C des N réactions.
- V. Les trois premières lignes indiquent dans l'ordre : (i) le nom des composés, (ii) la variabilité au cours du temps de la concentration des composés (constante ou variable) (iii) la concentration initiale des composés,

VI. Enfin la matrice résultante va de N lignes à M colonnes.

La Figure 48 présente l'organisation des calculs qui commencent par la lecture des informations précédentes (Figure 48, A) et des conditions du calcul (Figure 48, B). Celui-ci peut être effectué pour une ou des conditions. Il faut au minimum indiquer la température et la durée d'observation (t_{fin}). La concentration initiale en oxygène dissous et les constantes de vitesse de certaines réactions sont actualisées à partir des valeurs à 25°C fournies par le fichier d'entrée (Figure 48, C). Une boucle conditionnelle permet d'examiner l'un des effets suivants :

IV. effet d'une variation de la température d'un calcul à l'autre ;

V. effet de la variation de concentration initiale d'un composé autour des valeurs fournies par le fichier d'entrée ;

VI. effet de la modulation de la constante de vitesse d'une des réactions.

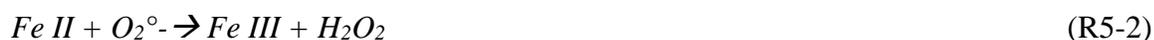
Les résultats sont observés sur des graphiques montrant chacun les cinétiques des concentrations en fonction du temps, relatives à un composé ; les vitesses d'apparition et de disparition de chaque composé du système outre la contribution de chaque réaction dans la production ou la consommation du ou des composés sélectionnés et impliqués dans le système. Les résultats sont enregistrés sous forme de tableaux contenant les valeurs des concentrations ainsi que les vitesses d'apparition ou de disparition de tous les composés pour une centaine de valeurs entre t_0 et t_{fin} (Figure 48, D).

Annexe 2

Détermination des constantes de vitesse inconnues

Réaction 5

La R5 consiste à une oxydation du Fe II par le HO_2° ou sa base conjuguée $\text{O}_2^{\circ-}$:



k_{5-1} et k_{5-2} sont les constantes de vitesse respectives des réactions R5-1 et R5-2. Globalement, la contribution de ces deux réactions à la variation de la concentration en Fe II par cette voie s'écrit comme suit :

Donc :

$$d[\text{Fe II}] / dt = k_{5-1} [\text{Fe II}] [\text{HO}_2^\circ] + k_{5-2} [\text{Fe II}] [\text{O}_2^{\circ-}]$$

$$d[\text{Fe II}] / dt = k_5 [\text{Fe II}] [\text{HO}_2^\circ / \text{O}_2^{\circ-}]$$

A partir des données de De Laat *et al.* (1999) , on montre que

$$k_5 = (k_{5-1} * [\text{H}^+] + k_{5-2} * K) / (K + [\text{H}^+])$$

Les valeurs de pKa ($\text{HO}_2^\circ / \text{O}_2^{\circ-}$) et de K sont respectivement égales à 4,8 ; $1,58\text{E}^{-5}$.

A pH 2, k_{5-1} et de k_{5-2} sont égales à $1,2.10^6$ et $1,0.10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (De Laat *et al.*, 1999).

La variation de la valeur de k_5 en fonction du pH est représentée dans la Figure 49.

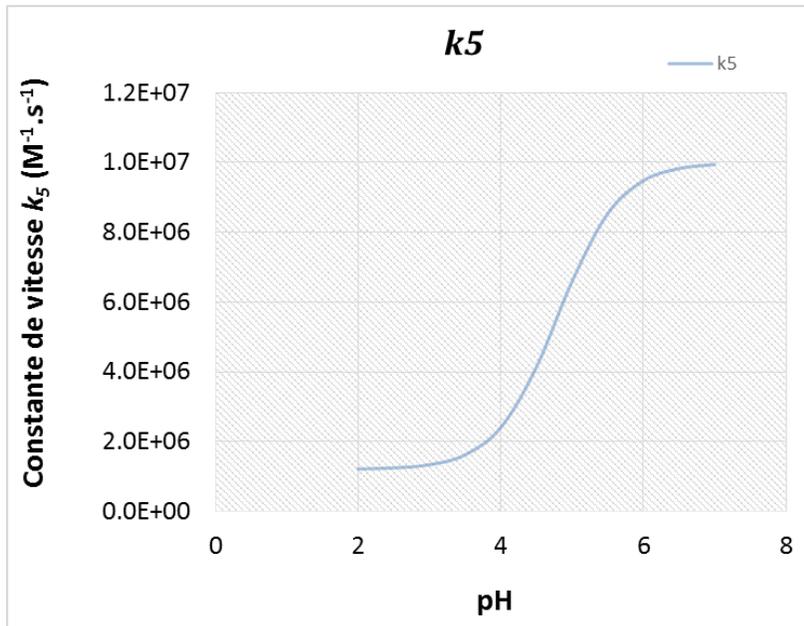


Figure 49 : variation de la valeur de la constante réactionnelle k_5 en fonction du pH

Réaction 6

L' O_2° est environ 10^3 à 10^5 fois plus réactif que le radical hydroxyle HO_2° (De Laat *et al.*, 1999). Si à pH 3 par exemple, les proportions respectives d' O_2° et d' HO_2° sont égales à 1,6 et 98,4% alors le poids de la concentration en O_2° sur k_6 est 16 fois supérieur à celui du HO_2° . En effet,

$$k_6 O_2^{\circ} = 10^3 \cdot k_6 HO_2^{\circ}$$

A pH 6, k_6 est égale à $10^6 M^{-1}.s^{-1}$. Cette valeur a été trouvée en présence d'EDTA décrit comme promoteur de la réactivité du fer (Fowles *et al.*, 2007). la variation de k_6 en fonction du pH suit une fonction pH et l'allure de courbe est illustrée dans la Figure 50.

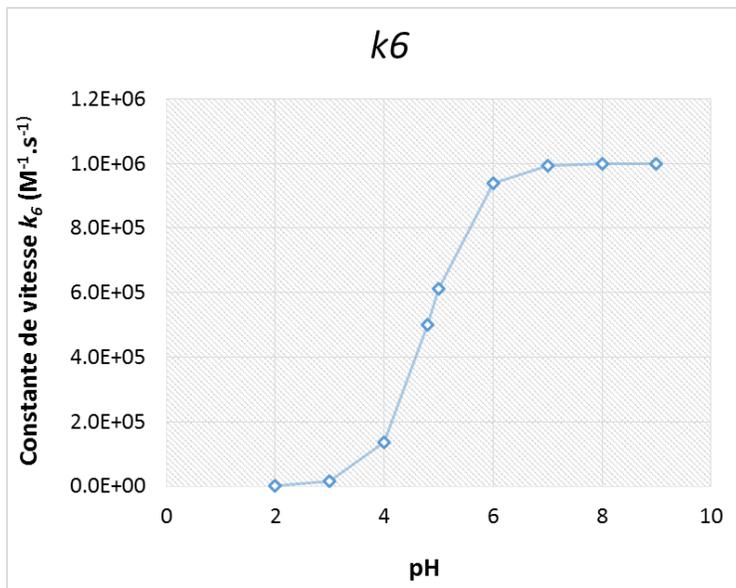


Figure 50 : variation de la valeur de la constante réactionnelle k_6 en fonction du pH

Annexe 3

Étude de sensibilité du modèle aux paramètres P2 et P3

Une étude de sensibilité du modèle aux paramètres P2 et P3 a été menée pour identifier leurs impacts sur l'allure des courbes de production du HTP et du formazan à 4 et 60°C. Ces simulations ont été menées dans les conditions standards (tampon phosphate 40 mM, pH= 6, cas du HTP : $\text{FeSO}_4 = \text{H}_2\text{O}_2 = 200 \mu\text{M}$, cas du formazan : $\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$, pas d' H_2O_2).

La diminution de P2 est à l'origine d'une diminution de la pente des courbes notamment durant les premières minutes de l'essai. Ceci serait lié à la diminution de la quantité en Fe II réactif dans le milieu (Figure 51).

La diminution de P3 est à l'origine de l'augmentation de la pente des courbes durant les dernières minutes de l'essai (Figure 52). Ceci est d'autant plus visible dans le cas du formazan. En effet, en réduisant la réactivité du Fe III, la contribution des réactions de réduction du Fe II en Fe III est réduite. Or, ce sont ces réactions qui sont responsable du maintien du cycle et par conséquent de la production de formazan et du HTP au cours du temps.

P2
P3

0,01

0,05

0,1

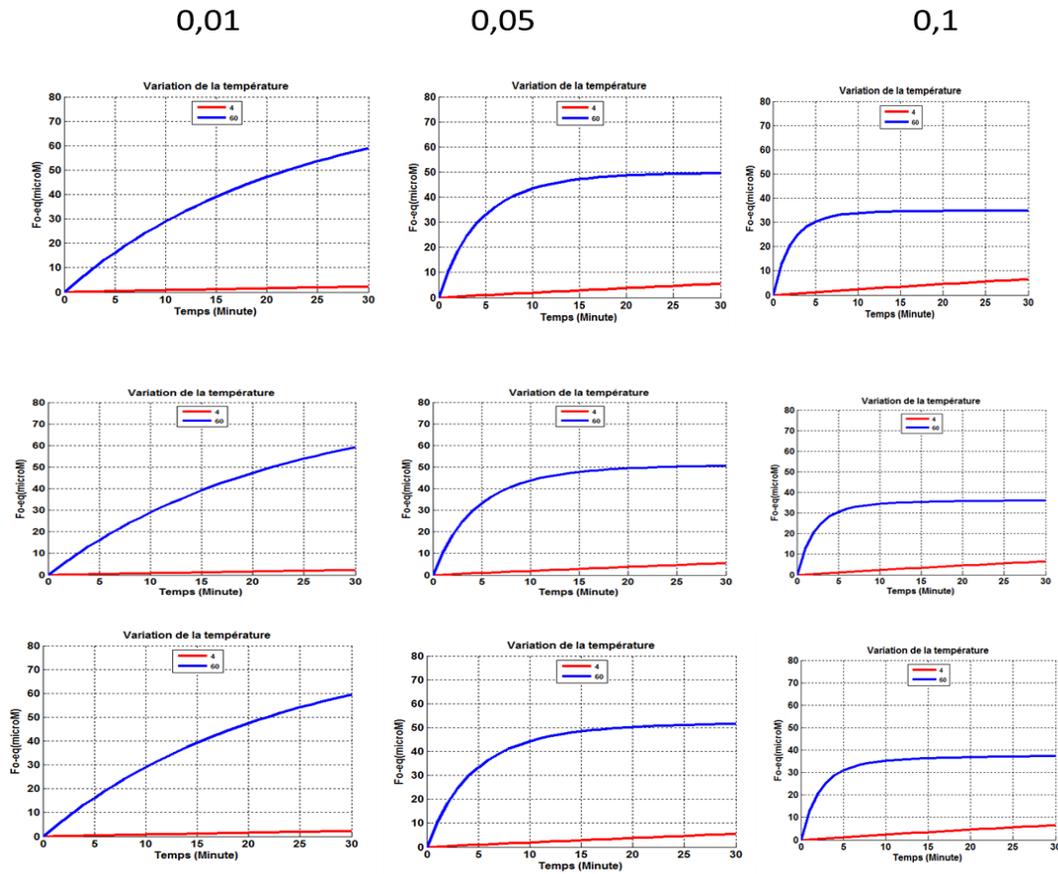


Figure 51 : Etude de sensibilité du modèle aux paramètres P2 et P3 vis à vis de la formation du formazan à deux températures (4 et 60°C)

P2
P3

0,01

0,05

0,1

0,01

0,05

0,1

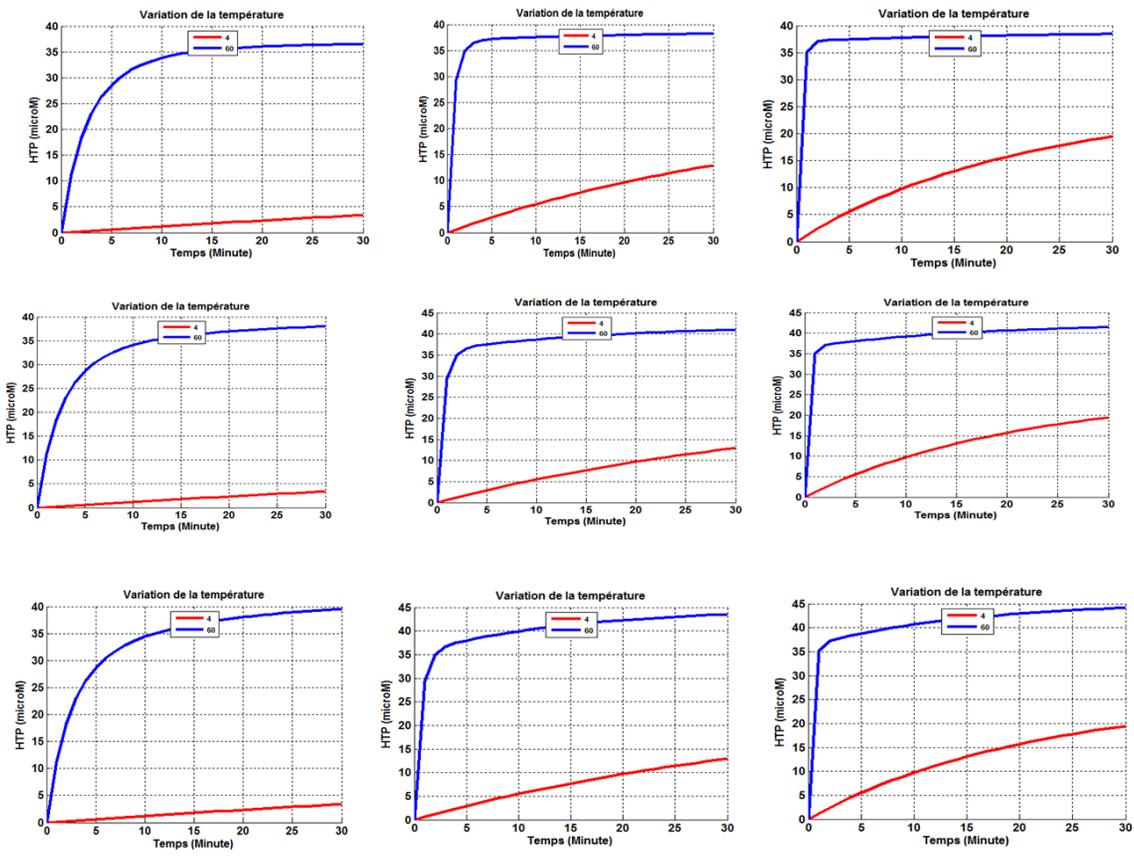


Figure 52 : Etude de sensibilité du modèle aux paramètres P2 et P3 vis à vis de la formation du HTP à deux températures (4 et 60°C)

Annexe 4

Etablissement d'une relation de calibration pour mesurer la concentration en HTP par une mesure de fluorescence malgré la précipitation du Fe III

a. Introduction

Dans la viande, l'oxydation du fer entraîne la production de radicaux libres (O_2° , HO°). Le radical hydroxyle HO° s'attaque aux protéines et aux lipides entraînant la dégradation de la qualité de la viande. (Gatellier, 2008; Haak, Raes, Smet, Claeys, Paelinck, & De Smet, 2006). Afin de suivre l'évolution de la production du radical hydroxyle, un modèle mimétique de la viande a été mis au point. Du fer et un oxydant (H_2O_2) sont dissous afin de déclencher une oxydation du fer et, par conséquent, la formation des radicaux libres et plus particulièrement le radical hydroxyle. Le téréphthalate (TP) est la sonde choisie pour piéger le HO° et former l'hydroxtéréphthalate (HTP). Ce dernier fluoresce. La fluorescence est mesurée à des longueurs d'ondes spécifiques ($\lambda_{exc} = 315 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 425 \text{ nm}$) (Šnyrychová & Hideg, 2008)

Nous avons établi une relation pour convertir la mesure de la fluorescence faite lors des essais TP (à pH=6) en concentration en HTP sachant que dans ces essais «TP» la température est comprise entre 4 et 60°C, la teneur en fer entre 0 et 600 μ M et la teneur en H_2O_2 égale 200 μ M. La fluorescence du HTP dépend de

- La température : plus la T°C est élevée, plus la fluorescence est faible
- la concentration en HTP initiale (Plus la concentration en HTP initiale dans le milieu est importante, plus l'intensité de la fluorescence est grande) (A.H. Barati, 2006; Qu, Kirschenbaum, & Borish, 2000). L'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la concentration de l'HTP formé

Une relation de proportionnalité est établie. Elle consiste à mesurer la fluorescence du HTP à une concentration de référence. Cette mesure est faite dans les mêmes conditions que celles des expériences avec du TP. Puisque l'intensité de la fluorescence mesurée est proportionnelle à la

concentration en HTP formée au cours du temps, la relation de proportionnalité permet de convertir la fluorescence du HTP en concentration du HTP.

Equation 1
$$[HTP]_t = [HTP]_{ref} * \frac{Fluo,t}{Fluo,ref}$$

- $[HTP]_t$: [HTP]_{ref} : La concentration de référence du HTP
- Fluo, t : fluorescence du HTP formé au cours du temps dans les essais TP
- Fluo, ref : Intensité de la fluorescence du HTP à la concentration de référence

Cette relation de proportionnalité est illustrée par la droite bleue de la Figure 53. Il s'avère que dans nos conditions

- i)** à pH 6, le Fe III produit d'oxydation du Fe II par l'O₂ et l'H₂O₂, est peu soluble. Les suspensions colloïdales qui sont des intermédiaires entre les suspensions (particules de taille supérieure au micromètre) et les solutions vraies (particules de taille inférieure au nanomètre) influence la fluorescence du HTP mesuré (Haddou, 2010). Cette baisse de fluorescence mesurée n'est pas due à une diminution de la concentration de référence en HTP mais aux colloïdes formés dans le milieu.

Afin de prendre en compte cette baisse de la fluorescence du HTP mesuré, une première correction est établie. Elle correspond à la droite orange de la Figure 53.

- ii)** le HTP est dégradé par HO° (Page, Arnold, & McNeill, 2010). Ainsi, la concentration du HTP de référence baisse. Le problème dans ce cas est d'attribuer la fluorescence mesurée à la vraie concentration du HTP dans le milieu (pointillés verts).

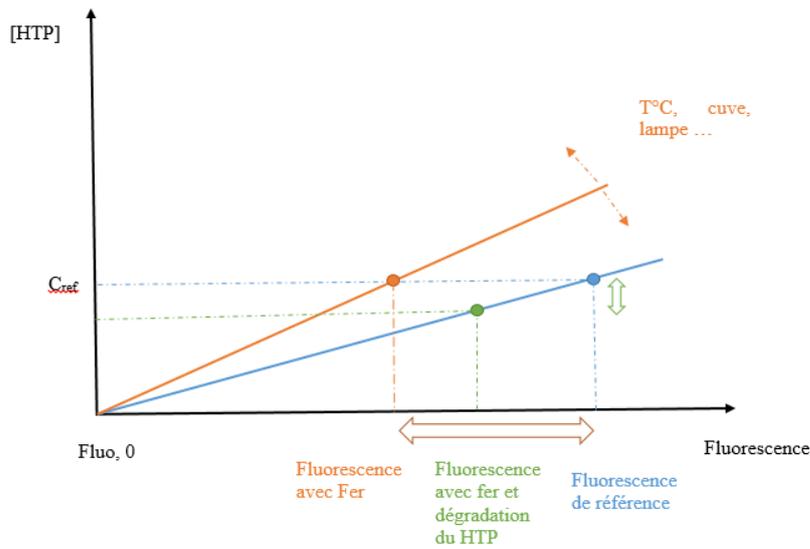


Figure 53 : Courbes de calibration de la fluorescence

La baisse de la fluorescence mesurée est-elle due aux colloïdes ? À la dégradation du HTP par le HO° ? Aux deux phénomènes ? Si oui à quelles proportions ?

La relation de proportionnalité ne prend pas en compte ces deux facteurs (colloïdes, dégradation du HTP) et ne permet pas, par conséquent la mesure de la concentration réelle en HTP dans le milieu. Nous avons donc calculé le ratio (équation 2) afin de savoir si la baisse de la fluorescence mesurée est due i) aux colloïdes ii) à la dégradation du HTP dans la baisse de la fluorescence mesurée. Pour ce, nous avons fait varier le pH.

En effet, à pH très acide, le Fe III est plus soluble et la réaction de dismutation du HO_2° en H_2O_2 est plus importante. En effet, le pKa du couple $\text{O}_2^\circ / \text{HO}_2^\circ$ est de 4,8. Alors qu'à pH faiblement acide ou basique la solubilité du Fe III est négligeable et la dismutation HO_2° en H_2O_2 est faible

$$\text{Equation 2} \quad \text{Ratio} = \frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}}$$

L'objectif étant d'étudier l'effet de la température et de la concentration initiale en fer sur le

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}} \quad \text{et de mettre au point une relation qui permettrait de}$$

prendre en compte le/les facteurs responsables de la baisse de la fluorescence et ainsi pouvoir convertir les valeurs de fluorescence du HTP en concentrations du HTP.

b. Matériels et méthodes

La fluorescence est mesurée par un fluorimètre de type Jasco équipé i) d'un Peletier, le chauffage et le refroidissement se font directement dans la cuve du spectrofluorimètre ii) barreau magnétique (émission à 420 nm après excitation à 340 nm) (Saran et Summer, 1999). Le pH est mesuré avec un pH mètre Hanna Instrumen HI 2211. Le pH est d'abord fixé à 3,5 puis, par l'ajout de NaOH 0,16%, atteint 6. Le dosage du fer soluble est fait par la Ferrozine (Stolze, Dadak, Liu, & Nohl, 1996). Afin de mesurer la concentration en fer soluble, le monochromateur est réglé sur 562 nm, la longueur d'onde à laquelle le coefficient d'absorption du complexe est de $27,9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. L'HTP et le FeSO_4 sont fournis par Sigma-Aldrich.

Essai 1

Cinétique du *Ratio* = $\frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}}$ **en fonction du pH**

Le milieu réactionnel est constitué de tampon phosphate 40 mM, pH 6 à 25°C. La concentration du HTP est 10 μM . Le FeSO_4 est dissous dans le milieu à deux concentrations (200 et 600 μM). Chaque essai est répété 4 fois ($n=4$) et a une durée de 30 minutes. En effet, des essais précédents d'une durée de 2 heures, effectuées au laboratoire, ont montré qu'au-delà de 30 minutes, la variation du ratio est négligeable.

Essai 2

Cinétique de formation du fer insoluble en fonction de la concentration initiale en Fe^{2+}

Le milieu réactionnel est constitué de tampon phosphate 40 mM à pH 6 et à 25°C. Le FeSO_4 est dissous dans ce milieu à des concentrations variables (de 50 à 600 μM). Des échantillons sont prélevés toutes les 5 minutes avec une seringue équipée de filtre (Ester de cellulose 0,2 μm). L'échantillon est mélangé avec du citrate, de l'ascorbate et de la ferrozine qui forme un complexe coloré spécifique de Fe^{2+} . La concentration en fer soluble calculée est soustraite de la concentration initiale en FeSO_4 pour identifier la concentration en fer insoluble au cours du temps.

Essai 3

Cinétique du *Ratio* = $\frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}}$ en fonction de la T°C et de la concentration initiale en FeSO₄

Le milieu réactionnel est constitué de tampon phosphate 40 mM à pH 6.

Effet de la concentration initiale en FeSO₄

La température est fixée à 25°C. Le FeSO₄ est dissous à différentes concentrations (50, 200, 400 et 600µM). Ces concentrations en fer correspondent aux concentrations en fer dans différents types de viandes (blanche → rouge).

Effet de la température

Le FeSO₄ est dissous à une concentration de 200µM et la Température est variée (4, 25, 30, 60°C) ce qui correspond à des températures de conservation (4°C) et de cuisson (60°C) Les températures intermédiaires permettent de suivre l'évolution du ratio.

Essai 4

Tous les ratios calculés pour les températures allant de 25°C à 60°C et pour des concentrations initiales en FeSO₄ allant de 50 à 600µM ont été regroupées. Après avoir vérifié que l'effet de la température est négligeable et en considérant qu'il y avait eu des condensations sur les cuves lors de la mesure de la fluorescence à 4°C ayant entraîné une mauvaise répétabilité, un ajustement par les moindres carrés est fait. En effet, le lissage par concentration en Fer permet de corriger tous les essais TP avec une formule simple : $R = a. (temps)^b + c$

Les coefficients a et b sont intimement corrélés.

c. Résultats et discussions

Cinétique du $Ratio = \frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}}$ en fonction du pH

La Figure 54 montre qu'à pH= 3,5, quelque soit la concentration en FeSO₄ initiale, le ratio est toujours égale à 1. En effet, l'oxydation du Fe II en Fe III à pH= 3,5 engendre peu de précipitations du Fe III. Ainsi, la fluorescence du HTP n'est pas altérée par les colloïdes et le ratio reste inchangé. D'autre part, dans ces conditions, la dismutation du HO₂[°] est élevée. Cette dismutation est à l'origine de la formation du H₂O₂ responsable de l'oxydation du Fe²⁺ et donc de la formation d' (HO[°]), pourtant, le ratio reste inchangé. Ceci veut dire, que la dégradation du HTP par le HO[°] est négligeable

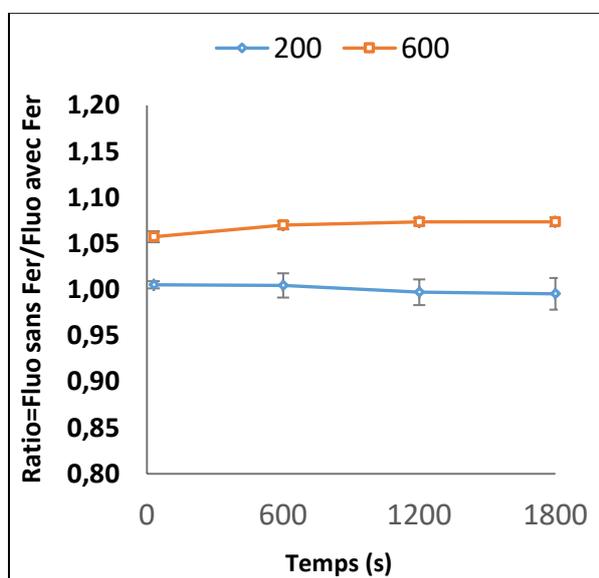


Figure 54 : Cinétique du $Ratio = \frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}}$ à des concentrations initiales en FeSO₄ égales à 200 et 600 µM (25°C) à pH 3

Relation entre le $Ratio = \frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}}$ et les concentrations en fer insoluble

La Figure 55 montre que le ratio dépend de la concentration en fer insoluble dans le milieu. En effet, à pH 6, plus la concentration initiale en FeSO₄ dissous augmente, plus la plus la concentration en fer insoluble est importante. L'augmentation de la concentration en fer insoluble s'illustre par une augmentation du ratio due à la baisse de la fluorescence avec fer. Les résultats des figures Figure 54 et Figure 55 montrent que la diminution de la fluorescence du HTP est due à la précipitation du fer. La dégradation du HTP par le HO[°] peut être négligée.

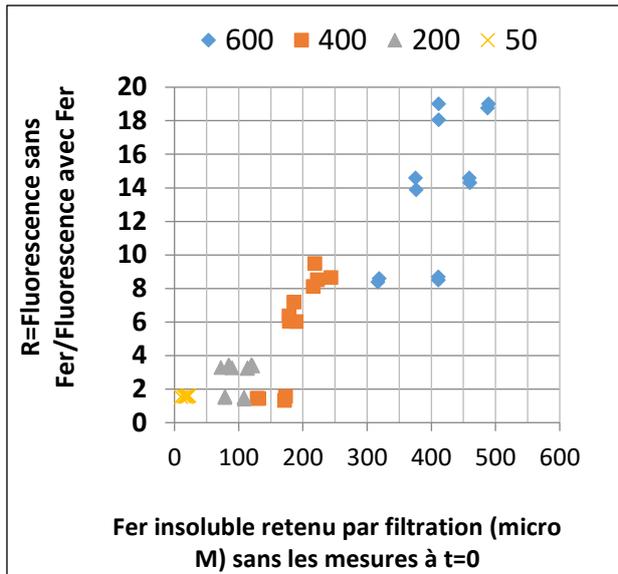


Figure 55 : Relation entre le Ratio= (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer) et les concentrations en fer insoluble à pH 6 pour différentes concentrations initiales en FeSO₄ (50, 200, 400 et 600 μM) à 25°C

Cinétique de formation du fer insoluble

La Figure 56 montre la dynamique d'évolution de la concentration en fer insoluble au cours du temps pour différentes concentrations initiales en FeSO₄. Quelque soit la concentration en FeSO₄ dissous, on distingue 2 phases. Une première rapide et de courte durée (~ 30 secondes) caractérisé par une forte augmentation de la concentration du fer insoluble. La deuxième phase est caractérisée par une légère augmentation de la concentration en fer insoluble au cours du temps. Ceci s'explique par l'oxydation du Fe²⁺ essentiellement par l'oxygène du milieu. Le fer ferreux i) se transforme fer ferrique peu soluble ii) se chélate à d'autres éléments chimiques du milieu tel que le phosphate. Plus la concentration en FeSO₄ est importante, plus l'ampleur du saut est grande. La légère augmentation de la concentration en fer insoluble durant la deuxième phase s'explique par la réduction du Fe III soluble en Fe II . Ce dernier s'oxyde de nouveau en Fe III ou se chélate à d'autres espèces chimiques du milieu telle que le phosphate. Le facteur temps influence donc la solubilité du fer et par conséquent le

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}}$$

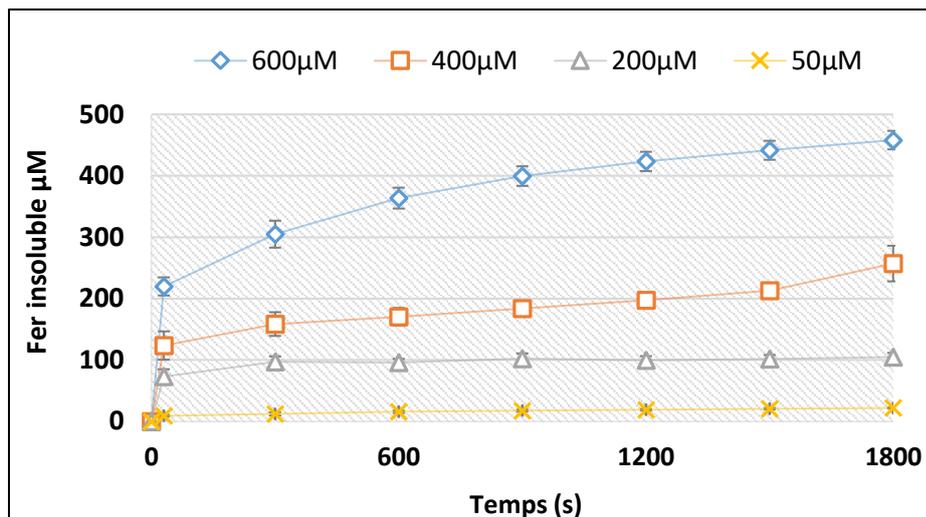


Figure 56 : Cinétique de formation du fer insoluble pour des concentrations initiales en FeSO_4 variables (de 50 à 600 μM) (25°C, pH6)

Cinétique du Ratio = $\frac{\text{Fluorescence du HTP sans fer}}{\text{Fluorescence du HTP avec fer}}$ **en fonction de la concentration initiales en FeSO_4**

La Figure 57 montre deux phases, une phase courte où le ratio augmente vite et une deuxième phase plus lente et longue. L'effet du temps est avéré. Ainsi, à 30°C ; la valeur du ratio augmente de 73% entre 30 et 1800 secondes. D'autre part, Plus la concentration initiale en FeSO_4 augmente, plus la valeur du ratio est élevée. Par exemple, le ratio mesuré pour une concentration initiale en FeSO_4 égale à 600 μM à 30 minutes est supérieur de 93.7% à celui mesuré pour une concentration initiale en FeSO_4 égale à 50 μM . Ceci est en cohérence avec les résultats de la Figure 55 (pH=8) où l'augmentation de la concentration en FeSO_4 entraîne une augmentation de la précipitation du Fe III (issu de l'oxydation du Fe II par l' O_2).

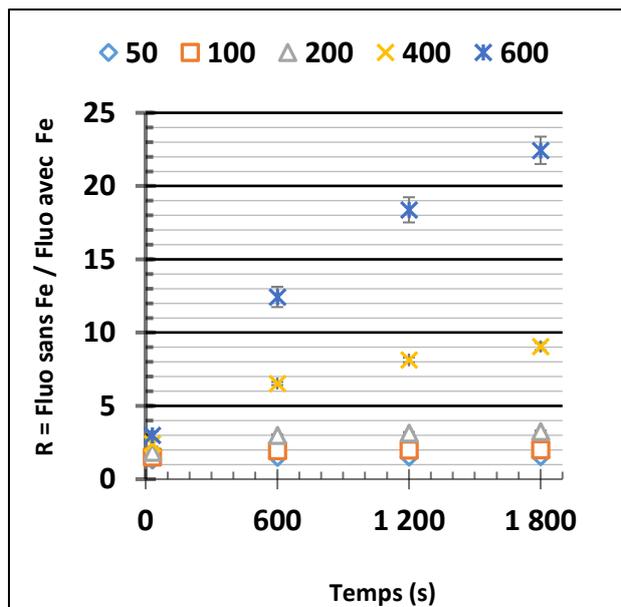


Figure 57 : Cinétique du Ratio = (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer) en fonction de la concentration initiale en FeSO₄

Cinétique du $Ratio = \frac{Fluorescence\ du\ HTP\ sans\ fer}{Fluorescence\ du\ HTP\ avec\ fer}$ en fonction de la température

La Figure 58 montre 2 phases : une courte durant laquelle le ratio évolue vite et une deuxième phase où le ratio continue à évoluer lentement. Par contre, ces résultats ne permettent pas de tirer une relation entre le ratio $R = Fluo\ sans\ Fe / Fluo\ avec\ Fe$ et la température. En effet, à 60°C, le ratio est inférieur de 17% à celui à 30°C à 30 minutes. En revanche, le ratio à 4°C a une valeur à 10 minutes qui est inférieure à celle à 30°C. Il n'y a pas d'organisation en fonction de la T°C.

Tous les effets sont statistiquement significatifs avec ($p < 0,001^{***}$). Par contre,

- L'effet de la concentration initiale en fer est 34 fois plus important que celui de la température
- L'effet du temps est 18 fois plus important que la température
- L'effet de la température peut être négligé

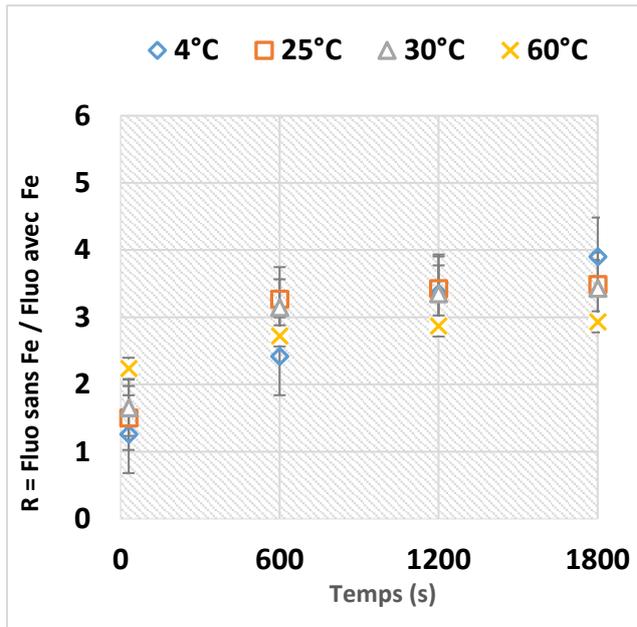


Figure 58 : Cinétique du Ratio= (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer) en fonction de la température ($\text{FeSO}_4 = 200 \mu\text{M}$)

Les ajustements par concentration en fer (microm) avec la formule : $R = a * (\text{temps})^b + c$ sont décrits dans la Figure 59. Les valeurs des paramètres (a, b, c) sont indiquées dans le Tableau 25. Les intervalles de confiance à 95% sur les ajustements sont assez petits quand on fait les ajustements sur les valeurs moyennes des R.

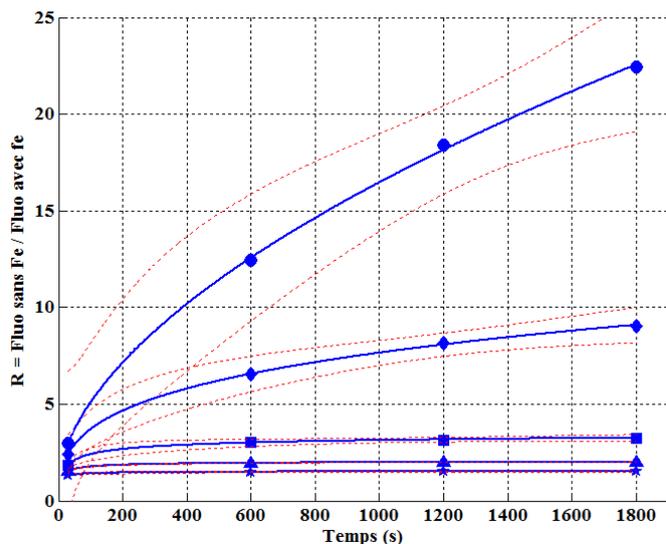


Figure 59 : Ajustement par concentration en fer en utilisant les valeurs moyennes du Ratio= (Fluorescence du HTP sans fer)/ (Fluorescence du HTP avec fer)

Tableau 25 : Valeurs des paramètres (a, b, c) : résultats des ajustements par concentration en fer (μM) avec la formule : $R=a*(\text{temps})^{(b)} +c$

FeSO_4 (microM)	50	100	200	400	600
a	-0.879	-2.663	-5.185	1.452	0.3376
b	-0.351	-0.444	-0.2492	0.2599	0.5562
c	1.59	2.107	4.052	-1.096	0.7295

La relation finale de calibration pour convertir la mesure de la fluorescence faite quand les essais TP (à pH= 6) en concentration en HTP sachant que dans ces essais «TP» la température est comprise entre 4 et 60°C, la teneur en fer entre 0 et 600 μM et la teneur en H_2O_2 est égale 200 μM est comme suit :

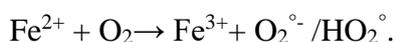
$$\frac{[\text{HTP}]_t}{[\text{HTP}]_{\text{ref}}} = \frac{\text{Fluo},_t}{\text{Fluo},_{\text{ref}}} = \frac{\text{Fluo sans fer}}{\text{Fluo avec fer},_t}$$

$$R(t) = \frac{\text{Fluo sans fer}}{\text{Fluo avec fer}, t}$$

$$[HTP]_t = [HTP]_{ref} * \frac{\text{Fluo}, t}{\text{Fluo}, ref} * R, t$$

- [HTP], t : concentration du HTP formé au cours du temps
- [HTP], ref : la concentration de référence du HTP
- Fluo, t : fluorescence mesurée au cours du temps dans les essais TP
- Fluo, ref : fluorescence du HTP à la concentration de référence sans fer
- R, t est un facteur de correction tenant compte de l'atténuation de la fluorescence due à la précipitation du fer.

A 25°C, par exemple, la concentration en H₂O₂ est 23% supérieure à celle de l'O₂. D'autre part, la valeur de la constante réactionnelle de la réaction de Fenton $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\circ$ est 1,6 fois supérieure à celle de la réaction d'oxydation du Fe²⁺ par l'oxygène



Ainsi, la vitesse d'oxydation du Fe II serait plus élevée notamment durant les premières secondes de la réaction. En effet, l'essentiel du Fe II est oxydé en Fe III durant les premières secondes de la réaction. Ceci est d'autant vrai à température élevée car la solubilité de l'O₂ diminue avec la T°C.

d. Conclusion

Une relation de calibration a été mise au point. Elle prend en compte les effets de la concentration en FeSO₄ et du temps dont l'influence sur la valeur du ratio a été prouvée. Ainsi, les mesures de la fluorescence du HTP formé au cours du temps ; dans un milieu réactionnel constitué de tampon phosphate 40 mM à pH 6 où les concentrations en oxydants (FeSO₄ et H₂O₂) sont variables ; sont convertibles en concentrations.

Références bibliographiques

- A.H. Barati, M. M.-D., H.Mozdarani, S.Z. Bathaei, Z.M.Hassan. (2006). Free hydroxyl radical dosimetry by using 1 MHz low level ultrasound waves. *IJRR*, 3(4), 163-169.
- Gatellier, P. (2008). Effet de la cuisson de la viande sur l'oxydation des protéines. In 12^{ème} JSMTV).
- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., & De Smet, S. (2006). Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Science*, 74(3), 476-486.
- Haddou, M. (2010). Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo Fenton et photocatalyse. Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité chimique et Photochimique(IMRCP), UMR 5623.
- Page, S. E., Arnold, W. A., & McNeill, K. (2010). Terephthalate as a probe for photochemically generated hydroxyl radical. *J Environ Monit*, 12(9), 1658-1665.
- Qu, X., Kirschenbaum, L. J., & Borish, E. T. (2000). Hydroxyterephthalate as a fluorescent probe for hydroxyl radicals: application to hair melanin. *Photochem Photobiol*, 71(3), 307-313.
- Šnrychová, I., & Hideg, É. (2008). First Application of Terephthalate as a Fluorescent Probe for Hydroxyl Radicals in Thylakoid Membranes. In J. Allen, E. Gantt, J. Golbeck & B. Osmond (Eds.), *Photosynthesis. Energy from the Sun*, (pp. 1553-1556): Springer Netherlands.
- Stolze, K., Dadak, A., Liu, Y., & Nohl, H. (1996). Hydroxylamine and phenol-induced formation of methemoglobin and free radical intermediates in erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*, 52(12), 1821-1829.

Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la viande

Résumé : La maîtrise de la qualité des produits carnés transformés (conservés, marinés, cuits, salés, digérés...) nécessite une meilleure compréhension des mécanismes responsables des phénomènes oxydatifs et des lois cinétiques qui les régissent. Au cours des processus oxydatifs, la phase d'initiation des oxydations est capitale. Cette phase se caractérise par la vitesse à laquelle l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène réagissent avec le fer dont la viande est plus ou moins riche selon l'espèce. Les radicaux libres, principalement superoxyde ($O_2^{\circ-}$) et hydroxyle (OH°) conduisent à l'oxydation des lipides et des protéines de la viande. Ce travail s'appuie en alternance sur des expérimentations avec un milieu modèle bien contrôlé et des sondes spécifiques permettant de caractériser la production radicalaire, et sur des simulations de calculs avec un modèle stœchio-cinétique basé sur un ensemble de réactions élémentaires et de réactions bilans permettant d'évaluer l'incidence i) de chacun des paramètres du système réactionnel (constante réactionnelle k , énergie d'activation E_a , réactivité du fer P) ii) de la concentration en réactants (Fer, H_2O_2 , chlorure et antioxydants iii) des conditions environnementales (température, pH et force ionique) sur les cinétiques de production des radicaux libres. Les résultats expérimentaux montrent : (1) un effet synergique des oxydants et de la température sur les oxydations (2) une incidence importante des contre ions et du pH sur les complexes du fer et les niveaux d'oxydation (3) un important effet de la nature des oxydants et des antioxydants sur l'oxydation. Les constantes de vitesse controversées et les énergies d'activation de certaines réactions ainsi que les coefficients de réactivité du fer ont été ajustés localement un par un. Les prédictions du modèle stœchio-cinétique reproduisent des tendances expérimentales, exceptés pour des concentrations élevées en réactants, pour des températures extrêmes et certains antioxydants. Une optimisation globale des valeurs des k , des E_a et de la réactivité du fer pourrait améliorer les résultats prédictifs.

Mots clés : fer non héminique, oxydation, radicaux libres, constante de vitesse, réactivité du fer, énergie d'activation, modélisation, viande transformée

Characterization and modeling of oxygenated free radicals production by Fenton chemistry in a meat mimetics medium

Abstract: Control of meat quality during meat processes (storage, cooking, curing, digestion) requires a better understanding of the mechanisms responsible of the oxidative phenomena and of the kinetic laws that govern them. The initiation stage of oxidation is crucial and characterized by the rate of reaction of oxygen and hydrogen peroxide with iron; this latter compound is more or less rich depending on muscles, animals and species. Superoxide radical ($O_2^{\circ-}$) and hydroxyl radical (OH°) are produced and initiate the cascade of reactions implicated in protein and lipid oxidations. To investigate the impact of the physicochemical parameters on the free radicals production our trials were carried out with a mimetic model of meat using two specific probes (nitroblue tetrazolium and terephthalate) and a stoichio-kinetic mathematical model composed of interactive chemical reactions. This approach enables to measure many production kinetics of $O_2^{\circ-}$ and OH° and to assess unknown kinetic parameters (rate constant and activation energy and iron reactivity) by comparison of calculations to measurements. The experimental results show: (1) a synergistic effect of oxidants and temperature on oxidations (2) a significant effect of counter ions and pH on iron complexes and oxidation levels (3) a significant effect of oxidants and antioxidants on oxidation. Controversial rate constants and activation energies of some reactions as well as iron reactivity coefficients were adjusted. The predictions of the stoichio-kinetic model reproduce experimental trends except for high reactants concentrations, for extreme temperatures and for some antioxidants. A global optimization of k , E_a and iron reactivities values could improve predictive results.

Keywords: iron, oxidation, free radicals, rate constants, modelling, iron reactivity, energy activation, meat process

