HAL
open science

Authentification de l'alimentation des ruminants par analyse des composés volatils de leur tissus adipeux

Guilhem Sivadier

To cite this version:

Guilhem Sivadier. Authentification de l'alimentation des ruminants par analyse des composés volatils de leur tissus adipeux. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008. Français. NNT : 2008CLF21890 . tel-00731275

HAL Id: tel-00731275

https://theses.hal.science/tel-00731275v1

Submitted on 12 Sep 2012

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.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

ECOLE DOCTORALE :

Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE de DOCTORAT

en

« Sciences des Aliments »

par

Guilhem SIVADIER

Authentification de l'alimentation des ruminants par analyse des composés volatils de leurs tissus adipeux

Soutenue le 2 Décembre 2008 devant la commission d'examen :

Pr. A. PRIOLO	University of Catania, ITALY	**Rapporteur**
Pr. S. CALDARELLI	UPCAM ISm2, Marseille	**Rapporteur**
Pr E. DUFOUR	ENITA, Clermont-Ferrand	**Examinateur**
Dr. D. PICQUE	INRA / Agro-Paris-Tech, Paris	**Examinateur**
Pr J.-B. GROS	Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand	**Examinateur**
Dr. E. ENGEL	INRA, Clermont-Ferrand	**Directeur de thèse**

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

ECOLE DOCTORALE :

Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE de DOCTORAT

en

« Sciences des Aliments »

par

Guilhem SIVADIER

Authentification de l'alimentation des ruminants par analyse des composés volatils de leurs tissus adipeux

Soutenue le 2 Décembre 2008 devant la commission d'examen :

Pr. A. PRIOLO	University of Catania, ITALY	**Rapporteur**
Pr. S. CALDARELLI	UPCAM ISm2, Marseille	**Rapporteur**
Pr E. DUFOUR	ENITA, Clermont-Ferrand	**Examinateur**
Dr. D. PICQUE	INRA / Agro-Paris-Tech, Paris	**Examinateur**
Pr J.-B. GROS	Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand	**Examinateur**
Dr. E. ENGEL	INRA, Clermont-Ferrand	**Directeur de thèse**

Je souhaite dédier ce travail, ...

À mon père

À ma famille, à Karl

À Delphine

Remerciements

Remerciements

Je remercie Messieurs Alessandro Priolo et Stefano Caldarelli, rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que l'ensemble des membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier Messieurs Jean-Pierre Renou, directeur de l'unité de recherche « Qualité des Produits Animaux » (QuaPA) de l'I.N.R.A., et Jean-Louis Berdagué, directeur du laboratoire « Traçabilité et Typicité Aromatique » (T_2A), pour m'avoir accueilli dans leur équipe et m'avoir donné tous les moyens nécessaires pour réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à exprimer une reconnaissance toute particulière à Monsieur Erwan Engel pour avoir accepter de diriger ce travail. Me laissant toute l'autonomie dont j'avais besoin, il s'est montré disponible, patient, et m'a fait partager, avec une grande gentillesse, ses compétences et sa rigueur scientifique.

Je remercie chaleureusement Jérémy Ratel, ingénieur d'étude, pour sa disponibilité, sa gentillesse, et l'aide précieuse qu'il m'a fourni à tous les niveaux.
Merci à Frédéric Mercier, Nathalie Kondjoyan et Patrick Blinet pour leur disponibilité, leur efficacité, et la gentillesse avec laquelle ils m'ont fourni aide et assistance à chaque fois que j'en avais besoin.

Que Pascal Tournayre, Philippe Berge, Saïd Abouelkaram, et toute l'équipe de Biosens® soient remerciés pour leur gentillesse et la disponibilité dont ils ont su faire preuve pour m'aider ou me permettre d'acquérir des connaissances nouvelles.

Merci à Michèle Balage de l'Unité de recherche sur la Nutrition Humaine (UNH) pour m'avoir permis d'utiliser leurs appareils pour la préparation de mes expériences. Je tiens à remercier également l'équipe de l'abattoir expérimental de l'Unité de Recherche sur les Herbivores (URH) de Monsieur Roland Jailler, à savoir Julien, Cédric, et le regretté Patrice, pour la gentillesse et la compétence dont ils ont fait preuve pour l'abattage des animaux et le prélèvement des échantillons.

Je remercie toute l'équipe T_2A, stagiaires et permanents, avec qui j'ai eu l'occasion de passer de très bons moments.

Merci à toute l'équipe des thésards et autres stagiaires pour leur amitié, leur soutien, et les bons délires : Jeff le bitnik, Benoist « rat-killer », Valentina, Manu (et son ami imaginaire), Cyril, Sam, Claire, Solène, Stéphanie, Joannie, Annabelle, et Tic et Tac « les thésards du risque ».

Je tiens à témoigner toute mon affection à ma famille et à Karl pour leur soutien tout au long de ces trois années de labeur. Enfin, plus que quiconque, je tiens à remercier Delphine pour son amour et pour m'avoir accompagné et soutenu.

Résumé / Abstract

Résumé

Il existe une forte demande sociétale de moyens analytiques robustes permettant d'authentifier de manière objective les modes d'élaboration des produits alimentaires, notamment lorsqu'ils sont d'origine animale.

L'objectif de cette thèse était de développer une méthode d'authentification de l'alimentation à l'herbe des agneaux, basée sur l'analyse de la fraction volatile de leurs tissus adipeux. Les animaux étudiés ont été élevés dans le cadre de dispositifs expérimentaux, où leur alimentation était étroitement contrôlée. Les tissus périrénal, sous-cutané caudal, et péricardiaque ont été analysés au moyen d'un système d'Espace de Tête Dynamique - Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (ETD-CPG-SM), dont le signal a été corrigé et stabilisé par différentes procédures chimiométriques.

La première étape de ce travail de recherche visait à identifier les traceurs distinctifs de tissus adipeux d'agneaux nourris soit à l'herbe soit aux concentrés. Une fois les conditions d'analyse des composés volatils optimisées, 126 traceurs de l'alimentation au pâturage ont été identifiés. Cette expérimentation a également permis de montrer l'intérêt de l'analyse parallèle de tissus de natures différentes pour la discrimination des deux alimentations.

La deuxième étape avait pour objectif de montrer l'intérêt de l'analyse de la fraction volatile de tissu adipeux d'agneau pour l'authentification des régimes alternés. Ces régimes, couramment utilisés pour l'élevage des ruminants consistent à alterner une période d'alimentation au pâturage avec une finition aux concentrés, ou inversement. Les variations des abondances des traceurs volatils d'une alimentation au pâturage ont été suivies dans les tissus adipeux d'animaux nourris avec ces régimes alternés. Les résultats montrent que les composés volatils permettent de discriminer des tissus adipeux d'animaux nourris d'une part à l'herbe et finis aux concentrés pour un engraissement final de 0, 4, 8, ou 12 kg ; et d'autre part aux concentrés et finis au pâturage durant 0, 17, 51, ou 85 jours.

Couplés aux données de la littérature, l'ensemble des dispositifs d'élevage mis en œuvre au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence 19 composés volatils traceurs de l'alimentation à l'herbe particulièrement robustes et génériques. Ces travaux démontrent également la faisabilité de l'authentification de l'alimentation d'animaux nourris au moyen de régimes contrastés ou alternés. Enfin, ils confirment également l'intérêt des procédures de traitement du signal, comme la correction des dérives instrumentales ou l'utilisation de ratios de variables, pour amplifier le pouvoir discriminant des modèles d'authentification.

Mots Clefs : Authentification des aliments, alimentation au pâturage, ruminants, composés volatils, tissus adipeux, latence, persistance, CPG-SM, correction des dérives instrumentales.

Abstract

There is an increasing consumer demand for robust analytical tools for objective authentication of the processing practices in food production chains, in particular for animal products.

The aim of this work was to develop an authentication tool of grass feeding in lambs by analysing the volatile fraction of their adipose tissues. The animals were raised under experimental conditions allowing a strict control of feeding. The perirenal, caudal sub-cutaneous, an heart fat tissues were analysed by Dynamic Headspace - Gas Chromatography - Mass Spectrometry (DH-GC-MS). The analytical signal was stabilized and the drifts were corrected by using chemometrics tools.

The purpose of the first step of the study was to identify the compounds discriminating the adipose tissues of lambs fed either pasture or concentrate. Using an improved analytical procedure, 126 pasture diet tracers were identified. This experiment also showed the interest of analyzing different types of adipose tissues in parallel for discriminating the two diets.

The second step of the study aimed at assessing the relevance of the volatile fraction of lamb adipose tissues to authenticate alternate diets. These diets, widely used for the ruminant rearing, consist in switching from pasture to a concentrate based diet before slaughter, or vice versa. The variations in the amounts of pasture diet volatile tracers were monitored in different adipose tissues of lambs fed with such alternate diets. Volatile compounds enabled to discriminate lambs fed at pasture then finished on a concentrate diet for periods corresponding to 0, 4, 8, or 12 kg of the final weight gain. Likewise, the lambs fed concentrate and finished at pasture for periods corresponding to 0, 17, 51, 85 days were successfully discriminated.

In addition to litterature data, all the experimental rearing systems used in this work allowed to reveal 19 particularely robust and generic volatile tracers of pasture diet. This work evidenced the feasibility of the authentication of feeding practices of lambs fed alternate diets. It also reinforces the ability of procedures of analytical signal treatment like instrumental drifts correction and ratios of variables to improved the discrimination power of authentication models.

Keywords : Food Authentication, Pasture feeding, ruminants, volatile compounds, adipose tissues, latency, persistence, GC-MS, instrumental dirfts correction.

Sommaire

SOMMAIRE

INTRODUCTION ---------- **1**

Chapitre I. : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ---------- **3**

1. Alimentation des ruminants et qualité des produits animaux. ---------- **4**

1.1. Qualité nutritionnelle ---------- **4**

1.1.1. Les acides gras ---------- 4

1.1.2. Les antioxydants ---------- 6

1.1.3. Les minéraux ---------- 6

1.2. Qualité sanitaire ---------- **7**

1.2.1. Les métaux lourds ---------- 8

1.2.2. Polluants Organiques Persistants (POPs) ---------- 8

1.2.3. Pesticides ---------- 9

1.2.4. Les mycotoxines ---------- 10

1.2.5. Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) ---------- 11

1.3. Qualité Sensorielle ---------- **12**

1.3.1. Lait et produits laitiers ---------- 12

1.3.1.1. Couleur ---------- *12*

1.3.1.2. Flaveur ---------- *12*

1.3.2. Viande et produits carnés ---------- 13

1.3.2.1. Couleur ---------- *13*

1.3.2.2. Flaveur ---------- *13*

1.3.2.3. Jutosité ---------- *14*

1.3.2.4. Tendreté ---------- *14*

1.4. La perception de la qualité du produit animal par le consommateur ---------- **15**

2. Les constituants traceurs de l'alimentation ---------- **16**

2.1. Les traceurs non-volatils ---------- **16**

2.1.1. Les isotopes ---------- 16

2.1.2. Les vitamines A et E ---------- 18

2.1.3. Les caroténoïdes ---------- 19

2.1.4. Les polyphénols ---------- 20

2.1.5. Les acides gras ---------- 20

2.2. Les traceurs volatils ---------- **21**

2.2.1. Les principaux traceurs volatils identifiés de l'alimentation des ruminants ---------- 22

2.2.2. Les limites des études précédentes ---------- 24

3. Les verrous de l'analyse des composés volatils pour l'authentification de l'alimentation des animaux ---------- **25**

3.1. L'extraction des composés volatils ---------- **25**

3.1.1. Choix de la technique d'extraction ---------- 26

3.1.2. Choix de la matrice analysée ---------- 27

3.1.3. Prétraitement de l'échantillon ---------- 27

3.2. Caractérisation du potentiel informatif de la fraction volatile ---------- **28**

3.2.1. Evaluation rapide du potentiel informatif ---------- 28

3.2.2. Recherche détaillée des composés volatils ---------- 29

3.2.3. Mise en évidence des composés traceurs ---------- 30

3.3. Stabilisation du signal analytique ---------- **30**

Chapitre II :

Optimisation de l'analyse des composés volatils, et identification des traceurs de l'alimentation ---------- **32**

1. Publication n°1 ---------- **34**

2. Complément de discussion sur l'étude des traceurs volatils de l'alimentation chez l'agneau ---------- **44**

Chapitre III :

Persistance de disparition des traceurs de l'alimentation au pâturage dans les tissus adipeux d'agneaux d'herbe finis aux concentrés ---------- **45**

1. Publication n°2 ---------- **46**

2. Complément de discussion sur l'étude de la persistance des traceurs volatils de l'alimentation au pâturage ---------- **59**

Chapitre IV :

Latence d'apparition de traceurs de l'alimentation au pâturage dans les tissus adipeux d'agneaux nourris aux concentrés et finis à l'herbe ---------- **60**

1. Publication n°3 ---------- **61**

2. Complément de discussion sur l'étude de la latence des traceurs volatils de l'alimentation au pâturage ---------- 69

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ---------- 70

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ---------- 73

Introduction

INTRODUCTION

Les consommateurs sont de plus en plus demandeurs de garanties relatives à la qualité et à la sécurité sanitaire des produits alimentaires, notamment lorsqu'ils sont d'origine animale. En ce qui concerne les produits carnés, ce besoin croissant est notamment la conséquence des crises sanitaires qui ont frappé les filières, et de pratiques de gestion des risques parfois inappropriées. La directive européenne CE n°178/2002 imposant la traçabilité des informations documentaires relatives aux chaînes de production agroalimentaires offre une première réponse à cette demande sociétale. Mais les documents sont falsifiables et il est indispensable de développer en complément des moyens robustes pour authentifier à partir d'une analyse du produit les informations clefs véhiculées par cette traçabilité papier.

Au centre d'un certain nombre de crises récentes, les produits carnés s'imposent comme des objets de recherche privilégiés et certaines questions relatives à leurs modes d'élaboration méritent d'être traitées en priorité compte tenu de leurs fortes répercussions sur la qualité. L'authentification de l'alimentation des animaux constitue un objectif prioritaire compte tenu de ses enjeux nutritionnels, sanitaires et organoleptiques et de l'absence de solutions analytiques robustes et génériques sur le sujet. À ce titre, la distinction entre une alimentation à l'herbe et une alimentation à base de concentrés est probablement la question pour laquelle la réflexion au sein des filières est la plus avancée. Comme l'ont montré plusieurs travaux antérieurs, les constituants volatils des tissus des ruminants sont extrêmement sensibles aux conditions de production des animaux, et en particulier à leur alimentation. L'objectif de ce travail de thèse est de montrer la faisabilité de l'authentification robuste de l'alimentation à l'herbe des ruminants à partir de l'analyse par spectrométrie de masse de tissus particulièrement riches en composés volatils, les tissus adipeux.

Le premier chapitre a vocation de présenter le contexte scientifique du sujet. Après avoir rappelé l'importance du régime alimentaire reçu par les ruminants, au cours de leur élevage, sur les différentes dimensions de la qualité des produits animaux, nous discuterons la pertinence d'utiliser les constituants volatils comme traceurs de l'alimentation. Enfin, nous examinerons les principaux verrous analytiques à lever pour exploiter de manière optimale l'information dont sont porteurs les composés volatils.

Les chapitres suivants présentent les résultats expérimentaux de cette thèse sous forme de publications introduites dans le manuscrit et complétées par des commentaires. Le chapitre 2 présente un premier volet de ces recherches visant à mettre en évidence des traceurs volatils génériques et robustes d'une alimentation au pâturage. Ces recherches sont menées sur des tissus adipeux d'animaux nourris avec des régimes volontairement

contrastés (herbe v_s aliment à base de concentrés). La pertinence des développements analytiques réalisés pour révéler de manière optimale l'information dont est porteuse la fraction volatile est discutée. En s'appuyant sur ces résultats, les chapitres 3 et 4 montrent, comment, lorsqu'elle est associée à des traitements chimiométriques appropriés, l'analyse de la fraction volatile des tissus adipeux peut être utilisée pour distinguer des régimes plus fidèles des conditions de production réelles. Il s'agit de régimes « alternés » où se succèdent, pour des motifs souvent zootechniques, des périodes d'alimentation exclusive au pâturage ou aux concentrés.
Un ultime chapitre présentera les principales conclusions et perspectives de cette thèse.

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes :

Articles parus dans des périodiques à comité de lecture

1- Sivadier G., Ratel J., Bouvier F., Engel E. "Authentication of Meat Products: Determination of Animal Feeding by Parallel GC-MS Analysis of Three Adipose Tissues." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 56 (21), 9803-9812.

2- Sivadier G., Ratel J., Engel E. "Authentication of meat products: Persistence of pasture-feeding biomarkers in lambs determined by GC-MS analysis of their adipose tissues." Food Chemistry, *Accepeted*.

3- Sivadier G., Ratel J., Engel E. "Authentication of meat products: Determination of latency and persistence of diet volatile tracers in lambs by GC-MS analysis of their adipose tissues." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 57 (2), 645-652

Communications

4- Sivadier G., Ratel J., Engel E. "Authentication of the type of feeding given to farm animals by GC-MS analysis of their fat tissues." *32nd International Symposium on Capillary Chromatography*, Riva Del Garda, Italia, May 27-30.

Chapitre I : Contexte Scientifique

Chapitre I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Cette synthèse bibliographique a pour ambition de faire un état des lieux des connaissances nécessaires afin d'entreprendre l'authentification de l'alimentation des ruminants par analyse de la composition de leurs tissus.

Les recherches que nous menons doivent permettre de proposer des méthodes robustes et infalsifiables pour répondre à des questions à fortes répercussions sur la qualité du produit. Dans une première partie, nous montrerons en quoi l'alimentation des animaux est une information clef, susceptible d'influencer de manière déterminante les propriétés nutritionnelles, sanitaires, sensorielles du produit animal, ainsi que sur l'image que s'en fait le consommateur.

Une fois la question de l'authentification posée, il s'agit d'identifier les biomarqueurs ou « traceurs » les plus adaptés pour y répondre. Dans une seconde partie, nous montrerons l'intérêt particulier des composés volatils. Nous nous appuierons pour cela sur une analyse critique des traceurs utilisés dans la littérature pour différencier des régimes alimentaires de ruminants.

Enfin, il convient d'identifier la méthode la plus adaptée pour analyser ces traceurs dans l'échantillon, puis d'adapter son utilisation au produit alimentaire étudié. Dans une troisième partie de cette synthèse bibliographique, nous présenterons donc les principaux verrous à lever pour proposer une analyse fidèle, fiable et sensible des composés volatils issus des produits carnés.

1. Alimentation des ruminants et qualité des produits animaux.

L'étude de l'influence de l'alimentation des ruminants sur la qualité des produits laitiers et carnés a fait l'objet d'un grand nombre de travaux depuis le début des années 70. Dans une optique d'amélioration de la qualité des produits animaux, ces recherches ont pour objectif d'identifier les constituants influencés par l'alimentation qui ont une influence déterminante sur différentes dimensions de la qualité.
Les dimensions nutritionnelles, sanitaires et sensorielles ont fait l'objet d'une attention particulière. De récentes études se sont également intéressées à l'impact de l'alimentation des animaux sur son image vis-à-vis du consommateur.

1.1. Qualité nutritionnelle

Les produits carnés (Scollan *et al.*, 2006 ; Biesalski 2005 ; Valsta *et al.*, 2005 ; Williamson *et al.*, 2005) et laitiers (lait, fromages, beurre, Haenlein 2002 et 2004) issus des ruminants sont connus pour être une source privilégiée d'acides gras bénéfiques pour la santé humaine, d'antioxydants et de minéraux. La plupart de ces constituants sont présents dans l'alimentation des animaux et sont transférés dans leurs tissus et fluides.

1.1.1. Les acides gras

Parmi les facteurs identifiés comme influençant les teneurs en acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) dans les produits laitiers (Agabriel *et al.*, 1995 et 2001 ; Ferlay *et al.*, 2006) et carnés (Wood *et al.*, 2003 ; Warren *et al.*, 2008), l'alimentation des animaux est un déterminant majeur.
Des études épidémiologiques ont permis de déterminer que les AGS, notamment de 12:0 à 16:0 (Mitchell & Mc Leod, 2008), et les AGMI-*trans* sont athérogènes. Les AGS constituent également l'une des principales causes d'obésité (Darnton-Hill *et al.*, 2004), tandis que certains isomères d'AGMI-*trans* sont considérés aussi comme carcinogènes (Crupkin & Zambelli, 2008). À l'inverse, les AGMI ont un effet positif sur la santé humaine, et notamment sur l'obésité (Williams 2000) et l'athérosclérose (Noakes *et al.*, 1996). De même, les AGPI n-3 (la première insaturation de la chaîne carbonée est située entre le 3ème et 4ème carbone à compter de l'extrémité carboxylique « -COOH »), et notamment l'acide linolénique (18:3 n-3), sont particulièrement recherchés (AFSSA, 2001) du fait de leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine (Chilliard *et al.*, 2008).

Tableau 1. Comparaison de la consommation en lipides de la population française en 2005 : teneurs relatives en acides gras par rapport à l'apport énergétique total

	Recommandées	France (2005)
Lipides totaux	15 - 30 %	40 - 55 %
AGS	< 10 %	25 %
AGPI	6 - 10 %	3 - 7 %
n-6 AGPI	5 - 8 %	7,5 - 10 %
n-3 AGPI	1 - 2 %	0,3 - 0,5 %
acides gras *trans*	< 1 %	3 %
[a] AGPI / AGS	> 0,45	0,1 - 0,3
[b] n-6 / n-3	< 4,0	
18:2 n-6 / 18:3 n-3	< 5,0	15 - 30

[a] AGPI / AGS est calculé selon (18:2n-6 + 18:3n-3) / (14:0 + 16:0 + 18:0).

[b] n-6 / n-3 est calculé selon (18:2n-6 + 20:3n-6 + 20:4n-6 + 22:4n-6) / (18:3n-3 + 20:4n-3 + 20:5n-3 + 22:5n-3 + 22:6n-3).

AGPI = Acides Gras Polyinsaturés
AGS = Acides Gras Saturés

D'après AFSSA 2001 et 2005 ; WHO 2003

Tableau 2. Effet du régime sur la composition du gras intramusculaire du *Longissimus Dorsi* en acides gras chez le bœuf (g/100g AG estérifiés)

Acides Gras	Ensilage et Concentrés	Herbe (g/kg de matière sèche)				déviation standard	Significativité statistique de l'influence du régime
		0	510	770	1000		
10:0	0,25 [a,b]	0,13 [c]	0,17 [b,c]	0,31 [a]	0,12 [c]	0,021	*
12:0	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,003	NS
14:0	2,76	2,34	2,52	2,61	2,71	0,049	NS
14:1	0,63	0,6	0,59	0,66	0,66	0,022	NS
15:0	0,58	0,59	0,61	0,62	0,66	0,16	NS
16:0	26,55 [a]	27,4 [a]	24,72 [b]	24,07 [b]	22,84 [c]	0,291	***
16:1	3,73	3,98	3,86	3,82	3,88	0,057	NS
17:0	1,2	1,22	1,17	1,19	1,2	0,018	NS
17:1	0,97	1,19	1,05	0,99	1,05	0,026	0,06
18:0	16,04	15,95	16,13	15,51	14,72	0,273	NS
18:1	39,47	38,64	38,62	39,61	40,58	0,255	NS
18:2	2,6	2,96	2,6	2,32	2,11	0,105	NS
18:2 (ALCs)	0,47 [c,d]	0,37 [b]	0,54 [b,c]	0,66 [b]	1,08 [a]	0,04	***
18:3	0,71 [d]	0,72 [d]	0,87 [c]	1,01 [b]	1,13 [a]	0,031	***
20:0	0,05	0,23	0,04	0,23	0,09	0,032	NS
20:1	0,07 [c]	0,04 [c]	0,06 [c]	0,28 [a]	0,12 [b]	0,028	*
20:2	0,09 [b,c]	0,07 [c]	0,14 [bc]	0,17 [b]	0,34 [a]	0,027	*
20:5	0,2	0,12	0,27	0,24	0,23	0,023	NS
20:3	0,14 [c,d]	0,09 [d]	0,17 [c]	0,26 [b]	0,38 [a]	0,024	***
20:4	0,14	0,1	0,21	0,3	0,32	0,029	NS
AGS	47,72 [a]	48,07 [a]	45,71 [b]	44,86 [b]	42,82 [c]	0,415	***
AGMI	41,83	41,48	40,9	42,31	43,07	0,249	0,08
AGPI	4,14 [a]	4,93 [a]	4,53 [a]	4,71 [a]	5,35 [b]	0,29	0,05
n-6	2,96	3,21	3,12	3,04	3,14	0,106	NS
n-3	0,91 [c]	0,84 [c]	1,13 [b]	1,25 [a,b]	1,36 [a]	0,042	***
n-6/n-3	3,61 [a]	4,15 [a]	2,86 [b]	2,47 [b]	2,33 [b]	0,197	**
AGPI/AGS	0,09 [a]	0,09 [a]	0,1 [a]	0,11 [a,b]	0,13 [b]	0,007	**

[a,b,c,d] Les valeurs comportant une annotation différente sur une même ligne sont trouvées significativement différentes (p<0.05).
NS P>0.05 ; * P <0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001.

14 :1 = Désigne un acide gras formé par une chaîne linéaire de 14 atomes carbones et comportant 1 insaturation.
n-6 = Désigne tous les AGPI n-6 quantifiés par l'auteur (non-précisé)
n-3 = *idem*
ALCs = Acides Linoléiques Conjugués ; AGPI = Acides Gras Polyinsaturés ; AGMI = Acides Gras Monoinsaturés ; AGS = Acides Gras Saturés

Les AG estérifiés ont été analysés par Chromatographie Gaz-Liquide couplée à un détecteur à Ionisation de Flamme.

D'après French *et al.* (2000).

Tableau 3. Effet du régime sur la composition du lait en Acides Gras chez la vache (g/100g AG estérifiés)

Acides Gras	Régime					déviation standard	Significativité statistique de l'influence du régime
	Concentrés	Ensilage de maïs	Ensilage d'herbe	Foin	Pâturage de montagne		
4:0	4,28	4,46	4,88	4,22	4,54	0,17	NS
6:0+8:0	4,75	4,35	4,38	4,06	5,75	0,73	NS
10:0+12:0+14:0	21,86	19,28	18,66	19,55	19,93	0,69	0,06
16:0	33,47 [c]	30,96 [a,b]	32,13 [b,c]	30,22 [a,b]	28,59 [a]	0,86	<0,01
18:0	6,65 [a]	7,89 [b]	7,93 [b]	8,16 [b]	8,13 [b]	0,33	0,02
cis-9-18:1	14,09 [a]	16,66 [b]	15,97 [b]	15,38 [a,b]	15,97 [b]	0,55	0,03
trans-11-18:1	0,62 [a]	1,04 [b]	0,87 [a,b]	1,83 [d]	1,36 [c]	0,11	<0,01
cis-9-*cis*-12-18:2	1,77 [c]	1,46 [b]	1,09 [a]	1 [a]	1,08 [a]	0,07	<0,01
cis-9-*trans*-13-18:2	0,11 [a]	0,23 [c]	0,18 [bc]	0,21 [c]	0,16 [b]	0,02	<0,01
cis-9-*cis*-12-*cis*-15-18:2	0,46 [b]	0,24 [a]	0,94 [c]	1,02 [c]	1,25 [d]	0,07	<0,01
cis-9-*trans*-11-18:2	0,39 [a]	0,66 [b]	0,46 [a]	0,87 [c]	0,71 [b]	0,05	<0,01

[a,b,c,d] Les valeurs comportant une annotation différente sur une même ligne sont trouvées significativement différentes (p<0.05).

NS P>0.05 ; * P <0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001.

cis-9-*trans*-13-18:2 = Désigne un acide gras formé par une chaîne linéaire de 18 atomes carbones et comportant 2 insaturations : l'une en position *cis* et l'autre en *trans*.

Les AG estérifiés ont été analysés par Chromatographie Gaz-Liquide couplée à un détecteur à Ionisation de Flamme.

D'après Ferlay *et al.* (2006).

Les organismes de santé français (AFSSA, 2001 et 2005) et internationaux (WHO, 2003) préconisent le respect de certaines proportions d'AG en fonction de l'apport énergétique total (tableau 1), afin de prévenir les risques de maladies chroniques, telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, la résistance à l'insuline et l'obésité (De La Torre *et al.*, 2006 ; Simopoulos 2004). Afin de satisfaire à ces recommandations, les travaux menés sur les produits animaux de ruminants ont principalement porté sur la réduction des teneurs en AGS et en AGPI n-6, et l'augmentation des AGPI n-3 (Chilliard *et al.*, 2008 ; Leaf *et al.* 2003).

De nombreux travaux ont été consacrés à la détermination des mécanismes de formation ou de transfert de ces composés dans les tissus et fluides des ruminants en réponse à leur alimentation, dans l'optique de moduler leurs teneurs finales dans les produits laitiers et carnés.

Selon French *et al.*, (2000), l'herbe est riche en AGPI n-3 et contient peu d'AGPI n-6 et d'AGS, contrairement aux alimentations à base de concentrés. Comme le montre le tableau 2, une augmentation de la durée de finition à l'herbe chez le bovin se traduirait, dans le gras intramusculaire, par une diminution du ratio n-6/n-3 et de la teneur en AGS, accompagnée par une augmentation du ratio AGPI/AGS et de la teneur en AGPI n-3 (principalement du 18 :3 n-3). Des tendances similaires ont été observées par Ferlay *et al.*, (2006) pour des laits de bovins en comparant différents types de rations alimentaires (tableau 3). Ces résultats indiquant un effet bénéfique de l'alimentation à l'herbe sur les produits animaux sont confirmés par la revue de Chilliard *et al.*, (2008).

Cependant l'activité de bio-hydrogénation du rumen des animaux joue un rôle prépondérant dans la production d'acides gras néfastes à partir d'acides gras insaturés. Il s'agit notamment de la formation d'AGS (Ferlay *et al.*, 2006) et des AGMI-*trans* (Ledoux *et al.*, 2007). Ainsi, la modulation d'une catégorie d'AG par une modification globale du régime est possible, mais elle peut entraîner simultanément des modifications indésirables sur d'autres AG. De même, la supplémentation en huiles végétales ou animales des rations données aux animaux - une pratique couramment utilisée en Europe (Chilliard *et al.*, 2008) -, permet de moduler de manière plus ciblée les teneurs de certains AG dans les tissus animaux et le lait (Roy *et al.*, 2006 ; Loor *et al.*, 2005 ; Chilliard *et al.*, 2001), mais ne permet pas pour autant de maîtriser les réactions se produisant dans le rumen.

L'addition de lipides « protégés » dans les rations données aux animaux se révèle être le seul moyen de contourner les phénomènes de saturation des AG par le rumen. Différentes méthodes de protection des lipides ont été mises au point : l'encapsulation dans une coque formée de protéines tannées au formaldéhyde, la saponification par le calcium, et la cristallisation. L'encapsulation permet ainsi une augmentation significative de l'absorption intestinale d'AGPI ayant échappés à la bio-hydrogénation du rumen (Chilliard *et al.*, 1993 ;

Tableau 4. Teneur en vitamines A et E des principaux aliments des ruminants : vaches laitières, bovins à viande, et petits ruminants (UI/kg de Matière Sèche).

Aliments	Vitamine A (x 1000)	Vitamine E
Céréales	1,5 - 2	15 - 30
Tourteaux		15 - 20
Pulpes de betterave déshydratées	100	12
Luzerne déshydratée	0,06 - 80	150 - 200
Fourrages verts		
Prairies permanentes	100	20
Graminées	80	20
Légumineuses	120	100
Ensilages		
Prairies permanentes	8	5
Maïs	5	5
Graminées	8	5
Légumineuses	3	5
Foins		
Prairies permanentes	45	10
Graminées	50	5
Légumineuses	45	10

D'après Meschy (2007)

Tableau 5. Apports Journaliers Recommandés en vitamines (UI/kg de Matière Séche), selon la proportion d'aliments concentrés dans la ration

Aliments	Moins de 40 % de concentrés	Plus de 40 % de concentrés	Limite de toxicité
Vitamine A			
Lactation	4200	6600	66000
Gestation	6000	9000	
Vitamine E			
Lactation	15	40	2000
Gestation	25	-	

D'après Meschy (2007)

Jenkins & Bridges, 2007), ce qui conduit à l'augmentation des teneurs en AG d'intérêts dans le gras intramusculaire et le lait.

La modulation des AG dans les tissus musculaires et dans le lait des ruminants, dans le sens des recommandations faites par les organismes sanitaires, est donc réalisable, mais n'a finalement de sens que si l'on étudie le devenir de ces composés lors des différentes étapes de transformation subies par le produit animal avant sa consommation. Il s'agit en particulier d'étudier l'incidence de la maturation et de la cuisson de la viande, ou encore celle de la transformation du lait en fromage.

1.1.2. Les antioxydants

Les flavonoïdes, les polyphénols, et les vitamines A et E sont les principaux antioxydants de la viande et du lait chez les ruminants. Leur capacité à inhiber la saturation des lipides leur confère un double rôle bénéfique : la prévention de cancers et de maladies cardio-vasculaires chez l'homme (O'Connell & Fox, 2001 ; Moloney *et al.*, 2001 ; BNF 1999) et l'extension de la durée de conservation des produits carné et laitiers (Decker *et al.*, 2000). Ces composés sont naturellement présents dans les plantes : les caroténoïdes (principalement le β-carotène) sont les précurseurs de la vitamine A (mélange du rétinol et de ses dérivés), via un mécanisme de clivage oxydatif qui s'opère dans les tissus musculaires et mammaires (Yang & Tume, 1993). La vitamine E (Collakova & Dellapenna, 2003), les flavonoïdes et les polyphénols (O'Connell & Fox, 2001 ; Fraisse *et al.*, 2007) sont en revanche synthétisés directement dans la plante, principalement chez les Dicotylédones.
Les teneurs en vitamines des différents types de régime donnés aux animaux sont présentées dans le tableau 4, et on constate que les valeurs maximales correspondent aux fourrages verts. Ainsi, l'alimentation au pâturage induit des teneurs particulièrement élevées en ces composés dans leurs tissus musculaires et dans le lait (Descalzo *et al.*, 2005 et 2008). Les mêmes constations ont été faites en ce qui concerne les flavonoïdes et les polyphénols (Prache *et al.*, 2007).
Afin d'augmenter les teneurs en ces composés au sein des produits animaux, leur supplémentation est couramment pratiquée, et notamment dans l'élevage intensif (tableau 5 - Meschy 2007).

1.1.3. Les minéraux

Dans l'alimentation humaine, la plupart des minéraux sont apportés par les végétaux. Néanmoins, la viande et les produits carnés demeurent une source essentielle en Fer, Zinc, et Sélénium (Biesalski 2005), comme le montre le tableau 6.

Tableau 6. Apports nutritionnels conseillés (ANC) et teneur en quelques nutriments de la viande et du foie de bovins

	Apports Nutritionnels Conseillés (/ jour)	Teneurs moyennes (/ 100 g)	
		Viande	Foie
Fer	9 mg	0,3 à 3 mg	6 mg
Zinc	12 mg	5 à 6 mg	4 à 12 mg
Sélénium	60 µg	6 à 8 µg	40 à 100 µg
Phosphore	750 mg	150 à 250 mg	320 mg
Sodium	Excédentaire; pas d'ANC	50 à 80 mg	92 mg
Potassium	Excédentaire; pas d'ANC	250 à 400 mg	365 mg

D'après AFSSA 2001 et Rock (2002)

Tableau 7. Concentrations en minéraux dans le lait de vache en fonction de leur régime, et comparaison avec les Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) chez l'humain.

		Régimes		
		Pâturage / Fourrage (/ L)	Concentrés (/ L)	Teneurs journalières conseillées (/ 100g)
Fer	*(mg)*	0,27	0,1	18
Zinc	*(mg)*	3,7	2	15
Sélénium	*(µg)*	4	2	70

D'après Knowles *et al.* (2006) et AFSSA 2001

Le Fer se présente sous deux formes, héminique ou non-héminique, et seule la première, disponible principalement dans les produits carnés, est assimilable *via* l'intestin par l'organisme humain (Williamson *et al.*, 2005). Les carences en Fer sont répandues dans les pays développés (Preziosi *et al.*, 1994), et ce, quelle que soit la tranche d'âge (Nathan *et al.*, 1996 ; Ball & Bartlett, 1999 ; Wells *et al.*, 2003). Le Zinc est un cofacteur de nombreuses enzymes, c'est-à-dire qu'il est un adjuvant indispensable à certaines de leurs actions. En Europe, il est déficitaire chez les enfants (Hambidge & Krebs, 2007) et les personnes âgées (Lukito *et al.*, 2004). Enfin, le Sélénium, également cofacteur enzymatique, aurait un rôle protecteur contre de nombreux cancers et maladies cardiovasculaires (Rayman 2000).

La quantité d'oligoéléments entrant dans la chaîne alimentaire (tableau 7) via les plantes consommées par les ruminants est fonction de leur concentration dans le sol (Knowles *et al.*, 2006). Ces concentrations fluctuent selon la nature des sols, et sont généralement insuffisantes en Europe (Reilly 1996). L'effet de l'alimentation des animaux sur la teneur en minéraux dans leurs tissus dépend donc plus de la localisation géographique de la zone d'élevage que du type d'alimentation. En accord avec les recommandations d'enrichissement des produits alimentaires en minéraux, les éleveurs ont couramment recours à la supplémentation des régimes des animaux à l'aide de ces composés (Meshy 2007).

Cette pratique a cependant un effet limité sur l'amélioration de la nutrition en minéraux chez le consommateur dans le cas des produits alimentaires subissant des étapes de transformation avant consommation. Par exemple, les procédés de cuisson de la viande peuvent altérer la biodisponibilité de ces composés, notamment en ce qui concerne le Fer (Lombardi-Boccia *et al.*, 2005).

1.2. Qualité sanitaire

Cette dimension de la qualité fait référence à la présence, dans les produits animaux, d'un certain nombre d'éléments pouvant nuire à la santé du consommateur. En dehors des aspects nutritionnels évoqués ci-dessus, cela concerne la présence de polluants environnementaux ou de micro-organismes néfastes. Ce dernier paramètre, dépendant principalement des étapes de biotransformation, de conditionnement et / ou de préparation du produit animal, et non des pratiques d'élevage, ne sera pas traité ici. En ce qui concerne les différents types de contaminants environnementaux, ils sont eux susceptibles d'être transférés dans les muscles, les tissus adipeux ou le lait des ruminants via leur alimentation.

1.2.1. Les métaux lourds

Ces polluants intègrent la chaîne alimentaire en étant drainés par le sol puis accumulés dans les plantes, avant d'être absorbés par les ruminants (Mc Grath *et al.*, 2001). Parmi eux figurent des métaux hautement toxiques, comme le Cadmium, le Plomb, le Mercure, le Platine, le Palladium et le Chrome, ainsi que des oligoéléments dont la forte concentration représente un danger pour la santé des animaux et des consommateurs, comme le Zinc, le Cuivre, le Nickel, et le Sélénium. De par leur persistance dans l'environnement et leur carcinogénicité, ces métaux représentent une menace importante pour la santé humaine (Lone *et al.*, 2008, Thompson & Bannigan, 2008).

Le degré de contamination des sols dépend de la proximité et de la nature de la source polluante (Prechthai *et al.*, 2008). Les voies de contamination peuvent être les mines d'extraction de métal désaffectées (Hernández & Pastor, 2008), les cimenteries (Abimbola *et al.*, 2007), les réseaux routiers (Ducoulombier-Crepineau *et al.*, 2007), et les décharges (Gupta *et al.*, 2008). Les contaminations peuvent également provenir de systèmes d'irrigation pollués (Prechthai *et al.*, 2008), ainsi que de l'épandage de boues de stations d'épuration en plein champ (Lone et al., 2008).

À notre connaissance, il n'est pas fait mention dans la bibliographie d'un quelconque lien significatif entre la présence de métaux lourds dans les produits animaux et la nature du régime des ruminants. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les végétaux susceptibles d'être contaminés peuvent entrer dans la composition de l'un ou l'autre des régimes.
Des études menées sur les cinétiques de transfert et de stockage de ces métaux, dans le lait, les tissus musculaires, le foie et les reins des ruminants, comme celles de Ducoulombier-Crepineau *et al.* (2007) et Phillips *et al.* (2004), révèlent des taux de transfert et des persistances caractéristiques à chaque métal. Cette dernière étude montre la possibilité de limiter les effets néfastes de certains métaux lourds (Cadmium) et de favoriser leur excrétion par la modulation des teneurs en autres métaux (Zinc).

1.2.2. Polluants Organiques Persistants (POPs)

Les POPs sont des molécules caractérisées par une haute toxicité pour la santé humaine, une persistance importante conférée par leur résistance aux procédés de dégradation biologique naturels, et une bioaccumulation dans les tissus du vivant.

Cette classe de polluants regroupe les PolyChloroBiphényls (PCBs), les Chlordécones, les dioxines (PolyChloroDibenzo-p-Dioxines ou PCDDs), ainsi que certains furanes (PNUE 2001). Ce sont typiquement des sous-produits des usines de fabrication de pesticides, ou

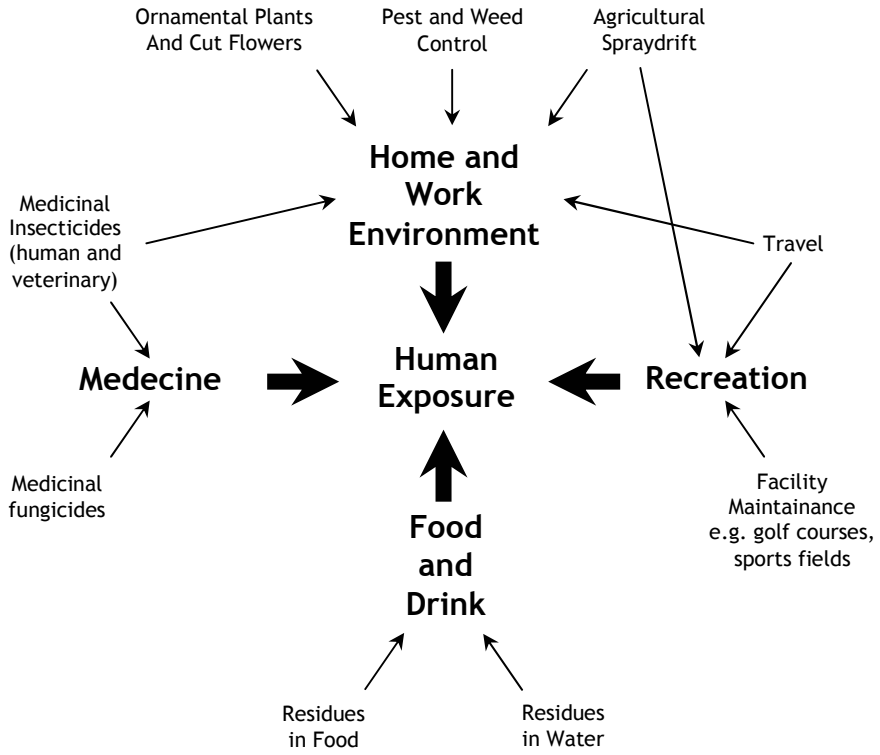

Figure 1. Schéma des différentes voies de contamination de l'organisme humain par les pesticides.

D'après Mc Kinlay *et al.* (2008b)

des produits de combustions incomplètes (usine de ciment, d'acier, incinérateurs, gaz d'échappements) qui se déposent par voie atmosphérique sur les végétaux et les sols (Welsch-Pausch *et al.*, 1995 et 1998 ; Thomas *et al.*, 1998). Les végétaux constituent une voie d'entrée privilégiée de ces contaminants dans les produits animaux (Rychen *et al.*, 2008 ; Costera *et al.*, 2006). Ainsi dans les produits laitiers, Krokos *et al.* (1996) et Fries & Paustenbauch (1990) ont constaté l'apparition de pics de contaminations correspondants aux périodes de mise au pâturage des animaux, par rapport aux périodes d'élevage à l'étable.

Cependant le lien entre la nature de l'alimentation et le risque de contamination des produits animaux avec des POPs n'est pas clair, dans la mesure où d'autres types de régimes que le pâturage peuvent également servir de vecteur de contamination. En effet, toute plante impliquée dans la composition d'un aliment aux concentrés (soja, luzerne, maïs) est susceptible d'être un vecteur. De même, les huiles de poisson couramment utilisées en supplémentation, (Chilliard *et al.*, 2008) peuvent constituer une source importante de contamination étant donné la capacité de ces animaux à accumuler les POPs présents dans l'eau (Dorea 2006).

1.2.3. Pesticides

Les pesticides peuvent se diviser en deux classes en fonction de la nature de leur toxicité : les cancérigènes-mutagènes-reprotoxiques (CMR), et les perturbateurs endocriniens (EDC - Endocrine Disrupting Chemical) (PAN 2005). Ces derniers sont particulièrement étudiés du fait de leur persistance environnementale et de leur aptitude à la bioaccumulation dans les tissus du vivant (Bucholski *et al.*, 1996). Les EDC sont définis comme « une substance exogène causant des effets négatifs chez un organisme sain, ou sur sa progéniture, à la suite de changements dans ses fonctions endocriniennes" (EEC 1996). Les principaux effets de ces composés sur l'homme sont décris dans la revue de Mc Kinlay *et al.* (2008a).

Parmi les différentes voies de contamination existantes (Figure 1 - Mc Kinlay *et al.*, 2008b), la voie alimentaire est la plus importante (Fryer *et al.*, 2006), à travers des produits d'autant plus susceptibles d'être contaminés qu'ils contiennent un taux élevé de graisses. Il s'agit dans ce cas de polluants lipophiles. Darnerud *et al.* (2006) et Bro-Rasmussen (1996) ont établi que les produits carnés et laitiers faisaient partie des vecteurs de contamination les plus importants, parmi un éventail des produits de la consommation courante. Les procédés utilisés pour la préparation de produits élaborés (cuisson, séchage, fermentation, etc.) ont de plus un effet très limité sur la dégradation de ces composés (Mirna & Coretti, 1979).

La contamination de l'eau et du sol par les pesticides (Sallam & Morshedy, 2008) provoque l'accumulation de ces composés dans les plantes (WHO, 1990). Cependant, comme pour les POPs ou les métaux lourds, le lien direct entre la contamination des produits animaux et la nature de leur alimentation n'est pas établi (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2005). En effet, les végétaux traités peuvent entrer aussi bien dans la composition de régimes à base de concentrés que de celle du pâturage.

1.2.4. Les mycotoxines

Ces toxines sont des métabolites secondaires que certaines moisissures produisent pour éliminer des bactéries et micro-organismes qui représentent une concurrence au sein de son biotope (Pittet 1998). Il existe plusieurs classes de mycotoxines, et les denrées les plus exposées à ces composés sont les céréales (25 % de la production mondiale serait contaminée selon la FAO, 2004). Elles ont en commun une forte stabilité thermique qui renforce leur présence dans les produits alimentaires transformés.

D'après la revue de Bories *et al.* (1979) :

Les aflatoxines sont produites par quelques espèces d'*Aspergillus* et sont principalement retrouvées sur les graines d'arachides et de coton, entrant couramment dans la composition des aliments concentrés donnés aux ruminants. Chez l'homme, ces composés ont une activité mutagène et cancérogène sur le foie chez l'Homme, notamment l'aflatoxine M1, qui se retrouve principalement dans le lait de bovin et d'ovin.

L'ochratoxine A est produite par certains *Penicillium* et contamine principalement les céréales et ses dérivés. Elle est reconnue comme cancérigène et tératogène pour les reins. Rapidement transférée dans le sang, elle est présente dans les tissus musculaires des ruminants.

La patuline est principalement produite par *Penicillium expensum*. Elle est retrouvée chez les animaux nourris aux fourrages secs ou ensilés, et perturbe la capacité fermentaire du rumen (Galtier *et al.*, 2008). Sa toxicité chez l'homme n'est pas avérée.

Les fumonisines sont produites par quelques *Fusarium*. La fumonisine B1 est la plus courante et se trouve principalement sur des céréales destinées à l'alimentation animale. Le taux de transfert aux ruminants est faible et ne cause donc qu'un faible degré de contamination des produits animaux (Galtier *et al.*, 2008). Elle est classée comme potentiellement cancérogène.

Les trichothécènes sont produits par de nombreuses espèces de *Fusarium* se développant sur les épis de céréales, et notamment l'orge et le maïs, fréquemment utilisés pour nourrir les ruminants. Ils ne sont ni cancérogènes, ni génotoxiques, mais à l'origine d'une

intoxication grave nommée « Aleucie ». Il s'agit d'une anémie sévère résultant d'une hémorragie, qui s'accompagne d'un déficit en leucocytes pouvant mener à l'aplasie.
Enfin, la zéaralénone, produite également par de nombreux *Fusarium*, contamine principalement le maïs et cause l'infertilité chez les ovins de par son activité oestrogénique. Le transfert dans les produits carnés et laitiers est cependant faible.

D'après la revue de Yiannikouris & Jouany (2002), ces mycotoxines sont susceptibles d'être intégrées aux différents types de régimes utilisés pour l'élevage des ruminants, à travers les éléments qui les composent. Par conséquent, la présence de ces composés dans les produits animaux ne peut être directement liée à l'alimentation au pâturage ou aux concentrés.

1.2.5. Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST)

Ce terme désigne un groupe de maladies neuro-dégénératives transmissibles à de nombreuses espèces, surtout chez les mammifères (Heim *et al.*, 2001), dont l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), mieux connue sous la dénomination de « maladie de la vache folle ». La forte variabilité de son temps d'incubation, notamment chez l'Homme (Fryer *et al.*, 2007), rend difficile l'estimation du nombre de contaminations.

Le facteur de contamination des animaux est quasiment exclusivement l'incorporation de produits d'équarrissage dans la composition des aliments pour bétail, en l'occurrence des concentrés contenant des farines animales. Ces éléments, désignés comme Matériaux à Risque Spécifique (MRS), sont principalement les abats, le cerveau et le cordon spinal (Heim *et al.*, 2001 et 2003). Les voies de transmission de la maladie à l'Homme par l'intermédiaire des produits alimentaires issus des ovins sont particulièrement étudiées (Schreuder & Somerville, 2003) car ce vecteur est considéré comme 10 à 10 000 fois plus infectieux que le vecteur bovin (Fryer *et al.*, 2007).

L'utilisation de farines animales pour l'alimentation des ruminants est aujourd'hui proscrite, ce qui limite en principe les risques de contamination. Néanmoins, pour prévenir des fraudes éventuelles, des travaux sont toujours menés sur la question de l'authentification de l'alimentation par farines animales des ruminants pour lutter contre l'ESB. Ces études ont notamment recours à des techniques de biologie moléculaire et d'immunologie (Onodera & Kim, 2006 ; Yamanouchi & Yoshikiwa, 2007).

Tableau 8. Teneurs en carotènes des fourrages, des laits de vache correspondants, indice de coloration jaune des fromages.

	Foin séché au sol	Foin séché en grange	Foin + ensilage d'herbe	Pâturage de printemps
Carotènes des fourrages (g/kg MS)	10	20	45	85
Carotènes du lait (µg/L)	75	80	130	220
Indice de Jaune du fromage	20	25	28	30

MS = Matière Sèche

D'après Coulon et Priolo (2002)

1.3. Qualité Sensorielle

La couleur, la flaveur, la jutosité et la tendreté sont des paramètres primordiaux de la qualité sensorielle des produits animaux. Ils dépendent de la composition et de la structure du produit alimentaire, au moment de sa consommation. La supplémentation spécifique ou la modulation globale des régimes donnés aux animaux ont été largement étudiées dans l'optique de modifier ces propriétés.

1.3.1. Lait et produits laitiers

1.3.1.1. Couleur

Parmi tous les caroténoïdes susceptibles d'être ingérés par les ruminants, on sait que le β-carotène et la lutéine sont accumulés dans les tissus adipeux de ruminants, et excrétés dans le lait (Yang *et al.*, 1992). Le β-carotène est seul responsable de la coloration jaune des produits laitiers de bovins (Martin *et al.*, 2005), et sa teneur varie selon l'alimentation de l'animal comme le montre le tableau 8.

D'après la revue de Nozière *et al.*, (2006a), une alimentation au pâturage ou aux fourrages verts induit une augmentation de la teneur de ce pigment dans les produits laitiers. Calderón *et al.*, (2007) et Dian *et al.*, (2007) ont montré que le transfert de ce composé dans le lait est rapide, avec une augmentation de la teneur significative dès la première semaine de traitement.

1.3.1.2. Flaveur

La flaveur peut se définir par la sensation résultant de la combinaison du goût, de l'arôme et des sensations trigéminales lors de la mastication. Elle est conditionnée par différents paramètres dépendants de l'alimentation des animaux (Coulon *et al.*, 2005).

Des composés aromatiques présents dans l'aliment consommé par le bétail peuvent être directement transférés vers le lait et les produits laitiers. C'est le cas des terpènes, naturellement présents dans le pâturage vert (surtout chez les Dicotylédones - Cornu *et al.*, 2001), et dont le profil est fortement dépendant de sa composition botanique (Mariaca *et al.*,. 1997). Le transfert de ces composés dans le lait s'effectue rapidement (Viallon *et al.*, 2000). Bien que leurs potentialités odorantes soient reconnues, leur influence sur la flaveur des produits laitiers (Dumont & Adda, 1978) est sujette à caution du fait de leur présence à des niveaux de concentration inférieurs à leur seuil de perception dans le lait.

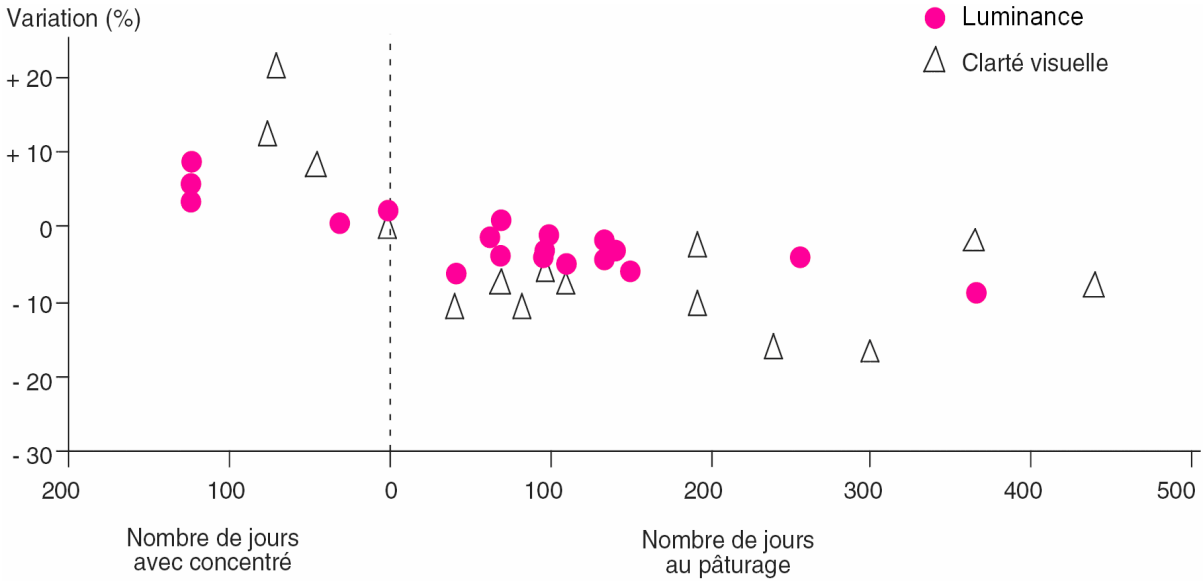

Figure 2. Variation de la luminance et clarté visuelle des muscles *Longissimus* de bovins finis à différentes périodes au pâturage.

D'après Priolo *et al.* (2001)

Certains composés d'arômes sont responsables de défauts d'odeurs dans les produits laitiers, comme les allyl-isocyanates, qui sont produits par la flore ruminale lors de la digestion de crucifères (Urbach *et al.*, 1990). Une molécule en particulier est connue pour provoquer une odeur négativement perçue par le consommateur dans le produit laitier, c'est le 3-méthyl-indole : un composé cyclique soufré provenant de la dégradation du tryptophane (Sheath *et al.*, 2001). Young *et al.*, (1997) décrit ce composé comme caractéristique d'une alimentation des animaux au pâturage, mais des études ultérieures (Priolo *et al.*, 2004 ; Engel & Ratel, 2007) ont infirmé ces conclusions.

La flaveur du fromage est également influencée par les compositions en caséines et en acides gras du lait (Coulon *et al.*, 2005), sur lesquelles influent respectivement le génotype (Delacroix-Buchet *et al.*, 1993) et l'alimentation des animaux (Sutton 1989).

1.3.2. Viande et produits carnés

1.3.2.1. Couleur

Elle dépend de la quantité de myoglobine présente dans la viande ainsi que de son pH, et constitue un facteur prépondérant dans la décision d'achat du consommateur (Carpenter *et al.*, 2001).

La revue de Priolo *et al.*, (2001) fait mention de 35 expériences réalisées entre 1977 et 2000 qui ont toutes établi l'existence d'un lien direct entre l'alimentation de l'animal et la couleur de la viande (*Longissimus*): la couleur est d'autant plus sombre que la période d'élevage au pâturage est longue (Figure 2). Ce phénomène s'explique par l'influence de l'alimentation sur différents paramètres tels que la teneur en myoglobine (Hopkins & Nicholson, 1999 ; Renerre 1981), la quantité de gras intramusculaire et le pH ultime (Priolo *et al.*, 2001).

L'oxydation de la myoglobine, qui se produit parallèlement à celle des lipides (Decker *et al.*, 2000), conduit à un brunissement du produit carné négativement perçu par le consommateur. Une alimentation au pâturage conduit à l'enrichissement de la viande en antioxydants (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008), ce qui permet de limiter ce type d'altération du produit.

1.3.2.2. Flaveur

La flaveur de la viande est libérée au moment de sa cuisson, principalement du fait de la dégradation thermique des lipides, et des réactions de Maillard qui se produisent entre les acides aminés et les sucres.

Il a été établi, à travers des tests de dégustation, que les consommateurs parviennent à différencier des viandes provenant d'animaux nourris soit aux concentrés, soit au pâturage (Priolo *et al.*, 2001 ; Melton 1990). Les produits carnés issus d'animaux alimentés avec des concentrés ont la préférence des consommateurs de différents pays (Rousset-Akrim *et al.*, 1997), en raison des défauts d'odeurs présentés dans certains cas par les produits de ruminants nourris au pâturage (Enser *et al.*, 2000 ; Field *et al.*, 1983).

L'amélioration de la flaveur de la viande cuite, à partir du contrôle de l'alimentation, est délicate, notamment parce que la cuisson est généralement réalisée par le consommateur lui-même, en conditions non standardisées et extrêmement variables.
Néanmoins, on sait que la teneur en antioxydants (DHA, EPA, vit. E, etc. - Wood & Enser., 1997) est supérieure dans de la viande de ruminants élevés au pâturage plutôt qu'aux concentrés, ce qui occasionne une différence de flaveur significative (Daly *et al.*, 1999). Ces composés vont notamment limiter, durant la cuisson, la formation d'hexanal, qui est responsable d'un des défauts de flaveur les plus courants dans la viande cuite (Calkins & Hodgen, 2007).

1.3.2.3. Jutosité

Perçue lors de la mastication, elle dépend de la quantité de suc musculaire du produit carné (Jost *et al.*, 1983), libérée dans la bouche au début de la mastication. Elle est accentuée par la stimulation de la salivation, due en particulier à la présence de gras intramusculaire (Okumura *et al.*, 2008).
Une alimentation énergétiquement riche donnée aux animaux, comme des concentrés, induit par une augmentation de la jutosité de la viande, d'une part en favorisant l'augmentation de gras intra-musculaire (*cf. :* paragraphe 1.1.1.) dans la viande, et d'autre part en provoquant l'accumulation de taux élevés de glycogène durant la vie de l'animal (Priolo *et al.*, 2001). Cela va permettre au muscle d'atteindre, au terme de sa maturation, un pH ultime faible, ce qui favorise la rétention de suc musculaire dans la viande durant sa préparation.
Cependant, l'influence de l'alimentation sur cette dimension de la qualité des produits carnés est difficile à appréhender, du fait de l'influence prépondérante de l'étape de maturation du muscle en viande, ainsi que de la cuisson.

1.3.2.4. Tendreté

Elle peut se définir par la facilité avec laquelle la viande est découpée puis broyée lors de la mastication (Maltin *et al.*, 2003). C'est un paramètre de qualité prépondérant dans

l'appréciation du consommateur (Huffman *et al.*, 1996 ; Boleman *et al.*, 1997). Elle est fonction de la teneur de la viande en gras intramusculaire (Kawachi 2006 ; Hilton *et al.*, 1998) et peut donc se moduler via l'alimentation des animaux (Schor *et al.*, 2008). Teira *et al.* (2003) ont ainsi démontré que la durée de finition aux concentrés était positivement corrélée à la tendreté du produit final. Ces résultats sont confirmés par la revue d'Oury *et al.*, (2007).

Cependant, l'influence de l'alimentation est limitée car la tendreté est également fonction de la teneur en collagène, conditionnée par plusieurs facteurs comme l'âge et la race de l'animal (Geay *et al.*, 2001), les conditions d'abattage (Fergusson *et al.*, 2001), ainsi que les paramètres technologiques de préparation (maturation et cuisson) du produit carné (Ouali 1991).

1.4. La perception de la qualité du produit animal par le consommateur

L'exigence de garanties concernant les facteurs de production des animaux d'élevage de la part du consommateur, et notamment leur mode d'alimentation, résulte de la prise de conscience de leur impact sur les qualités nutritionnelles, sanitaires et sensorielles du produit animal. Dès lors, la propension du consommateur à l'achat du produit se trouve être positivement corrélée à la quantité d'informations relatives aux garanties sur ces dimensions de la qualité (via l'emballage ou la publicité - Napolitano *et al.*, 2007 ; Kähkönen *et al.*, 1996). Au-delà du facteur alimentation, c'est d'ailleurs la notion d'élevage intensif / extensif qui touche le consommateur (Morand-Fehr *et al.*, 2007).

Des dimensions écologiques et éthiques, assimilées par Marie (2006) à la notion de l'« image verte » du produit, se sont fortement répandues chez les consommateurs et se traduisent par la volonté de limiter l'intervention humaine dans l'agroalimentaire en général. Ainsi, le fait que la présence d'adjuvants de synthèse dans le produit alimentaire soit mal perçue (Grünert 1997) provient, selon Fräser (2001), de l'engouement du consommateur pour le « vrai produit naturel ». Ce phénomène est très marqué avec les produits animaux, notamment ceux issus des ruminants (Mennecke *et al.*, 2007). Il s'agit probablement d'une réaction à l'utilisation jugée "contre nature" des farines animales pour nourrir le bétail, et plus généralement aux derniers développements technologiques et biotechnologiques réalisés dans le domaine de l'agriculture. De même, le souci croissant exprimé par le consommateur vis-à-vis du bien-être de l'animal (Broom 1991 ; Duncan & Fraser, 1997) résulte d'une certaine prise de conscience du caractère « inhumain » associé aux pratiques de l'élevage intensif (Pascalev 2006).

Pour ces raisons, l'élevage des ruminants au pâturage bénéficie d'une appréciation extrêmement positive de la part des consommateurs. Il reflète, en effet, à la fois le bien-être

Tableau 9. Principales sources de variations des proportions relatives de l'abondance naturelle des ratios isotopiques dans l'environnement.

Ratios isotopiques *(notations)*		***Facteurs de variation***
$^{13}C / ^{12}C$	$(\delta^{13}C)$	Type photosynthétique des plantes : "C_3" ou "C_4"
$^{15}N / ^{14}N$	$(\delta^{15}N)$	Niveau trophique (marin terrestre) ; pratiques de culture
$^{34}S / ^{32}S$	$(\delta^{34}S)$	Activité bactérienne ; pratiques de culture
$^{2}H / ^{1}H$	$(\delta^{2}H)$	Evaporation ; Condensation ; Précipitations
$^{18}O / ^{16}O$	$(\delta^{18}O)$	Evaporation, Condensation, Précipitation
$^{87}Sr / ^{86}Sr$	$(\delta^{87}Sr)$	Date de la formation de la Pierre ; ratio Rb / Sr

D'après Kelly *et al.* (2005)

de l'animal et l'aspect naturel et éthiquement acceptable du produit alimentaire qui en est issu.

Les teneurs de nombreux constituants des produits laitiers et carnés sont significativement influencées par la nature de l'alimentation reçue par les animaux, au cours de leur élevage. Ces variations se répercutent sur certaines dimensions de la qualité du produit alimentaire fini.
Certains de ces constituants influencés par l'alimentation animale peuvent être utilisés en retour pour la caractériser, à la condition que le régime soit le principal facteur modulant significativement leurs teneurs. C'est la notion de « traceur » de l'alimentation.

2. Les constituants traceurs de l'alimentation

Les recherches menées dans le domaine de l'authentification de l'alimentation des ruminants consistent à identifier dans leurs tissus ou fluides, des constituants révélateurs de leur régime c'est-à-dire des traceurs de l'alimentation. Selon les compromis consentis entre robustesse du diagnostic, précision de la réponse attendue et facilité de mise en œuvre du test en termes de coût et de rapidité, différents types de traceurs peuvent être envisagés pour traiter la problématique.

2.1. Les traceurs non-volatils

2.1.1. Les isotopes

Un même élément chimique est composé d'un ensemble d'espèces atomiques qui diffèrent uniquement par leur nombre de neutrons : ce sont les isotopes de cet élément. L'abondance naturelle des isotopes (par exemple celle du carbone) varie entre les différents compartiments organiques et inorganiques de la biosphère : les types de plantes (C_3, C_4), les niveaux des chaînes trophiques, les individus, les fractions métaboliques et même pour une molécule donnée, entre les différents atomes qui la constituent (Kelly *et al.*, 2005). Ainsi, les ratios isotopiques de certains éléments constitutifs des tissus et fluides animaux peuvent être affectés par la composition atomique des aliments ingérés par l'animal : il s'agit notamment du carbone, de l'azote, du soufre, de l'hydrogène, de l'oxygène (Tableau 9).
Le carbone rend directement compte de la composition botanique des végétaux ingérés par les ruminants. Durant la photosynthèse, les plantes désavantagent les isotopes plus lourds de carbone en absorbant proportionnellement moins de ^{13}C et de ^{14}C que ce qui est

Tableau 10. Détermination des ratios isotopiques $\delta^{18}O$ et $\delta^{2}H$ par Spectrométrie de Masse à Ratios Isotopiques (IRMS), et teneurs relatives en Acides Gras dans le lait par l'analyse Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) du ^{13}C, selon le régime et le type de site d'élevage.

	Montagne			Plaine			Significativité (p < 0.05)	
	Pâturage	Ensilage d'herbe	Foin	Pâturage	Ensilage d'herbe	Foin	Site	Régime
$\delta^{18}O$	-4,93 +/- 0,37 [a]	-7,85 +/- 0,37 [b]	-9,41 +/- 0,25 [c]	-2,02 +/- 0,35 [a]	-4,37 +/- 0,19 [b]	-4,43 +/- 0,18 [b]	***	***
$\delta^{2}H$	1,6 +/- 15,5 [a]	-27,6 +/- 6,3 [b]	-35,1 +/- 15,4 [b]	11,5 +/- 8,3	-0,9 +/- 5,0	1,5 +/- 8,2	***	NS
AGPI (%)	4,3 +/- 2,4	6,2 +/- 1,1	5,8 +/- 0,7	1,8 +/- 1,5	1,7 +/- 0,4	1,8 +/- 0,9	***	NS
AGMI (%)	22,0 +/- 3,5 [a]	17,3 +/- 2,4 [b]	21,0 +/- 5,9 [a,b]	26,0 +/- 5,4 [a]	19,7 +/- 1,2 [b]	21,3 +/- 1,8 [a,b]	NS	*
AGS (%)	73,7 +/- 4,5	76,5 +/- 2,4	73,3 +/- 6,0	72,3 +/- 6,0	78,7 +/- 1,4	77,0 +/- 2,1	NS	NS

[a,b,c] Les valeurs comportant une annotation différente sur une même ligne sont trouvées significativement différentes (p<0.05).

NS P>0.05 ; * P <0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001.

AGPI = Acides Gras Polyinsaturés
AGMI = Acides Gras Monoinsaturés
AGS = Acides Gras Saturés

D'après Renou *et al.* (2004a).

Tableau 11. Détermination du ratio isotopique $\delta^{18}O$ par Spectrométrie de Masse à Ratios Isotopiques (IRMS), et teneurs relatives Acides Gras dans le muscle par l'analyse Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) du ^{13}C, selon le régime et le type de site d'élevage

	Pâturage			Ensilage de maïs			Significativité (p < 0.05)	
	Le pin (50 m)	Mirecourt (280 m)	Theix (850 m)	Le pin (50 m)	Mirecourt (280 m)	Theix (850 m)	Site	Régime
$\delta^{18}O$	-3,75 +/- 0,98	-5,76 +/- 1,76	-4,55 +/- 0,91	-5,84 +/- 0,52	-5,2 +/- 0,81	-6,09 +/- 0,60	NS	***
AGPI (%)	2,9 +/- 0,9	4,6 +/- 1,6	5,9 +/- 2,8	2,7 +/- 0,6	3,1 +/- 1,4	3,7 +/- 0,9	*	*
AGMI (%)	38,1 +/- 3,9	38,2 +/- 2,5	34,2 +/- 1,7	42,5 +/-3,5	40,0 +/- 2,0	38,8 +/-2,7	**	***
AGS (%)	59,0 +/- 4,5	57,1 +/- 1,9	59,9 +/- 4,1	54,8 +/- 3,6	56,9 +/- 1,7	57,5 +/- 2,2	NS	*

NS P>0.05 ; * P <0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001.

AGPI = Acides Gras Polyinsaturés
AGMI = Acides Gras Monoinsaturés
AGS = Acides Gras Saturés

D'après Renou *et al.* (2004b).

disponibles dans leur réservoir de carbone. Il y a donc fractionnement isotopique, résultat qui est transmis aux consommateurs de plantes, les herbivores, et à terme à leurs propres consommateurs, les carnivores. L'importance du fractionnement isotopique dépend du cycle de la photosynthèse mise en action par les plantes. La plupart des plantes à fleurs, des arbres, des arbustes et des herbes des zones tempérées sont connues comme des plantes "C_3", parce qu'elles produisent une molécule avec trois atomes de carbone en suivant le cycle photosynthétique de Calvin-Benson. Les herbes qui sont adaptées aux régions arides, telles que l'herbe de bison (Bouteloua) et le maïs (Zea), sont connues comme des plantes "C_4", parce qu'elles produisent une molécule avec quatre atomes de carbone suivant le cycle de Hatch-Slack. Les plantes C_3 retiennent plus les carbones isotopes lourds que ne le font les plantes C_4 (O'Leary 1981). Cependant, ces ratios ne sont pas pertinents pour discriminer des alimentations pâturage et concentrés qui peuvent intégrer de manière variable, plus ou moins de plantes C_3 ou C_4.

D'autres éléments ont été utilisés pour caractériser plus indirectement les fourrages consommés par le bétail. Il s'agit notamment de l'azote et du soufre dont les ratios renseignent sur les pratiques agriculturales, et notamment l'utilisation d'engrais azoté. Plusieurs travaux montrent que le fractionnement de l'azote dans un fourrage est influencé par la présence de certaines plantes (notamment de légumineuses) et par l'utilisation d'engrais azoté (Piasentier *et al.*, 2003 ; Kornexl *et al.*, 1997). Le fractionnement du soufre permet quant à lui de fournir des informations sur l'ajout de sulfate d'ammonium (Schmidt *et al.*, 2005). Ces ratio isotopiques ont ainsi été utilisés récemment pour distinguer des produits carnés issus de l'agriculture biologique de production plus intensive (Molkentin & Giesemann, 2007 ; Franke *et al.*, 2005). Néanmoins, ces éléments ne fournissent pas directement des informations permettant de distinguer une alimentation au pâturage d'une alimentation à base de concentrés dans la mesure où ni l'utilisation d'engrais azoté et ni la présence de légumineuses ne sont caractéristiques de l'un ou l'autre de ces types de régimes.

Dans certains cas la zone géographique de production d'un fourrage peut fournir des informations sur l'alimentation des animaux. A ce titre l'analyse des ratios isotopiques $\delta^{18}O$ et $\delta^{2}H$ mesurés dans l'eau d'un échantillon animal (viande, lait) peut permettre de distinguer les régimes d'animaux si ces régimes sont distincts suivant les zones d'élevage (Renou *et al.*, 2004a,b ; Kelly *et al.*, 2005). Ces isotopes sont transférés dans les tissus animaux notamment par l'intermédiaire de l'eau de boisson. En cumulant l'étude de ces ratios isotopiques et des proportions en acides gras, Renou *et al.* (2004a,b) discriminent simultanément l'alimentation et le site d'élevage (Tableaux 10 et 11). Cependant, l'étude d'Engel *et al.* (2007) a mis en évidence les limites de ces traceurs isotopiques de l'eau pour l'authentification de la zone de production. En premier lieu, les fluctuations importantes de

ces ratios isotopiques avec celle difficilement prévisible du climat en limitent l'utilisation à des différenciations géographiques grossières. Ensuite l'origine de l'eau ingérée par les animaux sous forme d'aliment ou d'eau de boisson est difficilement contrôlable (Kelly *et al.*, 2005).

On peut donc considérer que les ratios isotopiques ne sont pas à proprement parler des traceurs de l'alimentation, ce facteur n'ayant pas, contrairement à la localisation géographique du site de production, un effet prépondérant sur leurs variations. Néanmoins, l'association de ces traceurs avec d'autres éléments de la composition des produits animaux, comme les minéraux (Heaton *et al.*, 2008) ou les acides gras (Molkentin & Giesemann, 2007), peut se révéler bénéfique pour préciser avec des données de localisation ou de pratiques culturales, des diagnostics d'authentification (Engel *et al.*, 2007).

2.1.2. Les vitamines A et E

L'origine végétale de ces composés (*cf. :* paragraphe 1.1.2.) et le fait qu'ils soient transférés par voie alimentaire dans les tissus et fluides des ruminants, en font des traceurs potentiels de l'alimentation des animaux (Martin *et al.*, 2005). Alors que la teneur en vitamine E des produits animaux est directement liée à la quantité ingérée, la vitamine A provient de la métabolisation du β-carotène.

Plusieurs facteurs autres que l'alimentation sont susceptibles de faire varier les teneurs en vitamines A et E dans les tissus animaux. Tout d'abord, leurs abondances varient d'une espèce botanique à l'autre (Martin *et al.*, 2005). Ensuite, leurs biodisponibilités vis-à-vis de l'animal dépend à la fois du profil en acides gras de la plante (Mc Dowall & Mc Gillivray, 1963), de la saison (Mc Dowell & Mc Dowall, 1953), et de la race ainsi que du stade de lactation de l'animal (Nozière *et al.*, 2006c ; Calderón *et al.*, 2007).
De plus, la supplémentation en vitamines de différents types de régimes (ensilage, concentrés, etc. - Geay *et al.*, 2001) est un procédé couramment employée (Descalzo & Sancho, 2008) dans les pratiques d'élevage.
Cela pourrait expliquer le fait qu'aucune étude, à notre connaissance, ne se soit basée uniquement sur ces composés pour authentifier une alimentation au pâturage. En revanche, Pizzoferrato *et al.* (2007), en dosant en parallèle la vitamine E et les teneurs en cholestérol dans des produits laitiers de chèvre (en un ratio baptisé « degré de protection antioxydante ») parvient à discriminer des régimes contrastés : pâturages $\boldsymbol{v_s}$ concentrés. Cependant, même si ces composés sont capables de discriminer significativement des alimentations contrastées, les travaux de Martin *et al.* (2005) et d'Engel *et al.* (2007) ont

montré que leur pouvoir discriminant s'avérait extrêmement limité par rapport à celui d'autres constituants.

2.1.3. Les caroténoïdes

Plusieurs travaux se sont intéressés à l'analyse des teneurs en caroténoïdes dans les tissus et fluides des ruminants pour authentifier leur alimentation à base d'herbe. Présents en grande quantité dans le pâturage et le fourrage vert (de 9 à 14 mg / 100g de matière fraîche - Prache *et al.*, 2003a), ces composés, et en particulier le β-carotène (chez les bovins) et la lutéine (chez les bovins et ovins) sont transférés par voie alimentaire dans les tissus adipeux des animaux (Yang *et al.* 1992).

De nombreuses études sont ainsi parvenues, dans un contexte expérimental, à discriminer avec succès des alimentations à base de pâturage (fourrage vert, ensilage d'herbe, etc.) d'une alimentation à base de concentrés, à partir du lait (Martin *et al.*, 2005), du fromage (Verdier-Metz *et al.*, 1998), du sang (Prache *et al.* 2003a), ou des tissus adipeux (Prache *et al.* 2003b). Ces auteurs ont analysé uniquement le β-carotène et la lutéine, par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou par un système de spectroscopie. Ce dernier permet une analyse rapide, reproductible, et peu onéreuse (Martin *et al.*, 2005). Dans le cas des tissus adipeux, l'analyse peut même s'effectuer directement à l'abattoir à l'aide d'un spectrocolorimètre portable, à raison de quelques secondes par animal (Prache & Theriez, 1999).

Il y a cependant plusieurs éléments qui ne permettent pas de considérer les pigments comme des traceurs robustes. Tout d'abord, la discrimination des animaux est rendue plus difficile dans le cas de situations d'alimentations moins contrastées en caroténoïdes (Nozière *et al.*, 2006b), pour des raisons de climat, de saison, d'alternance de régimes ou de formulation des concentrés (*i.e*. intégration possible de luzerne - Hartman *et al.*, 1965, qui est une plante riche en caroténoïdes - Kandlakunta *et al.*, 2008). De plus, la supplémentation des alimentations en β-carotène est couramment pratiquée (*cf. :* paragraphe 1.1.2. - Nozière *et al.* 2006a), compte tenu de l'intérêt de son produit de dégradation, la vitamine A, dans l'alimentation humaine

Par conséquent, les caroténoïdes ne peuvent donc pas être considérés comme des traceurs robustes et infalsifiables d'une alimentation au pâturage, et leur utilisation dans une optique de traçabilité analytique semble de ce fait difficilement envisageable.

2.1.4. Les polyphénols

Certaines plantes fourragères, et notamment les graminées et les dicotylédones, sont très riches en flavonoïdes et autres composés phénoliques intracellulaires, (O'Connell & Fox, 2001). Les teneurs peuvent atteindre 3% de la matière sèche (Fraisse *et al.*, 2007).

Lorsqu'ils sont ingérés par les ruminants, ces composés hydrophiles sont métabolisés au niveau du rumen, du foie, et des tissus musculaires. Selon la voie métabolique suivie, ils sont stockés dans différents compartiments de l'organisme avec un degré de métabolisation plus ou moins avancé, tandis qu'une fraction est excrétée dans le lait (Besle *et al.* 2005 ; O'Connell & Fox, 2001).

De récents travaux ont été menés sur ces composés, dans le cadre de l'authentification du régime alimentaire des ruminants. Besle *et al.* (2005) sont ainsi parvenus à caractériser la composition botanique fine de la ration alimentaire des vaches, à partir de l'analyse par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) du profil en polyphénols du lait.

D'après Fraisse *et al.*, (2007), la composition et les teneurs en polyphénols d'une plante varient fortement en fonction de sa famille botanique, voire de sa variété, de son stade de maturité et des conditions environnementales (climat, saison). Cette variabilité, cohérente avec les résultats de Besle *et al.* 2005, indique que ces composés sont trop spécifiques pour authentifier de manière suffisamment générique une alimentation à l'herbe.

2.1.5. Les acides gras

Plusieurs études récentes montrent la faisabilité de la discrimination de régimes de vaches laitières à partir de l'analyse du profil en AG dans leur lait. Ainsi Molkentin & Geisemann (2007) sont parvenus à discriminer avec succès des laits de vache produits notamment avec des régimes différents, uniquement sur la base de 2 AG (C18 :3 n-3 et C20 :5 n-3). De même Engel *et al.* (2007), qui analysaient des échantillons de lait de mélange ont déterminé une liste de 33 AG permettant de discriminer les laits d'animaux nourris avec un régime à base de maïs de ceux nourris aux pâturages. Entre autres traceurs de l'alimentation au pâturage, le C18 :3 n-3 a été identifié par les deux études.

En ce qui concerne les produits carnés, la majorité des travaux ont montré la faisabilité de la discrimination des régimes contrastés, c'est-à-dire pâturage exclusif ***v*$_s$** concentrés exclusifs (Aurousseau *et al.*, 2004 ; French *et al.*, 2000). Certains auteurs cependant ont étudié la possibilité de différencier des régimes alternés consistant en une alimentation au pâturage suivie de différents degrés de finition avec des concentrés. Aurousseau *et al.* (2007 a,b) sont ainsi parvenus à discriminer des tissus musculaires d'agneaux (L. *Thoracis*) alimentés

par des régimes contrastés et alternés (élevage au pâturage avec différentes durées de finition aux concentrés). Parmi les acides gras discriminants identifiés, les teneurs en C18:2 n-6 et le ratio C18:2 n-6 / C18:3 n-3 dans les phospholipides se sont avérés particulièrement influencés par les différents degrés de finition aux concentrés.

Il ressort de ces études que ces composés permettent de répondre à la question de l'authentification d'alimentations contrastées et alternées (pâturage suivi de finition aux concentrés).
Néanmoins, pour des raisons de qualité nutritionnelles du produit animal, certains de ces composés, comme 18 :3 n-3, sont couramment ajoutés aux rations alimentaires lors de supplémentation, ce qui limite de fait leur utilisation comme traceurs.

2.2. Les traceurs volatils

Les premiers travaux menés sur l'analyse des composés volatils chez les ruminants ont été réalisés par Gray *et al.* (1951) et consistaient en l'analyse des AG volatils dans le rumen. Par la suite, d'autres auteurs se sont intéressés à ces composés afin d'étudier la digestion des aliments, et notamment de distinguer la métabolisation des nutriments par le rumen de celle réalisée dans les tissus (Pennington 1952 ; James *et al.* 1956).

Une matrice biologique adipeuse contient plusieurs milliers (Mottram 1998) de ces composés généralement lipophiles (Calkins & Hodgen, 2007 ; Moody 1983). Certains d'entre eux, d'origines végétales, sont directement transférés dans les tissus de l'animal après ingestion, comme par exemple les terpènes (Larick *et al.*, 1987). Mais la plupart sont des produits de dégradation de précurseurs présents dans l'alimentation, par l'action de la flore ruminale (Suzuki & Bailey, 1985) ou de l'animal lui-même (Coulon & Priolo, 2002). Ils sont notamment issus du métabolisme des lipides, protéines, et glucides, et appartiennent à un large éventail de familles chimiques (Covarrubias-Cervantes *et al.*, 2004). Ainsi, la composition des tissus et fluides animaux en composés volatils constitue un instantané de l'état du métabolisme : tous les facteurs affectant la physiologie de l'animal, et notamment son alimentation, vont ainsi affecter ce profil en composés volatils (Engel & Ratel 2007 ; Vasta & Priolo, 2006 ; Elmore *et al.*, 2000 ; Ha & Lindsay, 1990). Enfin, certains composés reflètent la métabolisation d'autres constituants traceurs de l'alimentation, comme le β-carotène d'où provient le toluène (Rios *et al.*, 2008), ou l'acide linolénique à l'origine de la 2,3-octanedione (Young *et al.*, 1997).

La composition des tissus et fluides animaux en composés volatils regroupe une grande quantité d'informations en relation avec le régime, ce qui en font des constituants privilégiés pour authentifier de manière robuste l'alimentation des ruminants.

2.2.1. Les principaux traceurs volatils identifiés de l'alimentation des ruminants

Plusieurs travaux ont montré qu'il était possible de discriminer des alimentations à base de pâturage ou de concentrés à partir de l'analyse des tissus adipeux ou musculaires de ruminants (Engel & Ratel, 2007 ; Vasta & Priolo, 2006). Certains de ces composés ont été identifiés comme des traceurs de l'alimentation par plusieurs auteurs, ce qui suggère leur robustesse.

La 2,3-octanedione est le seul composé qui bénéficie d'un consensus total, chez l'ovin (Priolo *et al.*, 2004 ; Sebastian *et al.*, 2003 ; Young *et al.*, 1997 ; Suzuki & Bailey, 1985) comme le bovin (King *et al.*, 1993 ; Larick *et al.*, 1987). Il peut donc être considéré comme un traceur extrêmement fiable. Sa teneur est significativement supérieure dans les tissus adipeux d'animaux nourris à l'herbe. Selon Young *et al.* (1997), ce composé résulterait de la dégradation de l'AG 18 :3n-3 (présent dans les pâturages et les concentrés) par l'enzyme lipoxygénase libérée lors de la mastication. Il convient cependant de signaler que cette enzyme est également présente dans le soja, qui constitue typiquement un ingrédient intégré à la composition des concentrés (Priolo *et al.*, 2004). Selon Elmore *et al.* (2002), l'oxydation thermique de cet acide gras lors de l'extraction des composés volatils pourrait en partie être à l'origine de la néoformation de ce composé. Néanmoins, selon ce même auteur, cet effet serait très limité.

La 3-méthyl-indole « skatole » est un composé qui a souvent été proposé comme traceur de l'alimentation au pâturage (Young *et al.*, 1997, 1999 et 2003 ; Lane & Fraser, 1999). Ce composé est synthétisé par la flore ruminale par décarboxylation et désamination d'un aminoacide, le tryptophane (Priolo & Vasta, 2007 ; Vasta & Priolo, 2006). Selon Sheath *et al.* (2001), son accumulation dans les tissus adipeux d'animaux nourris au pâturage est d'autant plus importante que ce type de régime augmente le ratio {protéine / hydrogénocarbonés non-fibreux} dans le rumen, favorisant ainsi les désaminations protéiques par la flore. Néanmoins, certaines études comme celles de Priolo *et al.* (2004) et Sebastian *et al.* (2003) n'ont pas confirmé le caractère discriminant de ce composés pour authentifier une alimentation au pâturage.
Cela pourrait provenir du fait que des plantes susceptibles d'entrer dans la composition botanique de certains pâturages, comme *Lotus corniculatus* (Schreurs *et al.*, 2004), *Dorycnium rectum* (Tavendale *et al.*, 2005), et certaines légumineuses (Roy *et al.*, 2004), contiennent des tanins reconnus pour diminuer la production de 3-méthyl-indole, à travers leur action réductrice sur le ratio {protéine / hydrogénocarbonés non-fibreux}.

Les terpènes sont des métabolites secondaires produits par les plantes, et on les trouve en quantités importantes chez les Dicotylédones (Cornu *et al.*, 2001). Ceux que l'on extrait par espace de tête dynamique à partir des produits animaux appartiennent aux classes des

mono- et sesquiterpènes, respectivement formés de 10 et 15 atomes de carbones. Ces composés volatils sont transférés dans les produits animaux sans être altérés par la flore ruminale (Vasta & Priolo, 2006). Ce phénomène de transfert est très rapide, notamment dans le lait où l'on observe une augmentation significative de leurs teneurs dès la première semaine de traitement (Viallon *et al.*, 2000). Cependant, le profil terpénique d'une prairie est extrêmement dépendant de sa composition botanique, ce qui confère à ces traceurs une spécificité incompatible avec la généricité recherchée pour authentifier une alimentation au pâturage, mais en revanche un potentiel intéressant pour authentifier les zones géographiques précises de production (Cornu *et al.*, 2001). Malgré cela, quelques composés comme le para-cymène, le β-caryophyllène, et le *trans*-cadina-1(6),4-diène ont été identifiés comme traceurs de l'alimentation au pâturage de manière récurrente (Engel *et al.*, 2007 ; Vasta & Priolo 2006). Cette classe de composés mérite donc d'être suivie dans nos travaux.

Les aldéhydes représentent une part importante des composés volatils extraits des tissus animaux (Larick *et al.*, 1990). Plusieurs travaux ont identifiés quelques aldéhydes capables de discriminer des animaux élevés avec des régimes contrastés. Néanmoins, comme le souligne Vasta & Priolo (2006), il est difficile de relier ces composés à un type d'alimentation particulier de matière récurrente, ce qui peut s'expliquer par leur origine oxydative. Les aldéhydes non-ramifiés sont souvent considérés comme issus de l'oxydation des lipides (Mottram 1998), ce qui fait d'eux des produits d'artefacts potentiels (Vasta & Priolo, 2006). Néanmoins, Young *et al.* (1997), Wood & Enser (1997), Gatellier *et al.* (2005), et Descalzo & Sancho (2008) utilisent les aldéhydes comme traceurs de l'oxydation des lipides, car elle est plus marquées dans les produits issus d'animaux nourris aux concentrés que chez ceux nourris à l'herbe, du fait de la présence d'antioxydants dans ce dernier cas. De fait, les aldéhydes non-ramifiés peuvent être considérés comme des traceurs indirects de l'alimentation.
Certains alcène-aldéhydes (ou « énals ») comme les 4-hepténal, 2,4-heptadiénal, et 2-penténal ont été identifiés comme traceurs de l'alimentation au pâturage à de nombreuses reprises, ce qui laisse présager de leur robustesse (Elmore *et al.*, 2004 ; Sebastian *et al.* 2003 ; Young *et al.*, 2003 ; Larick *et al.*, 1987 ; Suzuki & Bailey, 1985)

Enfin, les composés soufrés comme le diméthyl-disulfide, le diméthyl-sulfone, et le méthional ont été identifiés comme traceurs de l'alimentation au pâturage par plusieurs auteurs (Young O.A., 1997 et 2003 ; Raes *et al.* 2003). Ces composés proviendraient du métabolisme des acides aminés (Raes *et al.*, 2003).

En confrontant les résultats de ces études, il est possible d'établir une liste de traceurs volatils potentiellement génériques, dans la mesure où ils ont été identifiés de manière

Tableau 12. Liste des composés volatils identifiés comme traceurs de l'alimentation des ruminants dans leurs tissus adipeux.

Composés	IRL [a]	Réf [b]	Composés	IRL [a]	Réf [b]
Pentane, 3-méthyl-	579	[4]	1-Octèn-3-one	979	[4]
Hexane	600	[2]	2,3-octanedione	982	[4] ; [2] ; [3]
Furan, 2-méthyl-	605	[4]	2-Octanone	991	[2]
Cyclopentane, méthyl-	628	[4]	2,4-Heptadiénal	1014	[4] ; [2]
2-Buténal	648	[4]	m-Cymen	1030	[4]
Pentanal	696	[4]	p-Cymen	1034	[4] ; [3]
Cyclohexane, 1-méthyl-	726	[4]	Benzene, 1,3,5-triméthyl-	1036	[4]
Disulfide, diméthyl-	748	[3]	(E,E)-3,5-Octadièn-2-one	1074	[4]
(E)-2-Penténal	755	[4]	Acétophénone	1079	[4]
1-Pentène, 3-éthyl-2-méthyl-	761	[4]	Benzène, 2-éthyl-1,3-diméthyl-	1088	[4]
Toluène	771	[4]	2-Nonanone	1093	[4] ; [2]
Heptane, 3-méthyl-	773	[4]	Undecanal	1100	[4]
2,3-Butanediol	789	[4]	Benzène, 1,2,4,5-tetraméthyl-	1122	[4]
1,3-Butanediol	790	[4]	Benzène, 1,2,3,4-tetraméthyl-	1131	[4]
(Z)-4-Octène	796	[4]	(E)-2-Decénal	1269	[3]
Hexanal	800	[3]	2-Undécanone	1297	[4] ; [2]
(E)-4-Octène	806	[4]	Tridécane	1300	[4] ; [2]
(Z)-2-Octène	810	[4] ; [1]	Indole	1321	[3]
(E)-2-Octène	815	[4] ; [1]	2-Undecénal	1372	[3]
4-Heptanone	873	[2]	Tétradécane	1400	[2]
2-Heptanone	890	[2]	α-Copaène	1407	[4]
(Z)-4-Hepténal	900	[4] ; [2]	Indole, 3-méthyl-	1418	[3]
Heptanal	902	[2] ; [3]	β-Caryophyllène	1461	[4] ; [3]
Méthional	908	[3]	Décane, 2,3,7-triméthyl-	1463	[2]
γ-Butyrolactone	916	[4]	Pentadécane	1500	[2]
Sulfone, diméthyl-	916	[4] ; [3]	2-Tridécanone	1500	[2]
γ-Pentalactone	957	[4] ; [2]	5-Hydroxydécanoic acid δ-lactone	1518	[3]
(Z)-2-Hepténal	959	[2]	trans-Cadina-1(6),4-diène	1554	[3]
Benzaldéhyde	970	[4] ; [1]	Hexadécane	1600	[2]
Nonane, 3-méthyl-	972	[4]	Heptadécane	1700	[2]

[a] Indices de rétention linéaire correspondants à une colonne capillaire de type SPB5.

[b] Références bibliographiques [1] = Maruri & Larick, 1992 ; [2] = Sebastian *et al.*, 2003 ; [3] = Vasta & Priolo, 2006 ; [4] = Engel & Ratel, 2007.

récurrente (voir tableau 12). Cette généricité mérite cependant d'être confirmée, étant donné qu'aucune étude en conditions réelles, c'est-à-dire à grande échelle et sur des échantillons prélevés au sein des filières, n'a encore été réalisée.
De plus, on remarque que ces traceurs sont tous des traceurs d'une alimentation au pâturage, et qu'il n'y a pas de consensus pour les traceurs d'une alimentation à base de concentrés. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'alimentation de type concentrés est sujette à une large variabilité quant aux ingrédients qui la compose, et que l'on ne peut donc pas en définir des constituants invariants.

2.2.2. Les limites des études précédentes

Parmi la multitude de traceurs volatils de l'alimentation identifiés par les précédentes études, seuls quelques composés bénéficient d'un consensus entre les auteurs. Cela pourrait en partie provenir de la diversité des protocoles d'étude utilisés.
De plus, l'apport de ces résultats, dans l'optique de l'élaboration de modèles d'authentification de l'alimentation utilisables à des fins règlementaires, est d'autant plus limité qu'ils ne traitent que d'alimentations contrastées. En effet, ce type de régime n'est que très rarement utilisé dans les pratiques d'élevage, qui recourent quasiment systématiquement à l'alternance de différents régimes donnés aux animaux. Par exemple, les éleveurs d'ovins procèdent souvent à une étape de finition des animaux avec des aliments concentrés, afin d'atteindre des scores de conformation en accord avec le marché (poids final, état d'engraissement, mensurations, etc. - Fraysse & Darre, 1990).

Deux études notamment ont été menées afin de discriminer ce type de régime alterné par l'analyse des composés volatils :
Priolo *et al.*, 2004 ont essayé de discriminer 4 régimes consistant en une alimentation au pâturage suivie de différentes durées de finition aux concentrés. 35 composés ont été analysés par ETD-CPG-SM dans des tissus adipeux d'agneaux : 33 terpènes, la 2,3-octanedione, et le 3-méthyl-indole. Finalement, seuls la 2,3-octanedione et 9 terpènes s'avèrent être significativement influencés par le facteur alimentation, mais ces composés ne conduisent qu'à une discrimination partielle des alimentations (Figure 3). On peut supposer que l'intégration à cette étude de l'analyse de composés volatils supplémentaires (comme ceux du tableau 14) aurait permis une amélioration du pouvoir discriminant.
Larick *et al.*, 1987 ont également cherché à discriminer quatre durées de finition différentes aux concentrés après une alimentation au pâturage. À l'aide d'une analyse discriminante réalisée à partir des composés significatifs, les 4 régimes ont été discriminés avec succès. Néanmoins, la généricité du modèle proposé par ces auteurs peut être mise en doute, dans la mesure où il s'agit d'un modèle construit sur un groupe d'apprentissage qui n'a donc pas été validé sur un groupe d'observations "test". De plus, le nombre disproportionné de

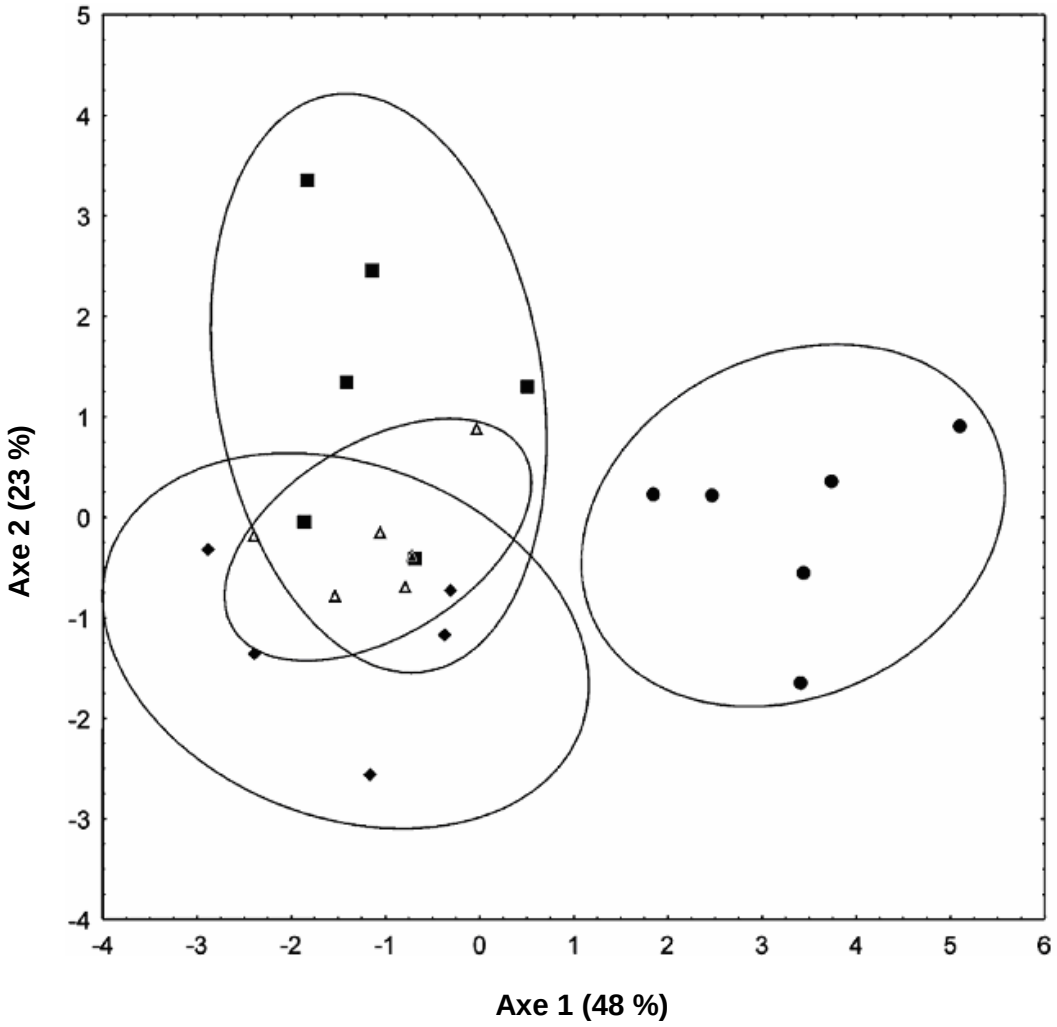

Figure 3. Analyse Factorielle Discriminante réalisée à partir de quatre terpènes (β-cubébène, β-gurjunène, unknown, and géranylacétone) analysés par ETD-CPG-SM, et discriminant au mieux les gras sous-cutanés d'agneaux nourris au pâturage et finis aux concentrés selon 4 degrés.

● pâturage exclusif, ♦ pâturage, puis courte finition aux concentrés, ■ pâturage, puis longue finition aux concentrés, et △ concentrés exclusif

D'après Priolo *et al.* (2004).

variables combinées dans ce modèle (n=9) par rapport au nombre d'observations disponibles (n=74) induit forcément un phénomène de "surlissage", ce qui signifie que le modèle discriminant est trop dépendant du dispositif analytique pour être générique. Dans cette étude, les composés identifiés comme discriminants n'ont jamais été mentionnés dans les travaux ultérieurs, exception faite de la 2,3-octanedione. De plus, certains de ces composés sont susceptibles d'être des artefacts causés par la température. Cette dernière hypothèse est d'autant plus plausible que les conditions d'extraction des composés volatils utilisés dans cette étude favorisaient ce phénomène : les échantillons de tissus adipeux ont subi deux étapes successives de chauffage élevé (175°C durant 20 minutes, puis 200 °C pendant 30 minutes) en présence d'oxygène, avant l'étape de séparation chromatographique.

L'identification de traceurs volatils de l'alimentation et l'étude de leur cinétique d'apparition et de disparition dans les tissus animaux, lors du passage de l'animal d'un régime à un autre, constituent des axes de recherche primordiaux pour authentifier des alimentations alternées. Priolo *et al.* (2004) et Larick *et al.* (1987) ne sont pas parvenus à mettre en place un modèle d'authentification fiable de ces alimentions alternées.

Les études tirées de la littérature dédiée à l'authentification de l'alimentation des ruminants mettent clairement en évidence l'intérêt de l'utilisation de traceurs volatils. En comparant les résultats de ces études, il apparaît néanmoins que l'identification de ces traceurs de l'alimentation n'est pas consensuelle. Ces dissimilitudes peuvent s'expliquer par le fait qu'il existe un certain nombre de difficultés inhérentes à l'analyse des composés volatils, qui, si elles ne sont pas contournées ou résolues, peuvent constituer une source importante d'artefacts.

3. Les verrous de l'analyse des composés volatils pour l'authentification de l'alimentation des animaux

3.1. L'extraction des composés volatils

L'extraction des composés volatils d'un échantillon biologique est une étape critique de l'analyse. Trois éléments doivent être pris en compte pour optimiser la qualité de l'information recueillie : (i) le rendement d'extraction, c'est-à-dire la quantité de composés volatils extraite par rapport à celle réellement contenue dans l'échantillon ; (ii) le degré de représentativité de l'information recueillie à partir de l'analyse de la fraction volatile par

rapport à celle contenue dans le tissu natif ; et (iii) la reproductibilité des résultats analytiques obtenus.

3.1.1. Choix de la technique d'extraction

L'utilisation de solvants permet d'obtenir un rendement élevé d'extraction des composés volatils, mais implique l'altération de l'information liée à la présence du solvant et de ses impuretés co-analysés avec l'échantillon. Les stratégies d'extraction sous vide sont moins génératrices d'artefacts, mais leur faible reproductibilité et leur utilisation contraignante en limite l'usage. Enfin, les techniques dites d'« espace de tête statique » permettent d'effectuer l'échantillonnage des composés volatils sans l'intervention d'adjuvants chimiques. Elles consistent à récolter un échantillon de la phase gazeuse en équilibre thermodynamique avec le matériel biologique étudié, placé dans une enceinte thermostatée, puis à injecter cette fraction dans le dispositif analytique. L'intensité du chauffage utilisé pour extraire ces composés de la matrice peut être modérée, de manière à limiter la génération d'artefacts causée par la température (Etiévant 1996). Ces techniques présentant une bonne reproductibilité et une grande facilité de mise en œuvre permettent d'obtenir rapidement une signature des composés volatils extraits d'un échantillon biologique (Leclercq *et al.*, 2008 ; Dujourdy & Besacier, 2008). Néanmoins, elles présentent un rendement d'extraction très limité, notamment pour les composés peu volatils, ce qui limite également la représentativité (Wang *et al.*, 2008).

Afin de dépasser ces limites, des techniques dites d'« espace de tête dynamique » (ETD) ont été développées. Elles consistent à fixer les composés volatils désorbés de l'échantillon sur un « piège » adsorbant relativement aspécifique. Cette action de piégeage en continu (« dynamique ») des composés désorbés de l'échantillon dans le volume qui l'entoure a pour effet de déplacer l'équilibre thermodynamique en faveur de l'espace de tête (*i.e.* volume de gaz entourant l'échantillon) et d'augmenter par conséquent leur volatilisation (Wampler *et al.*, 2004). Le rendement d'extraction et la représentativité de l'information sont ainsi améliorés, notamment en ce qui concerne les systèmes d'ETD de type « Purge & Trap » (Contarini *et al.*, 2002). Ce dispositif consiste à entraîner les composés volatils désorbés par l'échantillon à l'aide d'un gaz vecteur inerte (« purge »), puis à les concentrer par adsorption sur un piège (« trap »). Les composés piégés sont ensuite désorbés du piège par chauffage, pour être ensuite entraînés dans le chromatographe.

3.1.2. Choix de la matrice analysée

Les échantillons analysés seront des tissus adipeux, car les composés volatils, généralement lipophiles, sont naturellement accumulés dans ce type de matrice. L'analyse des composés volatils de ces tissus permettra donc d'accéder à un maximum d'information, y compris celle portée par les composés de faible abondance.

Certains auteurs ont mis en évidence des différences de composition chimique de tissus de même type provenant de différentes localisations anatomiques. Ce phénomène a été notamment observé par Calkins & Hodgen (2007) à partir des profils volatils de différents tissus musculaires, ainsi que par Rowe *et al.* (1999) et Gatellier *et al.* (2005) sur la composition en acides gras de certains tissus adipeux. Certains composés volatils provenant de la dégradation des acides gras, il est envisageable que les profils volatils des tissus adipeux diffèrent également. De plus, le développement de ces tissus étant directement lié à l'alimentation de l'animal, on peut formuler l'hypothèse de l'existence d'une complémentarité de l'information sur l'historique alimentaire présentée par ces différences de composition entre leurs fractions volatiles. L'étude de cette complémentarité de l'information contenue dans les tissus adipeux qui diffèrent de par leur localisation de prélèvement sur la carcasse (voisinage d'un organe de détoxification, d'un muscle, etc.) et leurs cinétiques de croissance durant la vie de l'animal, constituera l'un des objectifs de ce travail de recherche.

L'extraction des composés volatils contenus dans un tissu gras est entravée par la rétention des composés lipophiles par la matrice (Ventanas *et al.*, 2008). Ce phénomène est difficile à compenser, même avec l'entraînement des composés par un gaz vecteur. Afin d'augmenter ce taux d'extraction, les barèmes durée/température de cette étape sont augmentés, ce qui favorise la formation d'artefacts thermiques et la présence d'eau évaporée dans la fraction à analyser.

3.1.3. Prétraitement de l'échantillon

La présence d'eau dans la fraction volatile analysée est responsable de la qualité médiocre des chromatogrammes, caractérisés par une ligne de base élevée et une faible reproductibilité globale Vasta *et al.* (2007). L'eau est en effet génératrice d'artefacts à différents niveaux du système analytique (Canac-A. *et al.* 1999). Elle perturbe l'adsorption et la désorption des composés volatils sur le piège, ainsi que leur séparation dans la colonne chromatographique. Elle provoque également l'usure prématurée du spectromètre de masse (Hinshaw 1990 ; Pankow 1991 ; Helmig & Vierling, 1995) et en module la sensibilité.

Lors de l'étude des composés volatils de la viande, Vasta *et al.* (2007) ont choisi de limiter la quantité d'échantillon analysé, afin de limiter la quantité d'eau extraite puis injectée dans le système analytique. Néanmoins, dans le cas de tissus adipeux, les quantités de tissus disponibles sont souvent plus limitées et les masses d'échantillon couramment analysées sont déjà très faibles. Il convient donc d'envisager d'autres solutions.

Une autre alternative développée par Engel & Ratel (2007) consiste à éliminer l'eau présente dans les tissus adipeux par l'extraction d'une phase lipidique sous forme d'huile, obtenue par une étape de chauffage de l'échantillon, préalablement à l'analyse. Cette alternative s'est révélée efficace pour améliorer la qualité du signal analytique, mais l'influence de cette étape de chauffage supplémentaire sur la génération d'artefacts n'a pas été évaluée. Ainsi, lors de l'utilisation de cette procédure pour l'étude des composés volatils contenus dans les tissus adipeux, il sera nécessaire d'apprécier la représentativité de la fraction volatile de cet extrait lipidique par rapport à celle de l'échantillon de tissu adipeux natif. Les barèmes durée/température utilisés pour l'extraction de la phase liquide lipidique devront être réduits au maximum afin de limiter les risques de génération d'artefacts liés au chauffage de l'échantillon sur la composition de sa fraction volatile, tout en maintenant un rendement d'extraction suffisant.

3.2. Caractérisation du potentiel informatif de la fraction volatile

La fraction volatile des produits animaux est composée de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de composés. L'analyse de ces composés consiste à les séparer, les identifier, et les quantifier par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

3.2.1. Evaluation rapide du potentiel informatif

Le temps requis pour l'exploitation d'un chromatogramme, en raison de la quantité et de la complexité des informations qu'il contient, constitue l'un des principaux verrous à l'analyse fine des signaux chromatographiques. L'évaluation rapide du potentiel informatif des chromatogrammes, préalablement à leur exploitation complète, permet ainsi de concentrer l'effort de recherche sur ceux qui présentent un intérêt particulier.

Dans cette optique, une sélection aléatoire de composés peut être analysée afin de prédire le potentiel informatif du chromatogramme, mais la représentativité de cette sélection est souvent délicate à évaluer, surtout si le nombre de molécules quantifiées est limité.

Une autre alternative réside dans l'utilisation d'empreintes spectrales virtuelles générées à partir des données séparatives. Cette procédure s'est avérée pertinente pour évaluer le

a

b

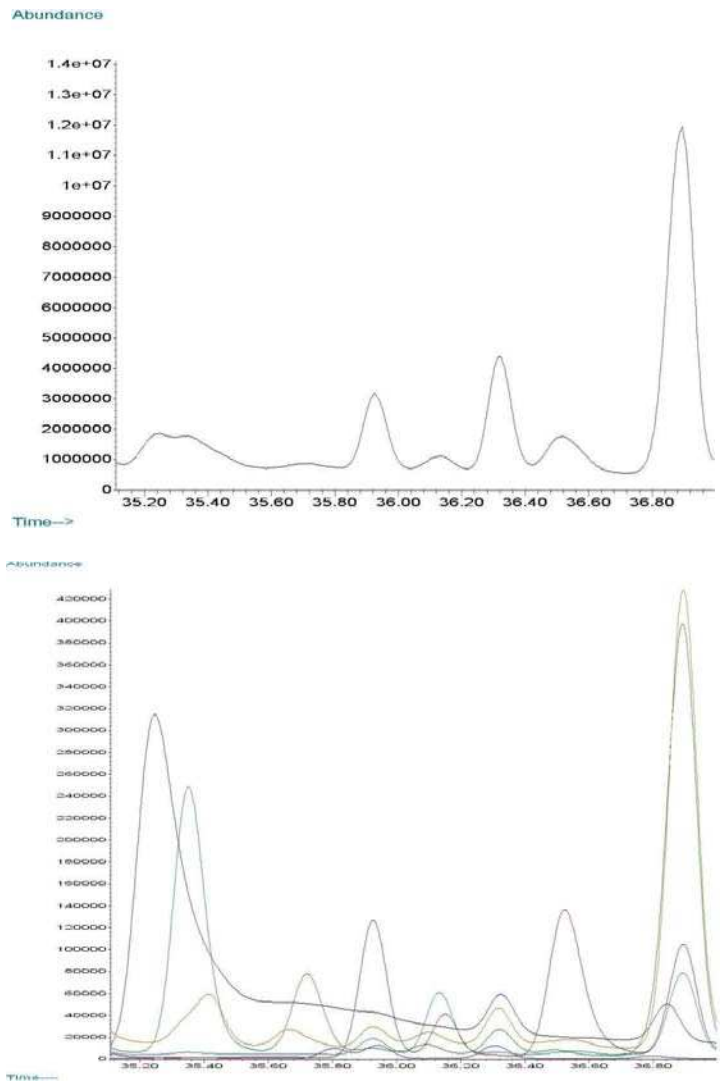

Figure 4. Exemple de coélution sur un chromatogramme monodimensionnel.

Fenêtre de temps de rétention de 35 à 37 minutes de la fraction volatile d'un tissu adipeux d'agneau d'herbe.

a - Mode « Total Ion Chromatogram » : Le tracé correspond à la somme de tous les ions (n=198).

b - Mode « Single Ion Monnitoring » : Chaque tracé correspond à un ion (n=6).

ion 108 : noir	**ion 119** : violet
ion 68 : vert	**ion 58** : bleu
ion 69 : kaki	**ion 99** : rouge

potentiel informatif discriminant dont sont porteurs les chromatogrammes (Engel & Ratel, 2007 ; Vasta *et al.*, 2007 ; Ratel *et al.*, 2008). L'empreinte spectrale virtuelle s'obtient en compilant tous les fragments de masse acquis pendant toute la durée de la séparation chromatographique, comme l'indique la figure 1 de la publication n°1, de manière à obtenir un profil de fragments de masse caractéristique de l'échantillon, comme si sa fraction volatile avait été directement injectée dans le spectromètre de masse. En traitant les données spectrales à l'aide des mêmes outils chimiométriques que les données séparatives, on dispose d'un aperçu grossier du potentiel informatif discriminant des chromatogrammes (Engel & Ratel., 2007). Cependant, il est impossible d'expliquer l'origine des différences mises en évidence. Aussi, une fois le potentiel informatif de la fraction volatile de l'échantillon démontré, l'exploitation détaillée du chromatogramme est effectuée.

3.2.2. Recherche détaillée des composés volatils

Après confirmation de l'intérêt informatif du chromatogramme par le biais de son empreinte spectrale virtuelle, son exploitation minutieuse est réalisée. Le principal obstacle à l'analyse exhaustive des composés volatils réside dans le phénomène de « coélution » des composés, c'est-à-dire le défaut de séparation chromatographique de la plupart d'entre eux (Figure 4). Cela est dû au fait que le pouvoir séparatif de la chromatographie en phase gazeuse est limité du fait du grand nombre de composés analysés, même en utilisant des colonnes haute résolution (Gorecki *et al.,* 2004). Par conséquent, en plus de l'information séparative fournie par la chromatographie, il faut recourir à celle apportée par le spectromètre de masse pour élucider l'identité de l'essentiel des composés coélués. Cette pratique demande beaucoup de temps et implique un degré d'expertise élevé de la part de l'opérateur.

Afin de résoudre les problèmes de coélution, l'utilisation de la chromatographie bidimensionnelle (CPGxCPG) offre de nouvelles perspectives. Ce type de dispositif est constitué de deux colonnes chromatographiques montées en série (Gorecki *et al.,* 2004). Le principe consiste à déconvoluer ou « dé-coéluer » les pics issus d'une première séparation au moyen d'une deuxième colonne chromatographique, dont les propriétés sont distinctes de la première. De précédents travaux, menés au laboratoire sur des tissus adipeux d'agneaux, ont révélé le gain d'information conféré par l'utilisation d'un système de chromatographie bidimensionnelle, par rapport à un appareillage classique monodimensionnel.

Cependant, le développement d'appareillages CPGxCPG opérationnels est très récent, et les recherches conduisant à leur maîtrise ainsi qu'à l'exploitation de leurs résultats méritent encore d'être approfondie.

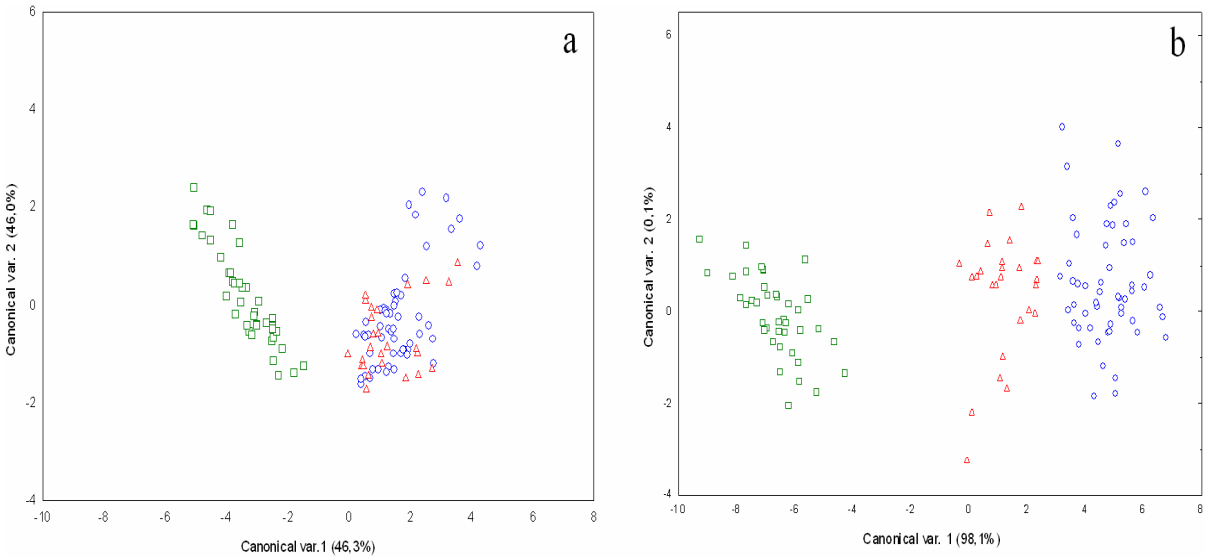

Figure 5. Classification de trois produits (huiles de noix) à partir de 2 composés analysés par ETD-CPG-SM, et sélectionnés par Analyse Générale Discriminante (5-méthyl-furfural, benzaldéhyde) réalisée sur 2 jeux de données :

a - réalisé sur les données brutes filtrées par ANOVA (facteur = type d'huile ; $p < 0,05$)

b - réalisé sur les données corrigées par Comprehensive Combinatory Standard Correction (correction exhaustive par combinaisons de standards) où la combinaison de standards la plus appropriée est utilisée pour corriger de manière indépendante l'aire de chaque composé.

Les différents symboles font référence aux trois produits

Les symboles font référence aux trois produits. L'algorithme « best subset » (Statsoft, Statistica™ 7.0) a été utilisé pour l'analyse l'analyse générale discriminante.

D'après Deport *et al.* (2005)

3.2.3. Mise en évidence des composés traceurs

Une fois identifiés et quantifiés, les composés dont l'abondance est significativement influencée par l'alimentation sont sélectionnés par analyse de variance (ANOVA). Afin de juger de la robustesse des variables discriminantes, une validation croisée de type « leave-one-out » est utilisée (Engel & Ratel, 2007).

La complémentarité de l'information représentée par les variables discriminantes provenant des différents tissus adipeux sera évaluée au moyen d'analyses générales discriminantes (AGD), avec pour contrainte de limiter le phénomène de surlissage des données en réduisant au maximum le ratio : nombre de variables prédictives utilisées pour construire le modèle discriminant / nombre d'observations.

La discrimination d'animaux sur la base de leur alimentation peut être améliorée en combinant les variables significatives en ratios, et en sélectionnant, par des tests univariés, les nouvelles variables discriminantes ainsi créées. D'après les travaux d'Engel *et al.* (2007), cette procédure permet d'amplifier le pouvoir discriminant des variables significatives.

3.3. Stabilisation du signal analytique

La fiabilité d'un modèle d'authentification basé sur l'analyse des composés volatils au moyen d'appareillages de type CPG-SM suppose l'élaboration d'une base de données pérenne à laquelle on peut se référer. Cette pérennité est menacée par l'existence de phénomènes de « dérives instrumentales » liées notamment à l'usure des composants du système analytique ou à leur encrassement au cours du temps (Deport *et al.*, 2005 ; Peres *et al.* 2002 ; Tranchant 1995). Les dérives instrumentales se traduisent par une variation parasite de l'intensité du signal délivré par le système analytique. Elles peuvent être progressives ou soudaines, linéaires ou non, et donc impossibles à prédire et à corriger *a priori*, particulièrement quand elles surviennent simultanément.

L'étude de Deport *et al.* (2005) a démontré l'influence des dérives instrumentales sur les données ETD-CPG-SM. Cette étude a consisté à analyser des huiles aux compositions proches avec un appareillage soumis à des dérives instrumentales importantes. Les auteurs ont montré que le bruit généré par ces dérives empêchait de discriminer les huiles, et constaté que les méthodes classiques de traitement des données (normalisation interne et correction standardisée) ne parviennent pas à redresser suffisamment le signal (Figure 5a).

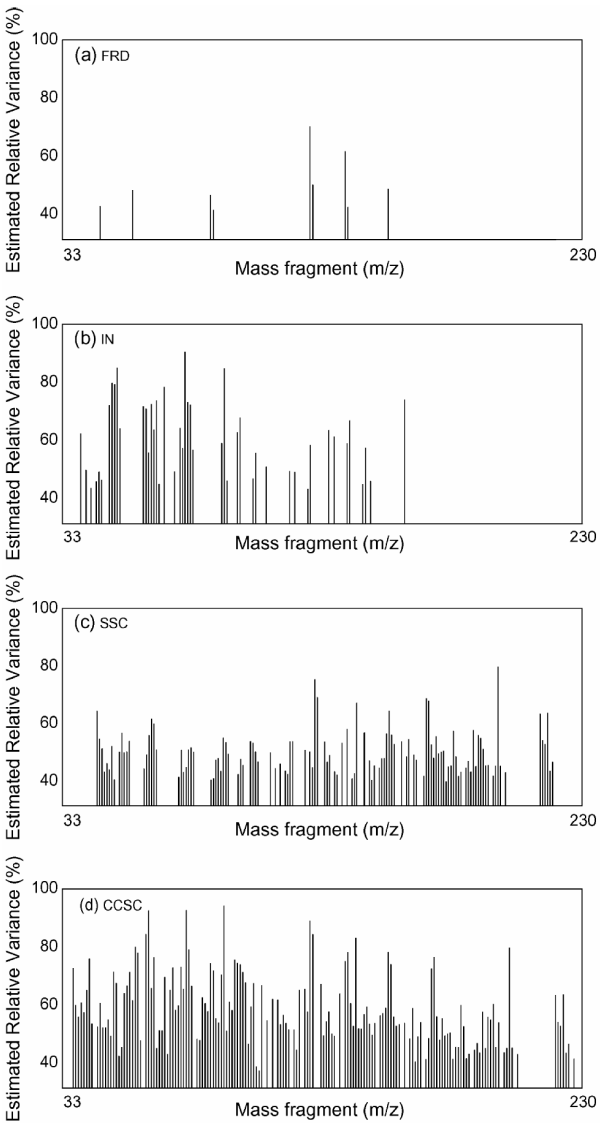

Figure 6. ANOVAgrammes de la contribution du facteur « type d'alimentation » à la variation de chacun des 198 fragments de masse d'empreintes spectrales virtuelles des fractions volatiles issues de tissus adipeux sous-cutané caudaux d'agneaux nourris exclusivement à l'herbe ou aux concentrés, après différents traitements chimiométriques.

a - FRD = Filtered Raw Data. Données "filtrées" par ANOVA (facteur = alimentations ; $p < 0,05$)

b - IN = Internal Normalization. Données normalisées en interne

c - SSC = Single Standard Correction. Données normalisées par l'abondance d'un standard unique

d - CCSC = Comprehensive Combinatory Standard Correction. Données normalisées par des combinaisons de standards. Chaque variable est corrigée par la combinaison de standards qui lui confère le meilleur pouvoir discriminant vis-à-vis du facteur « type d'alimentation ».

D'après Engel et Ratel (2007)

Les auteurs ont ainsi proposé une nouvelle approche, la CCSC (Comprehensive Combinatory Standard Correction), qui peut se traduire en Français par « correction exhaustive par combinaison de standards externes ».

Cette procédure se déroule en trois temps. Tout d'abord, plusieurs standards sont co-analysés avec l'échantillon (en l'occurrence, cinq). Ensuite, l'abondance de chaque composé est normalisée par toutes les combinaisons possibles d'abondance de standards. Enfin, une analyse de variance permet de sélectionner la correction qui conduit à la meilleure discrimination des produits analysés pour chaque composé. L'efficacité de la correction repose sur la capacité des standards sélectionnés pour un composé donné à mimer son comportement vis-à-vis des dérives instrumentales, au moment de son analyse.

À titre d'exemple, la formule ci-dessous donne l'abondance d'un composé *i*, corrigée par trois standards (S1, S2, S3). Les abondances des standards sont normées par rapport à la moyenne de l'un d'entre eux, calculée à partir de l'ensemble des analyses (ici le standard n°1).

$$A(i)_{corrigée} = \frac{A(i)_{mesurée}}{A_{S1}\frac{\overline{A_{S1}}}{\overline{\overline{A_{S1}}}} + A_{S2}\frac{\overline{A_{S1}}}{\overline{\overline{A_{S2}}}} + A_{S3}\frac{\overline{A_{S1}}}{\overline{\overline{A_{S3}}}}}$$

L'application de cette méthode a permis de discriminer correctement les huiles analysées, malgré les dérives appliquées volontairement au système analytique (Figure 5b). Cette technique a été améliorée et adaptée à la recherche des composés volatils dans les produits animaux par Engel et Ratel (2007). Ces auteurs ont mis en évidence la capacité de la CCSC à augmenter le pouvoir discriminant de chaque variable en améliorant globalement la sensibilité du système analytique (Figure 6).

Cette procédure sera appliquée systématiquement à nos données brutes afin de corriger les dérives du système analytique, et les variables discriminantes seront combinées en ratio afin d'amplifier leur pouvoir discriminant.

Chapitre **II** : Optimisation de l'analyse des composés volatils, et identification des traceurs de l'alimentation

Chapitre II : Optimisation de l'analyse des composés volatils, et identification des traceurs de l'alimentation

La première partie de ce travail de recherche consistait à mettre en évidence les traceurs volatils de l'alimentation de ruminants à partir de l'analyse de leurs tissus adipeux.

L'alimentation au pâturage est généralement considérée comme un gage de qualité par les consommateurs de produits animaux, et par conséquent souvent revendiquée par le biais de labels de qualité par les producteurs pratiquant un élevage de type extensif. À l'inverse, les filières de production intensive de ruminants utilisent des régimes désignés par l'appellation « concentrés » (Morand-Fehr. *et al.*, 2007), qui sont énergétiquement riches afin d'atteindre un haut niveau d'engraissement des animaux avant abattage. Ces pratiques d'alimentation bénéficient d'une image moins positive. À l'instar des travaux menés antérieurement dans la littérature, la distinction entre deux groupes d'animaux nourris de manière exclusive avec l'un ou l'autre de ces deux types d'alimentation a constitué la cible centrale de cette première série d'expérimentations.

Le modèle animal retenu pour les expériences est l'agneau. Plusieurs éléments expliquent ce choix. Premièrement, l'agneau occupe une part significative du marché européen des produits carnés (Meyn 2003 ; Volatier 2000). Deuxièmement, la durée d'élevage de ces animaux est compatible avec une alimentation post-sevrage exclusivement au pâturage ou composée d'un mélange concentrés/paille (80/20 w/w). Troisièmement, la taille restreinte de leurs tissus et organes, notamment par rapport à ceux des bovins, présente l'avantage de pouvoir réaliser un échantillonnage représentatif du tissu analysé. Enfin, en considération des coûts d'élevage et d'abattage, l'agneau est un modèle d'étude nettement moins onéreux que ne l'aurait été un bovin.

Comme le rappelle le Chapitre 1, la méthode plébiscitée par la littérature pour l'authentification des modes d'élaboration des produits animaux est l'analyse des composés volatils par espace de tête dynamique - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (ETD-CPG-SM). Néanmoins, il n'y a pas de consensus entre les auteurs sur les conditions d'analyse, ce qui explique probablement en partie les différences importantes dans la nature des biotraceurs de l'alimentation identifiés par les différentes études. Avant d'entreprendre la recherche de traceurs, il est donc nécessaire de mener une étude méthodologique visant à optimiser la fidélité, la fiabilité et la quantité d'information extraite de la fraction volatile. Deux points semblent plus particulièrement critiques. Il s'agit d'une part de l'étape d'extraction des composés volatils qui doit concilier un rendement suffisant avec une reproductibilité et une représentativité élevées, et d'autre part de la relative

instabilité du signal obtenu en CPG-SM due à des phénomènes de dérives instrumentales (Deport *et al.*, 2006).

Les discordances relevées dans la littérature, en termes d'identification des traceurs de l'alimentation à l'herbe, peuvent également provenir des différences dans les choix effectués par les auteurs quant à la nature des tissus adipeux analysés. Ainsi, Young *et al.*, 2003 étudient la fraction volatile extraite des tissus adipeux périrénaux, alors que d'autres auteurs ont choisis d'étudier les tissus adipeux sous-cutanés prélevés au niveau de la cuisse (Priolo *et al.*, 2004 ; Engel & Ratel, 2007), du dos (Sebastian *et al.*, 2003), ou de la croupe (Suzuki & Bailey, 1985). Au-delà des problèmes soulignés par la confrontation des résultats de ces études, les différences de composition en traceurs mises en évidence dans ces différents tissus suggèrent une complémentarité d'information utile pour augmenter la robustesse des diagnostics d'authentification de l'alimentation à l'herbe des ruminants. Dans cette optique, nous avons choisi d'entreprendre notre recherche de traceurs de l'alimentation sur trois tissus adipeux en parallèle. Il s'agit du gras sous-cutané caudal, périrénal, et péricardiaque. Les éléments qui ont motivé le choix de ces tissus sont exposés dans l'introduction de la première publication.

Les composés volatils identifiés et quantifiés dans ces tissus adipeux sont listés dans le tableau 12. Cette liste a été établie *a priori*, afin de cibler l'effort du dépouillement des chromatogrammes sur l'information recherchée. En effet, les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des composés volatils au moyen du système ETD-CPG-SM sont d'une grande complexité. Leur exploitation exhaustive requiert beaucoup de temps et d'expertise, et il n'existe, pour l'heure, aucune solution permettant d'opérer ce traitement des résultats de manière automatique et systématique. Cette liste comprend notamment les traceurs potentiels de l'alimentation identifiés par les auteurs des précédentes études, auxquels ont été rajoutés des composés présents à des teneurs significativement différentes dans les tissus étudiés.

1. Publication n°1

2. Complément de discussion sur l'étude des traceurs volatils de l'alimentation chez l'agneau

Les développements méthodologiques mis en œuvre dans cette première étude ont permis, comparativement aux travaux antérieurs, la mise en évidence d'un plus grand nombre de composés distinctifs de l'alimentation, et globalement une meilleure discrimination des régimes étudiés. Nos résultats confirment que l'étape intermédiaire d'extraction d'une phase lipidique, proposée par Engel & Ratel (2007) permet d'améliorer de manière significative la qualité de l'information obtenue à partir du tissu adipeux, vraisemblablement en limitant la quantité d'eau introduite dans le système analytique. De même, en limitant la température d'extraction à 70° C, nous proposons ici une méthode moins susceptible de néoformer des artefacts thermiques. Enfin, ces travaux permettent de confirmer l'intérêt de l'utilisation de la méthode CCSC, développée par le laboratoire, pour corriger les dérives instrumentales des systèmes de CPG-SM (Deport *et al*., 2006). Son application a permis de valider la pertinence de 19 composés traceurs de l'alimentation uniquement identifiés précédemment par Engel & Ratel (2007) qui utilisaient déjà cette méthode.

La comparaison de nos résultats avec ceux de la bibliographie montre que les composés identifiés comme traceurs d'une alimentation aux concentrés ne sont pas identifiés consensuellement. Cette divergence aurait pu là encore être mise sur le compte de différences de niveau de performances des méthodes d'analyse utilisées. Mais Engel & Ratel (2007), qui utilisent un dispositif analytique proche de celui mis en œuvre dans notre étude, n'identifient aucun des traceurs que nous avons mis en évidence pour l'alimentation à base de «concentrés». Ces divergences dans la nature des traceurs identifiés viennent probablement de la grande variabilité dans la composition des concentrés utilisés dans les différentes études. Il semble absurde d'essayer d'harmoniser les aliments du type concentrés utilisé pour les études futures car l'objectif de nos travaux est bien de développer les méthodes les plus génériques possibles, c'est-à-dire utilisables dans la plupart des situations de production. Pour cette raison, nous avons choisi de focaliser la suite de nos travaux sur l'identification des traceurs de l'alimentation au pâturage.

La publication n°1 montre que la discrimination des animaux en fonction de leur alimentation était significativement améliorée par l'analyse parallèle des trois tissus adipeux. Néanmoins, l'analyse discriminante générale réalisée sur les données montre que l'apport informatif du tissu péricardiaque, en termes de gain de pouvoir discriminant, est négligeable. Par conséquent, seuls les tissus sous-cutané et périrénal seront considérés dans la suite de nos travaux.

Chapitre **III** : Persistance de disparition des traceurs de l'alimentation au pâturage dans les tissus adipeux d'agneaux d'herbe finis aux concentrés

<u>Chapitre III :</u> Persistance de disparition des traceurs de l'alimentation au pâturage dans les tissus adipeux d'agneaux d'herbe finis aux concentrés

La robustesse des traceurs mis en évidence dans la publication n°1 est limitée dans mesure où ils ne peuvent discriminer que des tissus d'animaux nourris après sevrage avec un seul type de régime. En pratique, les éleveurs ont couramment recours à des modes d'alimentation consistant à alterner des périodes de régime au pâturage et aux concentrés. Dans le cas des ovins, ces régimes alternés consistent le plus souvent en une alimentation au pâturage suivie par une période dite de finition « à l'étable » pendant laquelle les animaux sont nourris uniquement avec des aliments concentrés plus énergétiques, et ce, jusqu'à l'abattage. La durée de cette période de finition varie selon les pratiques d'élevage. Pour être opérationnelle, la méthode d'authentification de l'alimentation des ruminants au pâturage que nous cherchons à développer doit être capable de mettre en évidence ces périodes de finition et d'en caractériser l'ampleur, en termes de durée d'élevage ou de poids d'engraissement.

Pour distinguer ces régimes mixtes d'une alimentation exclusivement à base de pâturage, il faut pouvoir disposer d'informations sur l'évolution de la teneur des traceurs de l'alimentation dans les tissus animaux lors du passage d'un type d'alimentation à un autre. Il s'agit en particulier de voir s'il est possible de distinguer des comportements cinétiques différents selon la nature des traceurs et selon la nature du tissu analysé. Dans ce deuxième volet de nos travaux, nous avons donc cherché à caractériser la persistance de traceurs de l'alimentation mis en évidence dans deux tissus adipeux d'agneaux nourris d'abord à l'herbe puis engraissés de 0, 4, 8 ou 12 kg avec des concentrés.

Les composés volatils analysés dans le tissu périrénal et dans le tissu sous-cutané caudal sont issus de la liste présentée dans le tableau 12, à laquelle ont été retirés les 45 composés non identifiés comme traceurs dans ces deux tissus lors de la première expérimentation.

1. Publication n°2

Persistence of pasture-feeding volatile biomarkers in lamb fats

Guilhem SIVADIER[1], Jérémy RATEL[1], Erwan ENGEL[1]*

[1] INRA UR370 Qualité des Produits Animaux, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

ABSTRACT

Recent studies have evidenced volatile biomarkers in ruminant tissues that distinguish between exclusive pasture and exclusive concentrate diets. As ruminants usually alternate these diets, we set out to monitor the persistence of volatile tracers of pasture diet in perirenal fat and caudal sub-cutaneous fat in lambs (n = 28) fed on pasture and then fattened at increasing levels with concentrate: Four groups of lambs (n = 7) were stall-finished to achieve a final weight gain of 0, 4, 8, and 12 kg respectively. 39 pasture diet tracers including terpenes, 2,3-octanedione and toluene were found that distinguish between the four different diets in both tissues. According to their clearance rates monitored in the adipose tissues of lambs fattened with different amounts of concentrate, different types of persistence were evidenced. Most of the compounds exhibited a “short” persistence, e.g. 2,3-octanedione and terpenes, while some displayed a “medium” or “long” persistence. Finally, performing Discriminant Analysis on ratios of tracers from the two adipose tissues enabled the correct differentiation of the four different diets.

Keywords: Authentication, meat product, GC-MS, volatile compounds, adipose tissues, ruminant, persistence, drift correction.

1. INTRODUCTION

There is an increasing demand from consumers, commercial entities and bodies operating product certification systems for the development of robust analytical tools to authenticate ruminant feeding based on meat products. Numerous studies have found the analysis of the volatile fraction of dairy (Engel, Ferlay, Cornu, Chilliard, Agabriel, Bielicki, & Martin, 2007) and meat products (Sebastian, Viallon-Fernandez, Berge & Berdague, 2003 ; Vasta & Priolo, 2006 ; Engel & Ratel, 2007) to allow the construction of robust models for

animal diet authentication. These studies were conducted on samples from animals fed exclusively either pasture or concentrate. However, ruminants are usually fed diets in which pasture and concentrate periods alternate. Some authors (Larick, Hedrick, Bailey, Williams, Hancock, Garner, & Morrow, 1987 ; Larick & Turner, 1990 ; Noziere, Grolier, Durand, Ferlay, Pradel, & Martin, 2006 ; Aurousseau, Bauchart, Faure, Galot, Prache, Micol, & Priolo, 2007a ; Aurousseau, Bauchart, Galot, Prache, Micol & Priolo, 2007b) have studied the variations in levels of diet biomarkers in meat or milk samples from animals fed with alternating diets consisting of an exclusive pasture feeding period followed by a concentrate-finishing period of variable duration. Monitoring the level of carotenoids (Noziere et al., 2006) or fatty acids (Aurousseau et al., 2007a and 2007b) allowed only the differentiation of diets exhibiting marked differences in the concentrate-finishing levels. By analysing the volatile fraction of beef samples, Larick et al. (1987) showed that volatile compounds could segregate diets into graduated concentrate-finishing durations. However, the list of the feeding tracers identified differs from other literature reports and may not be reliable, given the harsh operating conditions used by these authors. Recent developments in volatile compound analysis such as instrumental drift correction (Arvanitoyannis & Van Houwelingen-Koukaliaroglou, 2003 ; Deport, Ratel, Berdague, & Engel, 2006) and gentle operating conditions limiting the occurrence of artefacts caused by heat (Vasta, Ratel, & Engel, 2007) identified dozens of relevant discriminant compounds with identifiable metabolic origins.

The objective of this three-step study was to determine the persistence of volatile tracers of pasture diet in adipose tissues of lambs initially fed on pasture and stall-fattened to achieve a final weight gain of 0 kg (P), 4 kg (PC4), 8 kg (PC8), or 12 kg (PC12). Two adipose tissues, the perirenal fat (PRF) and the caudal sub-cutaneous fat (CSCF), were analysed in each animal, as we had previously found in preliminary study that the parallel analysis of volatile diet tracers from the two tissues improved the power of differentiation between exclusive pasture and exclusive concentrate diets. The aim of the first step was to identify the volatile pasture diet tracers by comparing the volatile compound composition in the two tissues of lambs fed on pasture and then fattened for either 0 or 12 kg with concentrate. The second step aimed at characterizing the persistence rates of these tracers by determining their relative abundances in adipose tissues of lambs stall-finished for a final weight gain of 0, 4, 8, or 12 kg. The third step aimed at assessing the relevance of these findings concerning the persistence of the pasture diet tracers for distinguishing between different concentrate fattening degrees in grazing lambs on the basis of conventional GC-MS analysis of their adipose tissues.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animal Products

A herd of 28 male INRA401 lambs born at the INRA research centre (Theix, FRANCE) during a 6-week period were divided, after a 45-day weaning period, into four groups of seven lambs each. The first group (P) was fed exclusively at pasture (consisting predominantly of Graminaceae) with no other additional feed. The animals were slaughtered according to the conventional EU procedures at the targeted weight of 40 kg, corresponding to a mean age of 186 days. The other three groups were initially fed at pasture until they reached the target weights of 28 kg (PC12), 32 kg (PC8), and 36 kg (PC4). Each of these 3 groups was installed in a large stall where they were offered a pelleted concentrate diet consisted of (w/w) 30% hay and 70% commercial concentrate containing barley (20%), wheat bran (15%), wheat (15%) and sugar beet (15%) as main constituents (THIVAT Nutrition Animale, Saint-germain-de-salles, France). The animals were all slaughtered at the target weight of 40 kg weight, corresponding to a mean age of 163 days.

Perirenal and subcutaneous fats were chosen for the study according to a preliminary work (Sivadier, Ratel, Bouvier, & Engel, 2008), in which it was established that the simultaneous data treatment of the volatile fraction of these two adipose tissues improved diet authentication. In addition, Vezinhet, Prud'hon, & Benevent (1974) reported different growth rates: perirenal fat is developed early in the lamb's life, while subcutaneous fat starts growing in the post-natal period. Diet information may thus have different implications in both tissues.

2.2. Preparation of samples

At 1 h post mortem a sample of each adipose tissue was excised from the lamb carcass: perirenal fat (PRF) was adipose tissue directly covering the left kidney, and caudal subcutaneous fat (CSCF) was tissue 10 cm from the tail. The adipose samples were trimmed free of all traces of muscle and immediately immersed in liquid nitrogen, wrapped in aluminium foil, vacuum packed and stored at 80℃ until the next preparation step.

Two days before the analysis each adipose tissue was immersed in liquid nitrogen, cut into small cubes (less than 0.1 g) and ground in liquid nitrogen with a crushing machine (model Dangoumeau, Prolabo, Nogent-sur-Marne, France) to a fine homogeneous powder. Three grams of powder was then placed in glass vials (Wheaton Science Products) under a nitrogen flow and heated for 15 min at 70℃ in a 100–800 oven (Memmert, Schwabach, Germany). A mean of 1.2 g of liquid lipid phase was obtained, placed in glass vials sealed under nitrogen flow, and stored at -20℃ until analysis. Just before analysis, the frozen extracts were thawed for 7.5 min at 70℃.

2.3. Addition of the standards

The comprehensive combinatory standard correction (CCSC) was used to correct instrument drifts, according to Deport et al., (2006). As previously stated by Engel & Ratel (2007), six standards were chosen according to various criteria including (i) boiling point compatibility with the experimental conditions, (ii) stability, (iii) absence in samples before analysis, (iv) purity of commercially available solutions, (v) relative specificity of mass spectrometry fragmentation and (vi) safeness. The standards used were 2-methyl-pentane (S1; purity 99.5%), 1-bromo-butane (S2; purity 99.7%), fluoro-benzene (S3; purity 99.7%), bromo-benzene (S4; purity 99.5%), 1-fluoro-naphthalene (S5; purity 99.0%) and 1-phenyl-nonane (S6; purity 99.8%) (Sigma-Aldrich Chimie, Saint-Quentin-Fallavier, France). A mixture of the six standards was made and co-analysed with the lipid liquid extract at a final concentration of approx. 50 ppm for each standard (w/w).

2.4. Dynamic headspace - gas chromatography - mass spectrometry (DH-GC-MS) analysis.

A plug of glass wool (0.2 g) (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) was introduced into a glass extraction cartridge (diameter 28 mm, length 100 mm, Ets. Maillière, Aubière, France). A 1 g aliquot of sample was placed on the glass wool and 10 µL of the mixture of standards was added on a second plug of 0.1 g of glass wool placed on the sample. The volatile fraction was extracted by dynamic headspace using a purge-and-trap device (model 3100 Sample Concentrator, Tekmar, Cincinnati, OH, USA). After a pre-purge of 5 min and a preheat of 15 min, the headspace of the sample was purged for 30 min under a 65 ml min-1 helium flow (He U quality, purity 99.995%, Messer, St.-Georges-d'Espéranche, France). The temperature of the sample during the DH extraction step was set at 70℃. The volatiles were trapped by adsorption on a porous-polymer adsorbent Tenax trap column (Tenax TA, straight, 12" × 30.5 cm, 24 cm of adsorbent, Supelco, Bellefonte, PA, USA) maintained at 36℃. After a dry purge at 36℃ for 5 min, the volatile compounds were desorbed for 10 min at 230℃ under a helium flow (He N55, purity 99.9995%, Messer). Extracted compounds were then transferred to the head of a capillary column after cryoconcentration at -150℃. After desorption, the Tenax trap was further heated for 30 min at 230℃.

The compounds condensed at the head of the column were analysed by GC (model 6890, Hewlett-Packard, PA, USA); the interface was heated at 225℃ for 2 min followed by injection of the compounds in splitless mode into the non-polar phase of the capillary column (SPB5, 60 m × 0.32 mm × 1 µm, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). The oven temperature was held at 40℃ for 5 min, and then increased to 230℃ with a gradient of 3℃.min-1, and maintained at this temperature for 10 min. The GC column was connected to a mass spectrometer (model 5973A, Hewlett-Packard). The temperature of the transfer line

was set at 230 ℃. The temperature was fixed at 180 ℃ in the MS source and at 150 ℃ in the MS quadrupole. The electron impact energy was set at 70 eV and data were collected in the range of m/z 33 to 230 at a scan range of 6.85 scans per second. Tentative identification of volatiles was based on (i) mass spectra by comparison with MS spectra database including NBS 75K, Wiley 275L or Masslib (MSP Kofel, Zollikofen, Switzerland) (ii) comparison of retention indices (RI) with published RI values (Kondjoyan & Berdague, 1996) or with those of our internal data bank. The peak area of the tentatively identified compounds was integrated from the specific ion for each of the molecules to avoid co-elution problems. The integrations were performed with the Enhanced ChemStation software (version D.01.02.16, Hewlett- Packard).

2.5. Data treatment.

Data were processed using the Statistica Software release 8.0 package (Statsoft, Maisons-Alfort, France) and the R software version 2.1.4. R development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.com.

DH-GC-MS raw data were processed with CCSC according to Engel & Ratel (2007). The mixture of the six selected standards was analysed together with the sample, and the abundance of each compound specific ion was normalized by the sum of the abundances of the specific ion of standards, selected among the possible sums where p represents the number of standards in a given sum, enabling the best product discrimination.

To determine which compounds distinguished between the exclusive pasture diet (P) and the alternate pasture then 12 kg concentrate-finishing diet (PC12), a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed according to the model: CCSC pre-treated abundance of compound specific ion: type of feeding, $p < 0.05$). Principal component analyses (PCA) were performed on the CCSC pre-treated abundances of the discriminant compound specific ions to visualize the structure of the data.

To monitor the persistence of specific tracers of the four types of diet in PRF and CSCF, the compounds that discriminated between P and PC12 were filtered by one-way ANOVA (model: CCSC pre-treated abundance of compound specific ion: type of feeding, $p < 0.05$) according to the four modalities: P, PC4, PC8, and PC12. A Newman-Keuls mean comparison test was then performed on the resulting dataset to determine which compound distinguished between the four diets with increasing concentrate quantities.

To establish the possibility of distinguishing between the four types of diet on the basis of the volatile compounds from the lipid liquid extracts of the two adipose tissues, the most robust volatile tracers were obtained by filtering previous datasets of PRF and CSCF with a one-way ANOVA (with same factor) followed by a leave-one-out cross validation procedure ($p < 0.05$). A PCA was then performed on the filtered tracers from each adipose tissue and from the two pooled together in the same dataset ($n = 35$), to visualize the structure of the

Table 1. Compounds identified as lamb pasture feeding tracers in PRF and CSCF tissues.

RLI [a]	Compounds [b] (*n* = 54)	PRF [c] (*n* = 41)	CSCF [c] (*n* = 36)	Ref [d]
	alkanes			
857	Heptane, 2,3-dimethyl-	X		
900	Nonane	X		
972	Nonane, 3-methyl-	X		[2]
1200	Dodecane	X	X	
1264	Undecane, 2,10-dimethyl-	X		
1300	Tridecane	X		
1364	Tridecane, 2-methyl-	X		
1378	Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	X		
1400	Tetradecane	X	X	[1]
1463	Decane, 2,3,7-trimethyl-	X	X	[1]
1472	Tetradecane, 3-methyl-	X		
1488	Cyclododecane, 1-ethyl-2-methyl-	X	X	
1500	Pentadecane	X	X	[1]
1600	Hexadecane	X	X	[1]
1700	Heptadecane		X	[1]
	alkenes			
488	1-Pentene	X		
796	(Z)-4-Octene	X	X	[2]
806	(E)-4-Octene	X	X	[2]
815	(E)-2-Octene	X	X	[2]; [4]
1495	1-Pentadecene	X	X	
	alcohols			
684	1-Penten-3-ol	X	X	
767	1-Pentanol		X	
	aldehydes			
593	Butanal	X		
648	2-Butenal		X	[2]
696	Pentanal		X	[2]
755	(E)-2-Pentenal		X	[2]
854	(E)-2-Hexenal		X	
900	(Z)-4-Heptenal	X	X	[2]; [1]
901	o-Xylene		X	
970	Benzaldehyde	X		[2]; [4]
1014	2,4-Heptadienal	X	X	[2]; [1]
1036	Benzene, 1,3,5-trimethyl-	X	X	[2]

Table 1 (suite). Compounds identified as lamb pasture feeding tracers in PRF and CSCF tissues.

RLI [a]	Compounds [b] (*n* = 54)	PRF [c] (*n* = 41)	CSCF [c] (*n* = 36)	Ref [d]
	benzene compounds			
663	Benzene	X		
771	Toluene	X	X	[2]
898	Styrene	X	X	
	ketones			
591	2,3-Butanedione		X	
889	Ethanone, 1-(1-cyclohexen-1-yl)-	X		
979	1-Octen-3-one		X	[2]
982	2,3-Octanedione	X		[2]; [1]; [3]
1074	(E,E)-3,5-Octadien-2-one	X	X	[2]
1079	Acetophenone	X	X	[2]
1297	2-Undecanone	X		
1500	2-Tridecanone	X		
	chlorine compounds			
962	Heptane, 1-chloro-	X	X	
	nitrogen compounds			
748	Pyridine	X		
	oxygen compounds			
605	Furan, 2-methyl-	X		[2]
702	Furan, 2-ethyl-		X	
	sulfur compounds			
908	Methional		X	[3]
916	Sulfone, dimethyl-	X	X	[2]; [3]
	terpenes			
944	α-Pinene		X	
1034	p-Cymen		X	[2]; [3]
1407	α-Copaene	X	X	[2]
1461	β-Caryophyllene	X	X	[2]; [3]
1554	trans-Cadina-1(6),4-diene	X	X	[2]; [3]

[a] Retention linear index on a SPB5 capillary column.

[b] Compounds (*n* = 54) tentatively identified on the basis of both mass spectra by comparison with MS databases and retention linear indices of data banks.

[c] Adipose tissues: PRF = perirenal fat, and CSCF = sub-cutaneous caudal fat.

[d] Literature references were compounds stated as pasture diet tracers. [1] : Sebastian et al. (2003) ; [2] Engel et al. (2007b) ; [3] : Vasta et al. (2006) ; [4] : Maruri et al. (1992).

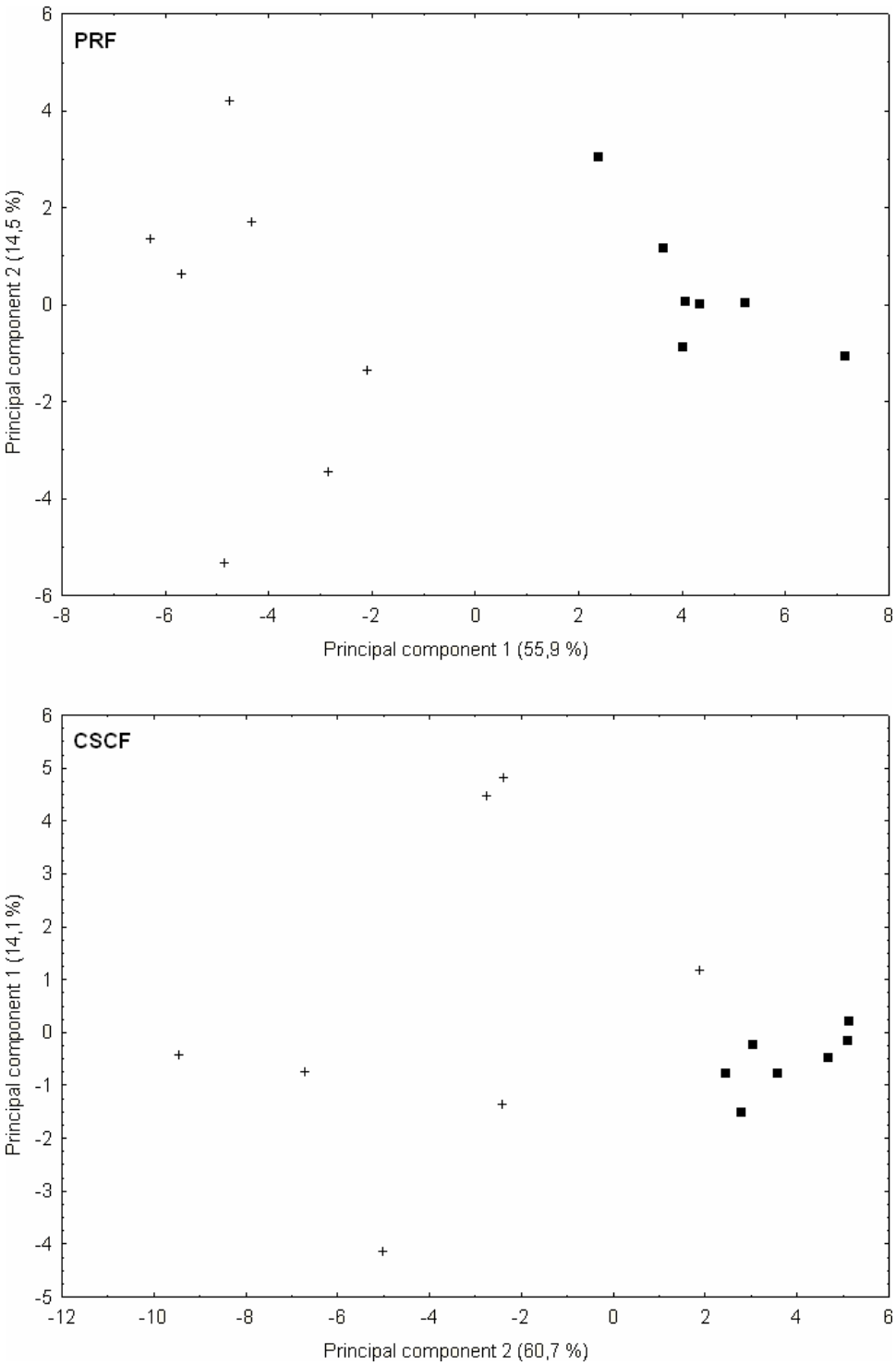

Figure 1. Differentiation of concentrate- and pasture fed lambs based on GC-MS analysis of their adipose tissues: exclusive pasture (+ / cross) and alternating pasture and fattening for 12 kg with concentrate (■ / solid square).

First map of normed PCAs carried out from the CCSC pre-treated abundances of the volatile compounds determined affected by the two types of diet by one-way ANOVA ($p < 0.05$). Forty-one compounds were selected in perirenal fat (PRF), and 36 in caudal sub-cutaneous fat (CSCF).

data. A Newman-Keuls mean comparison test was performed on the coordinates of the observations on the first principal component to assess its significance in the differentiation of the four diets. The gain in discriminative power obtained by processing the two adipose tissue volatile tracers in parallel was assessed by performing a discriminant analysis (DA) carried out on the previous datasets. The Wilk's λ values, which give the quality of differentiation of the four diets, were determined for the combinations of three tracers (triplets) from one or the two adipose tissues, built up according to the "best subset" algorithm. The optimization of the differentiation of the four diets was obtained via ratios of tracer abundances. On the basis of the tracers from the two tissues previously selected (n = 35), the possible ratios were calculated and filtered by a one-way ANOVA (model: ratio of CCSC pre-treated abundances of compound specific ions: type of feeding, $p < 0.05$) followed by a leave-one-out cross validation procedure. Among the selected ratios, when several involved the same compound in the same tissue, only the one with the best Fisher F was selected. After processing the data with a PCA a Newman-Keuls mean comparison test was performed on the coordinates of the observations on the two principal components of the first map to assess their significance in the differentiation of the four diets.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Identification of pasture-diet tracers in the adipose tissues

A list of 125 volatile compounds known as potential tracers of pasture or concentrate feeding diets (Maruri & Larick, 1992 ; Sebastian et al., 2003 ; Vasta & Priolo, 2006 ; Engel & Ratel., 2007 ; Sivadier et al., 2008) were semi-quantified in perirenal fat (PRF) and caudal sub-cutaneous fat (CSCF) of P- and PC12-lambs. The compounds distinguishing between P and PC12 diets were selected by one-way ANOVA ($p < 0.05$). Forty-one and 36 compounds were selected in the PRF and CSCF respectively. Twenty-three were common to the two tissues studied (table 1). The fact that some compounds were found to be discriminant in one tissue but not in the other (18 in PRF, and 14 in CSCF) supports the informative complementarity of the two tissues and the usefulness of studying them in parallel. The first map of the PCA performed on discriminant compounds of the two tissues is shown in Figure 1. It reveals a clear differentiation between the two diets, confirming that the volatile fraction of these two tissues allows the authentication of the lamb diets.

Among the compounds distinguishing between P and PC12 diets in the two tissues (n = 54), 28 compounds had been determined as pasture diet tracers by several previous studies (Sebastian et al., 2003 ; Vasta & Priolo, 2006 ; Engel & Ratel., 2007, Sivadier et al., 2008). The common determination of these 28 pasture-diet tracers in fat tissues of lambs raised with different husbandry practises (e.g. animal breed, type of pasture & concentrate, lamb

growth rate…) validate the relevance of these compounds for a robust authentication of fats of pasture fed lambs (Table 1).

2,3-Octanedione. This compound is the most widely recognized pasture diet tracer in the literature (Vasta & Priolo, 2006 ; Sivadier et al., 2008). According to Young, Berdague, Viallon, Rousset-Akrim, & Theriez (1997), it originates from the oxidation of linoleic acid by the action of the enzyme lipoxygenase, which is present in leafy plants but absent in seeds, except for soybeans. Three other ketones (1-octen-3-one, (E,E)-3,5-octadien-2-one, and acetophenone) were identified as tracers in several previous studies (Vasta & Priolo, 2006 ; Sivadier et al., 2008).

Alkanes. Similarly, six alkanes (3-methyl-nonane, 2,3,7-trimethyl-decane, tetradecane, pentadecane, hexadecane, and heptadecane) were identified as reliable pasture diet tracers (Larick et al., 1987 ; Sebastian et al., 2003 ; Engel & Ratel, 2007 ; Sivadier et al., 2008). As regards the four non-branched alkanes (C14-C17), their relation with the pasture diet could be explained by the higher amounts of long chain polyunsaturated fatty acids in the tissues of pasture-fed lambs in comparison with concentrate fed lambs tissues (Aurousseau et al., 2007a,b). According to Watanabe & Sato (1971), these saturated alkanes may derive from decarboxylation and splitting of carbon-carbon chains.

Benzene compounds. Benzaldehyde, 1,3,5-trimethyl-benzene, and toluene were detected in higher amounts in adipose tissues of pasture fed lambs than in tissues of lambs fed with any of the three concentrate finishing diets. According to Rios, Fernandez-Garcia, Minguez-Mosquera, & Oerez-Galvez (2008), the toluene may arise from the degradation of carotenoids supplied by pasture. These three compounds are also atmosphere pollutants which are known to be retained by green plants (Binnie, Cape, Mackie, & Leith, 2002)

Terpens. Mainly originating from green herbages (Body, 1977), terpenes are commonly detected in adipose tissues of pasture fed lambs (Priolo et al., 2004 ; Sivadier et al., 2008). They are generally too specific to some plant species to be used as generic tracers of a pasture diet (Engel & Ratel, 2007). However, p-cymen, α-copaene, β-caryophyllene, and trans-cadina-1(6),4-diene are identified as recurrent pasture diet tracers in the literature (Vasta & Priolo, 2006 ; Engel & Ratel, 2007 ; Sivadier et al., 2008) and can be considered as generic pasture diet tracers.

Aldehydes. 2-Butenal, pentanal, (E)-2-pentenal, (Z)-4-heptenal, and 2,4-heptadienal were found to be characteristic of the pasture diet by some previous studies (Sebastian et al., 2003 ; Engel et Ratel, 2007 ; Sivadier et al., 2008). In contrast with Brown, Melton, Riemann, & Backus (1979), who proposed that some aliphatic aldehydes (e.g. pentanal) were related to the pasture feeding, Vasta & Priolo, (2006) showed there was no consensus for relating these compounds to a given diet. Because they originate from lipid oxidation,

Table 2. Persistence of pasture feeding tracers in PRF and CSCF lamb tissues.

Compounds [a] (n = 39)	PRF [b] (n = 32) persistence rate [c]	CSCF [b] (n = 22) persistence rate [c]
alkanes		
Cyclododecane, 1-ethyl-2-methyl-	short	short
Decane		persistant
Decane, 2,3,7-trimethyl-	short	short
Dodecane	persistant	
Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	short	
Hexadecane	short	medium
Undecane		persistant
Nonane	medium	
Pentadecane	short	
Tetradecane	short	
Tridecane	persistant	
alkenes		
(E)-2-Octene	short	short
(E)-4-Octene	short	short
(Z)-4-Octene	short	short
1-Pentadecene	short	short
1-Pentene	medium	
alkool		
1-Penten-3-ol	short	medium
aldehydes		
2,4-Heptadienal	short	
Butanal	short	
(Z)-4-Heptenal	short	medium
bezene compounds		
Benzene	medium	
Styrene	medium	medium
Toluene	short	short
ketones		
(E,E)-3,5-Octadien-2-one	short	
2,3-Octanedione	short	
2-Tridecanone	short	
2-Undecanone	long	
Acetophenone	persistant	
2,3-Butanedione		long

Table 2 (suite). Persistence of pasture feeding tracers in PRF and CSCF lamb tissues

Compounds [a] (*n* = 39)	PRF [b] (*n* = 32) persistence rate [c]	CSCF [b] (*n* = 22) persistence rate [c]
chlorine compounds		
Heptane, 1-chloro-		other
nitrogen compounds		
Pyridine	short	
oxygen compounds		
Furane, 2-methyl-	short	
sulfur compounds		
Sulfone, dimethyl-	short	short
Methional		persistant
terpenes		
ß-Caryophyllene	short	medium
trans-Cadina-1(6),4-diene	short	short
p-Cymen		short
α-Copaene	short	short
α-Pinene		short

[a] Compounds (*n* = 40) found to distinguish between the four types of diets

[b] Adipose tissues: PRF = perirenal fat, and CSCF = sub-cutaneous caudal fat.

[c.] Persistence determined by a Newman-Keuls mean comparison test.

their occurrence may be favoured by many factors other than the type of feeding, such as the temperature used for volatile compound extraction.

(E)-2-Octene. This compound, derived from α-linolenic acid according to Elmore, Warre, Mottram, Scollan, Enser, & Richardson (2004), was determined as a pasture diet tracer in both this study and the literature (Maruri & Larick, 1992 ; Engel & Ratel, 2007; Sivadier et al., 2008).

To our knowledge, there is no evidence indicating the metabolic origin of methional, dimethyl-sulfone, 2-methyl-furane, and (E)- and (Z)-4-octene. Nevertheless, these compounds were also identified as pasture diet tracers in previous data (Vasta & Priolo, 2006 ; Engel & Ratel, 2007 ; Sivadier et al., 2008).

Among the compounds that were not found to distinguish between diets P and PC12, some were recurrently identified as pasture diet tracers in the literature (Maruri & Larick, 1992 ; Sebastian et al., 2003 ; Engel & Ratel, 2007). These compounds are: 1-methyl-cyclohexane, hexane, (Z)-2-octene, heptanal, m-cymen, and 3 alkyl-benzenes (2-ethyl-1,3-dimethyl-benzene, 1,2,3,4- and 1,2,4,5-tetramethyl-benzene). These discrepancies with the literature may be explained by differences between the rearing protocol used by the previous and the present studies. The PC12 diet consisted in pasture feeding for approximately 80 days after weaning, followed by concentrate feeding for about the same duration, while the exclusive concentrate feeding periods in the previous studies (Maruri & Larick, 1992 ; Sebastian et al., 2003 ; Engel & Ratel, 2007) were 101, 113, and 175 days after weaning. Hence we can assume that using the PC12 diet, the duration of the period where concentrate is given may be too short to significantly decrease the level of these compounds. Accordingly, we can assume that these compounds are particularly persistent pasture diet tracers. Concerning the other compounds found discriminant in previous studies but not in the present work, these may be too specific to experimental features to be considered as generic.

3.2. Persistence of pasture-diet tracers in adipose tissues

The 54 compounds found to distinguish between the P and PC12 diets were semi-quantified in the adipose tissues of the lambs fed with the PC4 and PC8 diets. The compounds distinguishing between the four diets were determined by ANOVA ($p < 0.05$). Thirty-two and 22 compounds were selected as feeding tracers in the PRF and CSCF, respectively, with 15 in common (Table 2). Thirty-three of these 39 pasture feeding tracers decreased significantly when animals are finished with concentrate. This decrement confirms first that these compounds are pasture-diet tracers, and second that the switch to concentrate diet results in a more or less fast decrease in the abundance of these tracers in lamb adipose tissues. These data are in agreement with the study performed by Larick et al. (1987) which showed a decrease of pasture-diet tracers in fat tissue of beef finished with concentrate.

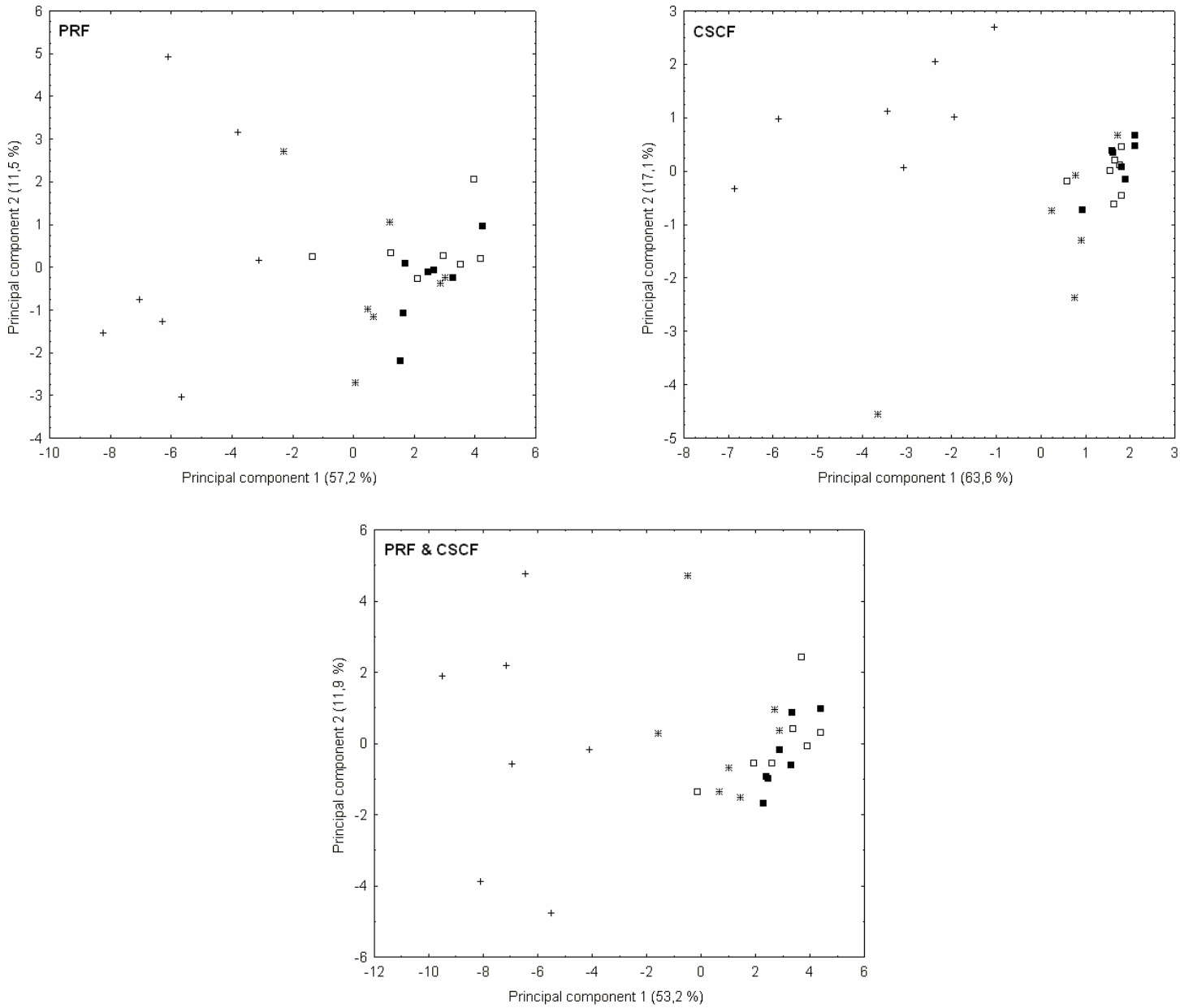

Figure 2. Differentiation of pasture-fed lambs fattened for various weight gain with concentrate based on GC-MS analysis of their adipose tissues: exclusive pasture (+ / cross) and alternating pasture and fattening with concentrate for a final gain of weight of 4 kg (∗ / star), 8kg (□ / open square), or 12 kg (■ / solid square).

First map of normed PCAs carried out from the CCSC pre-treated abundances of the volatile compounds determined distinguishing between the four types of diet by one way ANOVA followed by a leave-one-out cross validation procedure ($p < 0.05$). Twenty-five compounds were selected in perirenal fat (PRF) and 10 in caudal sub-cutaneous fat (CSCF). The pool dataset thus comprised 35 compounds.

Twenty-four compounds in PRF and 13 in CSCF were shown to distinguish between P and each of the other alternating diets and can so be considered as pasture diet tracers with “short” persistence (see Table 2). Similarly, most of the volatile pasture diet tracers evidenced in beef fat by Larick et al. (1987) were shown to decrease significantly whatever the duration of the concentrate finishing diet. The short persistence pointed out for 2,3-octanedione in both studies suggests an interspecific genericity. Four compounds in PRF and 5 in CSCF distinguished between P diet and pasture diets followed by a concentrate fattening for a final weight gain greater than or equal to 8 kg (PC8 and PC12). The latter compounds were considered as tracers with “medium” persistence. Similarly, 2-undecanone in PRF and 2,3-butanedione in CSCF that distinguish between the P and PC12 diets were considered as exhibiting a “long” persistence. Most of the pasture tracers which were commonly identified in PRF and CSCF exhibited the same persistence degree in the two tissues suggesting that the mechanisms responsible for the decrement of these compounds are common to PRF and CSCF. Finally, the results presented on Table 2 also confirm the different content in pasture diet tracers of both tissues which was previously evidenced by Sivadier et al. (2008).

All tracers that were alkenes or terpenes exhibited the same persistence, suggesting similar clearance mechanisms within the same chemical family. Considering the terpenes, the prompt variations in amounts of these compounds in response to a pasture-concentrate switch is consistent with previous work on ground beef (Larick et al., 1987). In contrast, other compounds exhibited different persistence within a given chemical family, suggesting that chemical family is not, in most cases, the only factor explaining the persistence of these tracers. The between-diet variation exhibited for linear n-alkanes suggest that the chain length of the compounds could be one of the other factors to consider. A systematic short persistence was found for tetra-, penta- and hexadecane in agreement with the result found by Larick et al. (1987) for hexa-, hepta- and octadecane. In contrast, a systematic higher amount in the 4 kg fattening (PC4) has been pointed out for decane, undecane, dodecane and tridecane. These C10-C13 linear alkanes may be suitable for segregating the four feeding situations together with pasture-diet tracers with short, medium and long persistence.

3.3. Differentiation of four lamb diets varying in concentrate finishing duration

To determine the relevance of analysing the volatile fraction of the two adipose tissues to distinguish between the four types of diet, the most discriminative tracers listed in Table 2 were selected by a leave-one-out procedure ($p < 0.05$). A PCA was performed on the resulting compounds selected in PRF ($n = 25$) and CSCF ($n = 10$) tissues, respectively. Whatever the tissue, the first maps (Figure 2) show a clear segregation between the pasture and the three other diets. The Newman-Keuls mean comparison test performed on the coordinates of the observations on the first principal component confirmed that only the

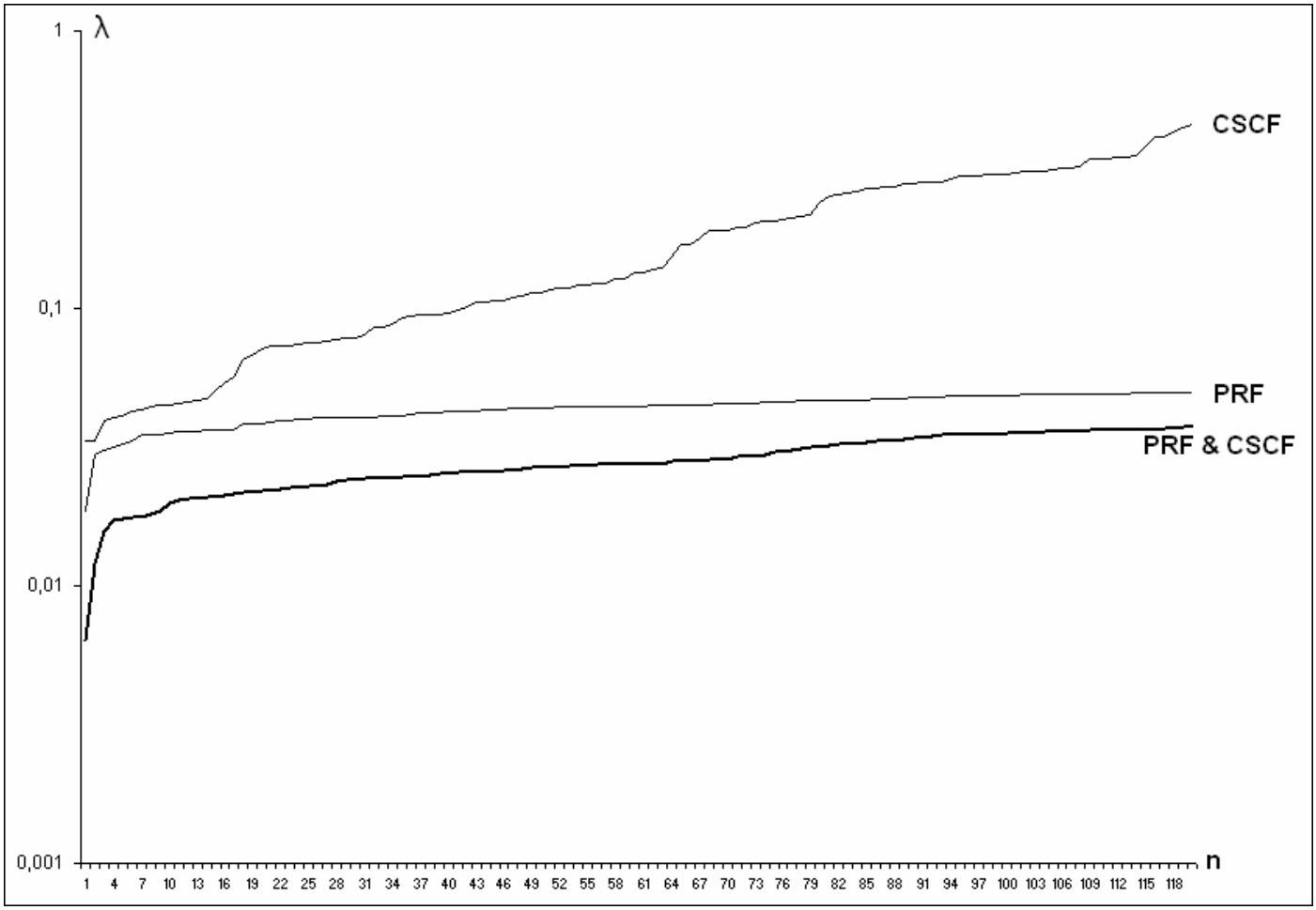

Figure 3. Comparison of the quality of the diet differentiation by parallel analysis of the adipose tissues. Diagram of Wilk's λ values (**λ**) calculated for each triplet (*n* = 120) composed by diet tracers from one or the two adipose tissues (PRF = peri-renal fat, and CSCF = sub-cutaneous caudal fat), after a discriminant analysis (DA).

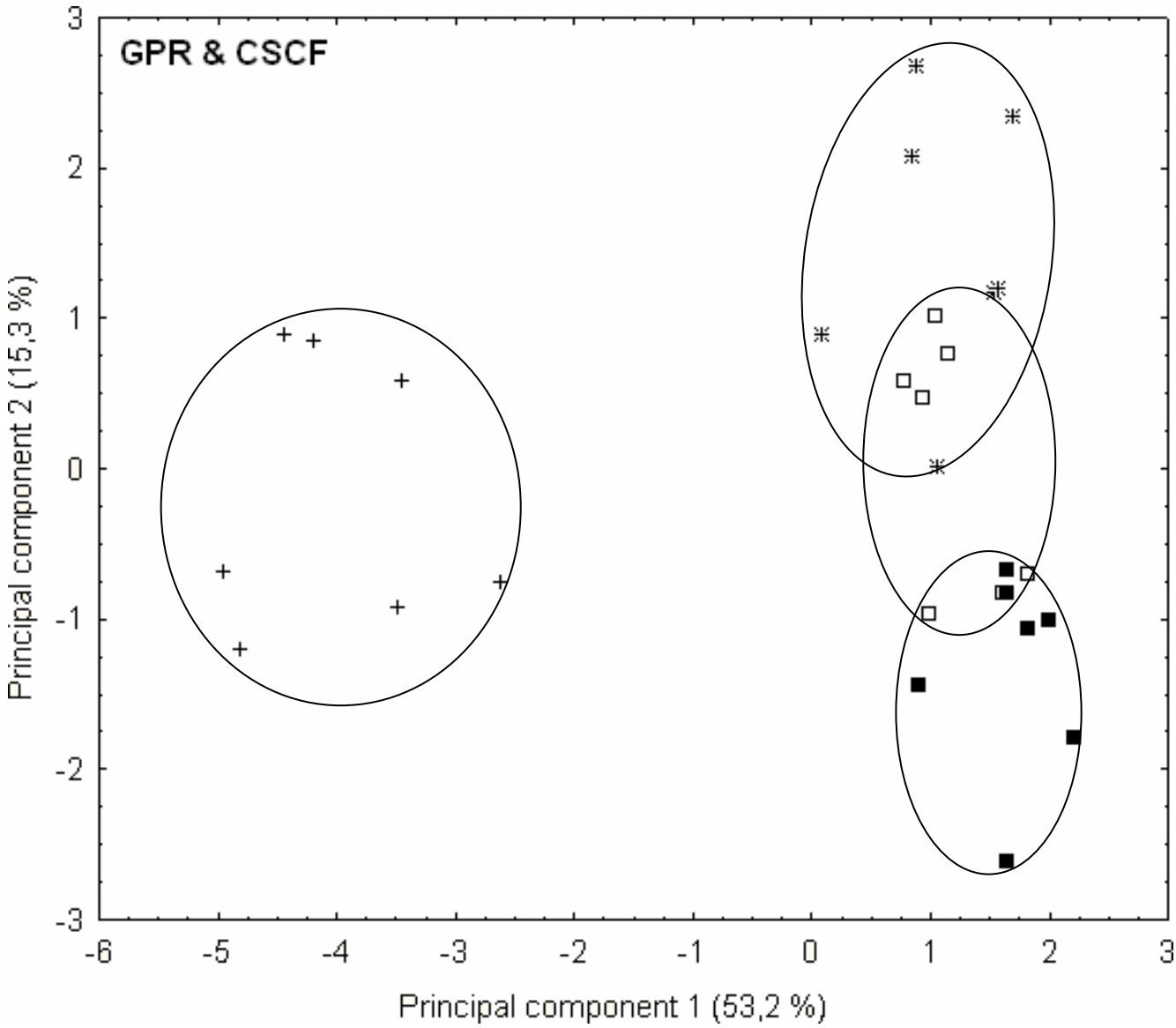

Figure 4. Differentiation of pasture-fed lambs fattened for various weight gain with concentrate based on GC-MS analysis of their adipose tissues: exclusive pasture (+ / cross) and alternating pasture and fattening for 4 kg (∗ / star), 8 kg (□ / open square), or 12 kg (■ / solid square) with concentrate.

First map of normed PCA carried out from 11 selected ratios. To illustrate the differences in diets, the projection of lambs were clustered into ellipses.

exclusive pasture diet was significantly differentiated from the three other concentrate-finishing diets in the two adipose tissues (data not shown). This may be explained in part by the fact that most of the tracers involved in the PCA had a “short” persistence.

To assess the usefulness of the combined analysis of PRF and CSCF, the tracers from the two tissues were pooled together in the same dataset (n = 35), and a PCA was run on these data (Figure 2). The Newman-Keuls mean comparison test on the coordinates of the observations on the first principal component revealed a clear segregation of P, PC4, and the two other diets (data not shown). This improvement of the segregation compared with single tissue data confirms previous report showing that the parallel treatment of the data from different adipose tissues improves diet authentication (Sivadier et al., 2008).

The complementarity of PRF and CSCF tissues for differentiating the four diets was assessed by carrying out a discriminant analysis (DA) on tracers from one, and the two, adipose tissues. The tracers (n = 35) were combined into all possible triplets, and their Wilk’s λ values, which indicate the quality of the distinction between the four diets, were calculated. The 120 most discriminative combinations (i.e. showing the lowest Wilk’s λ values) formed by triplets involving tracers from PRF, CSCF and the two adipose tissues were considered. Figure 3 shows that CSCF exhibits tracers which were less discriminant than PRF, and that the combination of the two datasets resulted in an improvement in the animal diet discrimination. However, this improvement was not sufficient to distinguish between PC8 and PC12 even in the most highly discriminant models (data not shown).

To maximize the discrimination, the abundances of the 35 discriminative compounds from the two adipose tissues were built up into ratios according to Engel et al. (2007). All possible ratios (n = 1225) were then filtered by ANOVA ($p < 0.05$) followed by leave-one-out cross validation procedure. 271 discriminant ratios were finally selected. Among the ratios involving the same compound from the same tissue (numerator or denominator), the ratio that exhibited the best Fisher F was selected. A PCA (Figure 4) was carried out on the dataset formed by the 11 selected ratios. The first plane of the PCA revealed a strong segregation of the pasture diet and the three other diets displayed by the first principal component, while the second one segregated the three diets. Newman-Keuls test performed on the coordinates of the observations on both axes of the PCA confirmed that by considering the first and second principal components of the PCA, the four diets were significantly differentiated.

4. CONCLUSIONS

In the present study, DH-GC-MS technique and instrumental drift correction were used to extract the relevant information contained in the volatile fraction of the perirenal fat (PRF) and the caudal sub-cutaneous fat (CSCF) of lambs fed four different diets. The compounds distinguishing between the diets exhibited all the possible degrees of persistence, with most

tracers exhibiting a “short” persistence. Only the combined treatment of the diet tracers from the two adipose tissues allowed efficient segregation of the four types of diet. To authenticate the feeding history of grazing ruminants, it is essential to determine the persistence of pasture diet tracers in their tissues, but it is also important to assess the latency rates of these tracers. This will be the subject of a further study.

LITTERATURE CITED

1. Arvanitoyannis, I. S., & Van Houwelingen-Koukaliaroglou, M. (2003). Implementation of chemometrics for quality control and authentication of meat and meat products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(2), 173-218.
2. Aurousseau, B., Bauchart, D., Faure, X., Galot, A. L., Prache, S., Micol, D., & Priolo, A. (2007). Indoor fattening of lambs raised on pasture: (1) Influence of stall finishing duration on lipid classes and fatty acids in the longissimus thoracis muscle. Meat Science, 76, 241-252.
3. Aurousseau, B., Bauchart, D., Galot, A. L., Prache, S., Micol, D., & Priolo, A. (2007). Indoor fattening of lambs raised on pasture: (2) Influence of stall finishing duration on triglyceride and phospholipid fatty acids in the longissimus thoracis muscle. Meat Science, 76, 417-427.
4. Binnie, J., Cape, J. N., Mackie, N., & Leith, I.D. (2002). Exchange of organic solvents between the atmosphere and grass - the use of open top chambers. The Science of the Total Environment, 285, 53-67.
5. Body, D. R. (1977). Characterization of Bovine Rumen Liquor Isoprenoid Hydrocarbons with Reference to Dietary Phytol. Lipids, 12, 204-207.
6. Brown, H. G., Melton, S. L., Riemann, M. J., & Backus, W. R. (1979). Effects of energy intake and feed source on chemical changes and flavor of ground beef during frozen storage. Journal of Animal Science, 48, 338-347.
7. Deport, C., Ratel, J., Berdague, J. L., & Engel, E. (2006). Comprehensive combinatory standard correction: A calibration method for handling instrumental drifts if gas chromatography - mass spectrometry systems. Journal of Chromatography A, 1116(2), 248-258.
8. Elmore, J. S., Warren, H. E., Mottram, D. S., Scollan, N. D., Enser, M., Richardson, R. I., & Wood, J. D. (2004). A comparison of the aroma volatiles and fatty acids compositions of grilled beef muscle from Aberdeen Angus and Holstein-Fresian steers fed diets based on silage or concentrates. Meat Science, 68(1), 27-33.
9. Engel, E., Ferlay, A., Cornu, A., Chilliard, Y., Agabriel, C., Bielicki, G., & Martin, B. (2007). Relevance of Isotopic and Molecular Biomarkers for the Authentication of Milk According to Production Zone and Type of Feeding of the Cow. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 9099-9108.

10. Engel, E., & Ratel, J. (2007). Correction of the data generated by mass spectrometry analyses of biological tissues: Application to food authentication. Journal of Chromatography A, 1154, 331-341.
11. Kondjoyan, N., & Berdague, J. L. (1996). A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds. Clermont-Ferrand, France: Laboratoire Flaveur.
12. Larick, D. K., Hedrick, H. B., Bailey, M. E., Williams, J. E., Hancock, D. L., Garner, G. B., & Morrow ,R. E. (1987). Flavor constituents of beef as influenced by forage - and grain - feeding. Journal of Food Science, 52(2), 245-251.
13. Larick, D. K., & Turner, B. E. (1990). Headspace volatiles and sensory characteristics of ground beef from forage- and grain-fed heifers. Journal of Food Science, 54(3), 649-654.
14. Maruri, J. L., & Larick, D. K. (1992). Volatile concentration and flavor of beef as influenced by diet. Journal of Food Science, 57(6), 1275-1281.
15. Noziere, P., Grolier, P., Durand, D., Ferlay, A., Pradel, P., & Martin, B. (2006). Variations in Carotenoids, Fat-Soluble Micronutrients, and Color in Cows' Plasma and Milk Following Changes in Forage and Feeding Level. Journal of Dairy Science, 89, 2634-2648.
16. Priolo, A., Cornu, A., Prache, S., Krogmann, M., Kondjoyan, N., Micol, D., & Berdague, J. L. (2004). Fat volatile tracers of grass feeding in sheep. Meat Science, 66, 475-481.
17. Rios, J. J., Fernandez-Garcia, E., Minguez-Mosquera, M. I, & Oerez-Galvez, A. (2008). Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. Food Chemistry, 106, 1145-1153.
18. Sebastian, I., Viallon-Fernandez, C., Berge, P., & Berdague, J. L. (2003). Analysis of the volatile fraction of lamb fat tissue: influence of the type of feeding. Sciences des aliments, 23, 497-511.
19. Sivadier, G., Ratel, J., Bouvier, F., & Engel, E. (2008). Authentication of meat products: Determination of animal feeding by parallel GC-MS analysis of three adipose tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, DOI: 10.1021/jf801276b.
20. Vasta, V., & Priolo, A. (2006). Ruminant fat volatiles as affected by diet. A review. Meat Science, 73(2), 218-228.
21. Vasta, V., Ratel, J., & Engel, E. (2007). Mass Spectrometry Analysis of Volatile Compounds in Raw Meat for the Authentication of the Feeding Background of Farm Animals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(12), 4630-4639.
22. Vezinhet, A., Prud'hon, M., & Benevent, M. (1974). Evolution des différents types de dépôts adipeux après la naissance chez des agneaux Mérinos d'Arles normaux ou hypophysectomisés. Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique, 14, 117-129.
23. Watanabe, K., & Sato, Y. (1971). Gas chromatographic and mass spectral analysis of heated flavour compounds of beef fats. Agricultural and Biological Chemistry, 35(5), 756-763.

24. Young, O. A., Berdague, J. L., Viallon, C., Rousset-Akrim, S., & Theriez, M. (1997). Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. Meat Science, 45(2), 183-200.

2. Complément de discussion sur l'étude de la persistance des traceurs volatils de l'alimentation au pâturage

Soixante-dix composés identifiés précédemment comme discriminants des alimentations contrastées ne permettent pas de différencier les régimes alternés. Cela peut signifier que ces traceurs sont trop spécifiques des dispositifs expérimentaux qui ont permis leur mise en évidence. Cela peut signifier également qu'il s'agit de composés qui sont très persistants et que les degrés de finition expérimentés ici ne suffisent pas à modifier significativement leurs teneurs dans les tissus adipeux. Cette dernière explication semble plus particulièrement plausible pour les neuf composés qui ont été communément identifiés comme traceurs d'une alimentation à l'herbe par la plupart des études antérieures.

Cette deuxième étude met en évidence l'intérêt des ratios de traceurs pour amplifier les contrastes entre situations d'alimentation. En divisant les aires respectives de deux composés traceurs, cette procédure permet d'éliminer, en partie, l'effet des dérives instrumentales, tout en compressant l'information de deux variables discriminantes en une seule. D'autre part, comme cela a déjà été montré pour l'authentification de l'alimentation de vaches laitières par des ratios d'acides gras de lait (Engel *et al.*, 2007), la plupart des traceurs impliqués dans les ratios les plus discriminants ont eux-mêmes un pouvoir discriminant élevé ce qui semble indiquer que les variables retenues dans les « meilleurs » ratios comptent parmi les traceurs les plus pertinents.
Néanmoins, les ratios restent difficilement interprétables, et il est nécessaire, pour en expliquer les variations, de pouvoir revenir à des valeurs quantifiées du numérateur et du dénominateur. La stabilisation de l'abondance des traceurs par la méthode CCSC constitue donc un pré-requis indispensable à ce travail d'interprétation.

Chapitre **IV** : Latence d'apparition de traceurs de l'alimentation au pâturage dans les tissus adipeux d'agneaux nourris aux concentrés et finis à l'herbe

<u>Chapitre IV :</u> Latence d'apparition de traceurs de l'alimentation au pâturage dans les tissus adipeux d'agneaux nourris aux concentrés et finis à l'herbe

L'élaboration d'un modèle d'authentification robuste de l'alimentation des ruminants implique que soient pris en comptent les différents types de régimes susceptibles d'être intégrés aux pratiques d'élevage des animaux soient pris en compte. Dans les deux parties précédentes, nous nous sommes intéressés aux deux principaux scénarios d'alimentation rencontrés dans les élevages d'agneaux : une alimentation exclusive, qu'il s'agisse de pâturage ou de concentrés, ou une alimentation au pâturage avec finition aux concentrés. Néanmoins, certains éleveurs peuvent avoir recours à un autre type de régime alterné. La première étape de l'élevage se déroule à l'étable, et consiste à nourrir les animaux exclusivement aux concentrés. Dans un deuxième temps, les animaux sont placés au pâturage jusqu'à leur abattage. La durée de chacune des deux périodes d'alimentation varie en fonction du but recherché : dans la majorité des cas, ce régime alterné est utilisé par les éleveurs dont les produits animaux font l'objet de labels de qualité (par exemple « label rouge »). La durée relative de la période d'alimentation à l'herbe est alors élevée. D'autres pratiques peuvent consister à limiter l'étape de finition à l'herbe à une courte période précédant l'abattage des animaux. Ce type de démarche peut être employé dans le but de produire frauduleusement des animaux sous couvert d'un label de qualité.

L'objectif de cette troisième étape est de montrer la faisabilité de l'authentification de l'alimentation d'agneaux nourris aux concentrés puis finis au pâturage suivant des périodes variant de 0 à 83 jours. Dans cette optique, la latence (*i.e.* temps d'apparition) des traceurs volatils d'une alimentation au pâturage a été suivie dans les tissus adipeux périrénal et sous-cutané caudal. Les agneaux sont élevés à l'étable et nourris exclusivement aux concentrés, puis finis au pâturage suivant quatre périodes différentes.

1. Publication n°3

Tableau 13. Latences et Persistances des traceurs volatils de l'alimentation au pâturage, quantifiés dans deux tissus d'agneaux, et permettant de discriminer des alimentations alternées comportant différents degrés de finition au pâturage ou aux concentrés.

Composés	*Gras Périrénal*		*Gras Sous-Cutané Caudal*	
	Latence [a]	Persistance [b]	Latence	Persistance
(Z)-4-Hepténal	faible	faible	indéterminé	moyenne
Cyclododécane, 1-éthyl-2-méthyl-	élevée	faible	élevée	faible
1-Pentadécène	moyenne	faible	élevée	faible
Toluène	faible	faible	faible	faible
Sulfone, diméthyl-	moyenne	faible	faible	faible
Dodécane	moyenne	persistant		
1-Pentèn-3-ol	élevée	faible		moyenne
(E,E)-3,5-Octadièn-2-one	très élevée	faible		
2,3-Octanedione	élevée	faible	élevée	
p-Cyméne			faible	faible
α-Pinène			élevée	faible

« Persistance » et « Latence » désignent respectivement la vitesse de disparition et d'apparition, dans les tissus adipeux, de l'abondance d'un marqueur de l'alimentation en réponse au changement de régime de l'animal.

2. Complément de discussion sur l'étude de la latence des traceurs volatils de l'alimentation au pâturage

Cette troisième partie montre la faisabilité de la différenciation d'agneaux nourris aux concentrés et finis à l'herbe suivant des périodes plus ou moins longues.

Les publications 2 et 3 ont permis de caractériser respectivement les vitesses de disparition (persistance) et d'apparition (latence) de ces traceurs dans les tissus adipeux. Certains composés volatils ont été identifiés comme discriminant simultanément les différents degrés de finition au pâturage et aux concentrés, ce qui permet de comparer leurs latences et leurs persistances. Comme le montre le tableau 13, aucune relation systématique ne ressort de cette comparaison. En particulier, les propriétés de latence et de persistance d'un même composé sont loin d'être symétriques. Ainsi, on notera que si les vitesses d'apparition des traceurs sont variables, les vitesses de disparition sont généralement rapides. Les mécanismes biochimiques qui régissent les latences et les persistances des traceurs volatils de l'alimentation étant encore inconnus, leur détermination empirique s'impose.

Conclusions & Perspectives

Tableau 14. Liste des composés volatils communément identifiés comme traceurs de l'alimentation au pâturage dans les trois expérimentations.

Composés	Réfs [a]
1-Pentèn-3-ol	
Butanal	
Cyclododecane, 1-éthyl-2-méthyl-	
1-Pentadècene	
Heptane, 1-chloro-	
Pyridine	
α-Pinène	
(E)-2-Penténal	[4]
Toluène	[4]
(Z)-4-Octène	[4]
(E)-4-Octène	[4]
Benzene, 1,3,5-triméthyl-	[4]
(E,E)-3,5-Octadien-2-one	[4]
(E)-2-Octène	[1] ; [4]
(Z)-4-Heptènal	[2] ; [4]
2,3-octanedione	[2] ; [3] ; [4]
Sulfone, diméthyl-	[3] ; [4]
p-Cymène	[3] ; [4]
trans-Cadina-1(6),4-diène	[3]

[a] Références bibliographiques [1] = Maruri & Larick, 1992 ; [2] = Sebastian *et al.*, 2003 ; [3] = Vasta & Priolo, 2006 ; [4] = Engel & Ratel, 2007.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces travaux de recherche démontrent la possibilité d'authentifier l'alimentation des ruminants par l'analyse de la composition en molécules volatiles des tissus adipeux, et notamment la faisabilité de reconstituer les grands traits de l'historique alimentaire de l'animal. Nous avons en particulier démontré l'intérêt d'utiliser l'information provenant de plusieurs tissus pour discriminer les régimes alimentaires des agneaux.

Au terme de ces trois expérimentations, 19 composés ont été systématiquement identifiés comme traceurs de l'alimentation au pâturage (tableau 14). On peut par conséquent considérer que ces traceurs sont à la fois robustes et génériques. La moitié d'entre eux sont intégrés dans les ratios permettant de différencier les alimentations alternées, ce qui leur confère un intérêt particulier pour l'authentification de ce type de régime.

Nous avons également démontré que l'association dans un même modèle, des composés discriminants provenant de plusieurs tissus adipeux, permettait d'améliorer significativement la différenciation entre les régimes étudiés. Néanmoins, comme il a été démontré lors de la première expérimentation, cette amélioration n'est pas systématique et indique que le choix des tissus analysés est déterminant et doit être validé expérimentalement.

Les recherches que nous menons reposent sur une extraction la plus fidèle et la plus exhaustive possible de l'information dont sont porteurs les signaux obtenus en CPG-SM. Or l'analyse des signaux telle qu'elle est présentée dans ce travail est réalisée manuellement ce qui limite la quantité et la qualité de l'information obtenue. D'autre part, une exploitation approfondie du signal, comme il a été fait au cours de ces travaux, nécessite un investissement extrêmement lourd en terme de temps / homme. A titre illustratif, la recherche d'une sélection de 150 composés préalablement identifiés dans un échantillon de tissu adipeux nécessite trois à quatre jours. Le développement de méthodes de traitement du signal permettant une exploitation automatique, c'est-à-dire rapide et systématique des signaux CPG-SM, constitue donc un verrou à lever en priorité, pour une extraction d'information sans *a priori* et une recherche de nouveaux traceurs. Dans cette optique, les bases de données « expert » constituées au cours de cette thèse pourront permettre d'évaluer les performances des méthodes de traitement automatique. Des recherches sont actuellement menées dans ce sens au laboratoire.

Un autre facteur limite l'extraction de l'information utile des signaux obtenus en CGP-SM. Il s'agit des coélutions entre composés insuffisamment séparés qui ont pour conséquence de masquer les composés minoritaires. Dans la mesure où les traceurs pertinents ne sont pas forcément les plus abondants, la déconvolution de ces coélutions est une perspective

prioritaire. Outre les procédures de dépouillement automatisées évoquées dans le paragraphe précédent, les progrès de la chimie analytique dans le domaine de la CPGxCPG-SM (chromatographie bidimensionnelle) offrent une solution pour démasquer une grande partie de la fraction volatile jusque là coéluée dans les chromatogrammes monodimensionnels. Une étude récente menée au laboratoire montre que le gain d'information est au minimum d'un facteur 10. En contrepartie pour pouvoir exploiter toute la richesse de cette information supplémentaire et en extraire l'information pertinente, il va falloir développer de nouveaux outils. Il s'agit, là encore, d'un volet des recherches en cours au laboratoire.

Ce travail a été focalisé sur les tissus adipeux parce qu'ils représentaient une grande quantité d'information, du fait de leur richesse naturelle en composés volatils généralement liposolubles. Nous avons également mis en évidence la complémentarité de l'information contenue dans plusieurs tissus adipeux et l'intérêt de l'exploiter à des fins d'authentification. Il semble probable que d'autres tissus ou organes pourraient contenir de l'information pertinente supplémentaire. L'étude de la fraction volatile du foie pourrait notamment s'avérer intéressante, ce dernier étant le siège d'une activité métabolique intense et primordiale pour la digestion. De même, la moelle osseuse est une matrice lipidique qui est formée dés les premiers moments de la vie de l'animal, et donc susceptible de permettre d'accéder à de l'information "ancienne" sur son historique alimentaire. Enfin des recherches doivent être menées afin d'adapter les méthodes d'authentification pour que leurs domaines d'application soient étendus aux produits carnés vendus, et en particulier à la viande. Une première étude menée au laboratoire a montré la faisabilité de l'authentification de l'alimentation des ruminants par l'analyse de la fraction volatile d'un tissu musculaire (*i.e. semi-membranous* - Vasta *et al.*, 2007). À terme, il faudra intégrer les biais que peuvent présenter les modifications de composition liées à la maturation du muscle en viande. Ces recherches font l'objet d'un projet transversal nommé « AUTMAT », qui implique quatre équipes de l'unité QuaPA.

Une des finalités de ces travaux concerne le développement d'une méthode analytique de référence utilisable à des fins réglementaires. Pour atteindre cet objectif, il faudra valider la robustesse des traceurs volatils qui ont été identifiés. Pour cela, deux stratégies peuvent être envisagées. La première, empirique, consiste à tester notre sélection de traceurs sur des échantillons issus des filières afin de "tamiser" les composés réellement robustes. Cette stratégie implique de disposer d'un large éventail d'échantillons à tester, et de connaître précisément l'historique alimentaire réel des animaux. Elle ne peut donc être envisagée que dans le cadre de dispositifs d'élevages expérimentaux ou commerciaux suffisamment étendus pour représenter la diversité des situations d'élevage en conditions réelles. Des programmes de recherche européens pourraient se révéler appropriés à ce genre d'étude.

L'autre stratégie, plus mécanistique, consisterait à confirmer le lien existant entre alimentation au pâturage et présence du traceur, en identifiant les voies métaboliques qui en sont à l'origine. Dans cette optique, l'identité des traceurs volatils du pâturage, directement transférés dans les tissus animaux, pourrait être validée par l'ingestion de plantes marquées aspécifiquement au ^{13}C, obtenues par culture réalisée en serre sous atmosphère enrichie en $^{13}CO_2$. De même, l'analyse des traceurs dans les tissus d'animaux ayant ingéré leurs précurseurs supposés, préalablement marqués radioactivement, permettrait de confirmer leurs voies métaboliques, et par là même leur statut de traceurs de l'alimentation. Une approche pragmatique pourrait consister à mener de front ces deux approches.

A terme, ces recherches sur les ovins devraient permettre de développer des systèmes « diagnostic » utilisables chez d'autres espècesd e ruminants et notamment chez le bovin. Il s'agira pour cela de vérifier la généricité de traceurs mis en évidence chez les ovins et de prendre en compte les spécificités de leurs modes d'élevage.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABIMBOLA A.F., KEHINDE-PHILLIPS O.O., OLATUNJI A.S. "The Sagamu cement factory, SW Nigeria: Is the dust generated a potential health hazard?" Environmental Geochemistry and Health : 29(2), 163-167 (2007)

AFSSA. "ANC. Apports Nutritionnels Conseillés pour la population française." AFSSA (Ed), Tec et Doc, Paris, France. (2001)

AFSSA. "Risques et bénéfices pour la santé des AG trans apportés par les aliments. Recommandations." http://www.afssa.fr. (2005)

AGABRIEL C., COULON J.B., BRUNSCHWIG G., SIBRA C., NAFIDI C. "Relations entre la qualité du lait livré et les caractéristiques des exploitations." INRA Production Animale : 8 (4), 251-258 (1995)

AGABRIEL C., COULON J.B., JOURNAL C., DE RANCOURT B. "Composition chimique du lait et systèmes de production dans les exploitations du Massif central." INRA Production Animale : 14 (2), 119-128 (2001)

AUROUSSEAU B., BAUCHART D., CALICHON E., MICOL D., PRIOLO A. "Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the M. *longissimus thoracis* of lambs." Meat Science : 66, 531-541 (2004)

AUROUSSEAU B., BAUCHART D., FAURE X., GALOT A.L., PRACHE S., MICOL D., PRIOLO A. "Indoor fattening of lambs raised on pasture: (1) Influence of stall finishing duration on lipid classes and fatty acids in the *longissimus thoracis* muscle." Meat Science : 76, 241-252 (2007)

AUROUSSEAU B., BAUCHART D., GALOT A.L., PRACHE S., MICOL D., PRIOLO A. "Indoor fattening of lambs raised on pasture: 2. Influence of stall finishing duration on triglyceride and phospholipid fatty acids in the longissimus thoracis muscle" Meat Science : 76, 417-427 (2007)

BALL M.J., BARTLETT M.A. "Dietary intake and iron status of Australian vegetarian women." American Journal of Clinical Nutrition : 70, 353-358 (1999)

BESLE J.M., LAMAISON J.L., DUJOL B., PRADEL P., FRAISSE D., VIALA D., MARTIN B. "Flavonoids and other phenolics in milk as a putative tool for traceability of dairy production systems." In *Indicators of milk and beef quality*, Hocquette J.F., Gigli S. (Eds), Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, EAAP Publication, 112, 345-350 (2005).

BIESALSKI H.-K. "Meat as a component of a healthy diet - are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?" Meat Science : 70 (3), 509-524 (2005)

B.N.F. "Meat in the Diet." London: British Nutrition Foundation (1999)

BOLEMAN S.J., BOLEMAN S.L., MILLER R.K., TAYLOR J.F., CROSS H.R., WHEELER T.L., KOOHMARAIE M., SHACKELFORD S.D., MILLER M.F., WEST R.L., JOHNSON D.D., SAVELL J.W. "Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness." Journal of Animal Science : 75, 1521-1524 (1997)

BORIES G., TULLIEZ J., WAL J.M. “Transfer of contaminants, substances used in animal husbandry and additives along the food chain to the consumer.” Medecine et Nutrition : 15(2), 123-129 (1979)

British Nutrition Foundation. "Meat in the Diet". London: British Nutrition Foundation (1999)

BRO-RASMUSSEN F. “Contamination by persistent chemicals in food chain and human health.” The Science of the Total Environment 188(S1) : S45-S60 (1996)

BROOM D.M. “Animal welfare: concepts and measurement.” Journal of Animal Science : 69, 4167-4175 (1991)

BUCHOLSKI K.A., BEGEROW J., WINNEKE G., DUNEMANN L. “Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in human body fluids and tissues.” Journal of Chromatography A 754, 479-485 (1996)

CALDERÓN F., CHAUVEAU-DURIOT B., PRADEL P., MARTIN B., GRAULET B., DOREAU M. , NOZIERE P. “Variations in Carotenoids, Vitamins A and E, and Color in Cow’s Plasma and Milk Following a Shift from Hay Diet to Diets Containing Increasing Levels of Carotenoids and Vitamin E.” Journal of Dairy Science 90, 5651-5664 (2007)

CALKINS C.R., HODGEN J.M. “A fresh look at meat flavor.” Meat Science : 77, 63-80 (2007)

CANAC-ARTEAGA D., VIALLON C., BERDAGUE J.-L. "Effect of a dry purge step on the analysis by dynamic headspace - GC-MS of the volatile fraction of a cheese." Analusis : 27, 780-785 (1999)

CARPENTER C.E., CORNFORTH D.P., WHITTIER D. “Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction.” Meat Science : 57, 359-363 (2001)

CHILLIARD Y., DOREAU M., GAGLIOSTRO G., ELMEDDAH Y. “Addition de lipides protégés (encapsulés ou savons de calcium) à la ration de vaches laitières. Effets sur les performances et la composition du lait.” INRA Production Animale : 6, 139-150 (1993).

CHILLIARD Y., FERLAY A., DOREAU M., “Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids.” Livestock Production Science : 70, 31-48 (2001)

CHILLIARD Y., BAUCHART D., LESSIRE M., SCHMIDELY P., MOUROT J. “Qualité des produits : modulation par l’alimentation des animaux de la composition en acides gras du lait et de la viande.” INRA Production Animale : 21, 95-106 (2008)

COLLAKOVA E., DELLAPENNA D. "Homogentisate Phytyltransferase Activity is Limiting for Tocopherol Biosynthesis in Arabidopsis." Plant Physiology : 131, 632-642 (2003)

CONTARINI G., POVOLO M. "Volatile Fraction of Milk: Comparison between Purge and Trap and Solid Phase Microextraction Techniques." Journal Of Agricultural and Food Chemistry : 50, 7350-7355 (2002)

CORNU A., CARNAT A.P., MARTIN B., COULON J.-B., LAMAISON J.-L., BERDAGUE J.-L. "Solid-Phase Microextraction of Volatile Components from Natural Grassland Plants." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 49, 203-209 (2001)

COSTERA A., FEIDT C., MARCHAND P., Le BIZEC B., RYCHEN G. "PCDD/F and PCB transfer to milk in goats exposed to a long-term intake of contaminated hay." Chemosphere : 64, 650-657 (2006)

COULON J.B., PRIOLO A. "Influence of forage feeding on the composition and organolpetic properties of meat and dairy products : bases for a « terroir » effect." In *Multi-fonction grasslands : quality forages, animal products and landscapes*, DURAND J.L., EMILE J.C., HUYGHE C., LEMAIRE G. (Ed.), British Grassland Society : 513-524 (2002)

COULON J.B., DELACROIX-BUCHET A., MARTIN B., PIRISI A. "Facteurs de production et qualité sensorielle des fromages." INRA Production Animale : 18 (1), 49-62 (2005)

COVARRUBIAS-CERVANTES M., MOKBEL I., CHAMPION D., JOSE J., VOILLEY A. "Saturated vapour pressure of aroma compounds at various temperatures." Food Chemistry : 85, 221-229 (2004)

CRUPKIN M., ZAMBELLI A. "Detrimental Impact of Trans Fats on Human Health: Stearic Acid-Rich Fats as Possible Substitutes." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 7, 271-279 (2008)

DALY C.C., YOUNG O.A., GRAAFHUIS A.E., MOORHEAD S.M., EASTON H.S. "Some effects of diet on beef meat and fat attributes." New Zealand Journal of Agricultural Research : 42, 279-287 (1999)

DARNERUD P.O., ATUMA S., AUNE M., BJERSELIUS R., GLYNN A., PETERSSON GRAWE K. , BECKER W. “Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market basket data.” Food and Chemical Toxicology : 44(9), 1597-1606 (2006)

DARNTON-HILL I., NISHIDA C., JAMES W.P. "A life course approach to diet, nutrition and the prevention of chronic diseases." Public Health Nutrition : 7, 101-121 (2004)

DE LA TORRE A., DEBITON E., JUANEDA P., DURAND D., CHARDIGNY J. M., BARTHOMEUF C., *et al.* “Beef conjugated linoleic acid isomers reduce human cancer cell growth even associated with other beef fatty acids.” British Journal of Nutrition : 95, 346-352 (2006)

DECKER E.A., LIVISAY S.A., ZHOU S. “Mechanisms of endogenous skeletal muscle antioxidants: Chemical and physical aspects.” In: Eric Decker, Cameron Faustman and Clemente J. López-Bote, Editors, Antioxidants in muscle foods, John Wiley & Sons Inc., pp. 25–60 (2000)

DELACROIX-BUCHET A., LEFIER D., NUYTS-PETIT V. "Polymorphisme de la caséine κ de trois races bovines françaises et aptitude à la coagulation." Lait : 73, 61-72 (1993)

DESCALZO A.M., INSANI E.M., BIOLATTO A., SANCHO A.M., GARCÍA P.T., PENSEL N.A. *et al.* “Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef.” Meat Science : 70, 35-44 (2005).

DESCALZO A.M., SANCHO A.M. “A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina” Meat Science : 79, 423-436 (2008).

DEPORT C., RATEL J., BERDAGUE J.L., ENGEL E. “Comprehensive combinatory standard correction: A calibration method for handling instrumental drifts if gas

chromatography - mass spectrometry systems." Journal of Chromatography A : 1116(2), 248-258 (2006)

DIAN P.H.M., CHAUVEAU-DURIOT B., PRADO I.N., PRACHE S. "A dose-response study relating the concentration of carotenoid pigments in blood and reflectance spectrum characteristics of fat to carotenoid intake level in sheep." Journal of Animal Science : 85, 3054-3061 (2007)

DOREA J.G. "Fish Meal in Animal Feed and Human Exposure to Persistent Bioaccumulative and Toxic Substances." International Association for Food Protection : 69 (11), 2777-2785 (2006)

DUCOULOMBIER-CREPINEAU C., FEIDT C., RYCHEN G. "Platinum and Palladium transfer to milk, organs and tissues after a single oral administration to lactating goats." Chemosphere : 68, 712–715 (2007)

DUMONT J.P., ADDA J. "Occurrence of sesquiterpenes in mountain cheeses volatiles." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 26, 364-367 (1978)

DUNCAN I., FRASER D. "Understanding animal welfare." In *Animal Welfare*. CAB Int. London (1997)

DUJOURDY L, BESACIER F. "Headspace profiling of cocaine samples for intelligence purposes." Forensic Science International : 179 (2-3), 111-122 (2008)

EEC. "European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife." European Economic Community; http://europa.eu.int/comm/environment/endocrine/documents/reports_conclusions_en.htm. (1996)

ELMORE J.S., MOTTRAM D.S., ENSER M., WOOD J.D. "The effects of diet and breed on the volatile compounds of cooked lamb." Meat Science : 55, 149-159 (2000)

ELMORE, J. S., CAMPO, M. M., ENSER, M., & MOTTRAM, D. S. "Effect of lipid composition on meat-like model systems containing cysteine, ribose and polyunsaturated fatty acids." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 50, 1126–1132 (2002)

ELMORE J.S., WARREN H.E., MOTTRAM D.S., SCOLLAN N.D., ENSER M., RICHARDSON R.I., WOOD J.D. "A comparison of the aroma volatiles and fatty acid compositions of grilled beef muscle from Aberdeen Angus and Holstein-Friesian steers fed diets based on silage or concentrates." Meat Science :68 (1), 27-33 (2004)

ENGEL E., RATEL. J. "Correction of the data generated by mass spectrometry analyses of biological tissues: Application to food authentication." Journal of Chromatography A : 1154, 331–341 (2007)

ENGEL E., FERLAY A., CORNU A., CHILLIARD Y., AGABRIEL C., BIELICKI G., MARTIN B. "Relevance of Isotopic and Molecular Biomarkers for the Authentication of Milk According to Production Zone and Type of Feeding of the Cow." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 55, 9099-9108 (2007)

ENSER M. *et al.* "Effect of production systems on the fatty acids and flavour of lamb from six European countries." 46th International Congress of Meat Science and Technology, Buenos Aires (2000)

ETIÉVANT P.X. "Artifacts and contaminants in the analysis of food flavor." Critical Reviews in Food Science and Nutrition : 36, 733-745 (1996)

FAO. “Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003.” Etude FAO *Alimentation et Nutrition* 81. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Rome (2004)

FERGUSON D.M., BRUCE H.L., THOMPSON J.-M., EGAN A.F., PERRY D., SHORTHOSE W.R. “Factors affecting beef palatability - farmgate to chilled carcass.” Australian Journal of Experimental Agriculture : 41 (7), 879-891 (2001)

FERLAY A., MARTIN B., PRADEL P., COULON J. B., CHILLIARD Y. “Influence of Grass-Based Diets on Milk Fatty Acid Composition and Milk Lipolytic System in Tarentaise and Montbe´ liarde Cow Breeds.” Journal of Dairy Science : 89, 4026-4041 (2006)

FIELD, R. A., WILLIAMS J. C., MILLER G. J. “The effect of diet on lamb flavor.” Food Technology : 37 (5), 258-263 (1983)

FRAISSE D., CARNAT A., VIALA D., PRADEL P., BESLE J.M., COULON J.B., FELGINES C., LAMAISON J.L. "Polyphenolic composition of a permanent pasture. Variations related to the period of harvesting.” Journal of Science and Food Agriculture : 87, 2427-2435 (2007)

FRANKE B.M., GREMAUD G., HADORN R., KREUZER M. "Geographic origin of meat-elements of an analytical approach to its authentication." European Food and Research Technology : 221, 493-503 (2005)

FRÄSER D. “The "new perception" of animal agriculture: legless cows, featherless chickens, and a need for genuine analysis.” Journal of Animal Science : 79, 634-641 (2001)

FRAYSSE I.-L., DARRÉ A. In *Produire des viands. Vol 1 - Sur quelles bases économiques et biologiques.* Technique & Documentation, LAVOISIER, Paris, France (1990)

FRENCH P., STANTON C., LAWLESS F., O'RIORDAN E. G., MONAHAN F. J., CAFFREY P. J., MOLONEY A.P. “Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets.” Journal of Animal Science : 78, 2849-2855 (2000)

FRIES G.F., PAUSTENBAUCH D.J. “Evaluation of potential transmission of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin contaminated incinerator emissions to humans via foods.” Journal of Toxicology and Environmental Health : 29, 1-43 (1990)

FRYER M., COLLINS C.D., FERRIER H., COLVILE R.N., NIEUWENHUIJSEN M.J. “Human exposure modelling for chemical risk assessment: a review of current approaches and research and policy implications.” Environmental Science and Policy : 9 (3), 261-274 (2006).

FRYER H.R., BAYLIS M., SIVAM K., Mc LEAN A.R. "Quantifying the risk from ovine BSE and the impact of control strategies." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences : 274 (1617), 1497-1503 (2007)

GALTIER P., OSWALD I.-P., GUERRE P., MORGAVI D., BOUDRA H., JOUANY J.-P. “Le risque mycotoxique : danger et impact sanitaire en productions animals.” INRA Production Animale : 21 (1), 107-116 (2008)

GATELLIER P., MERCIER Y., JUIN H., RENERRE M. “Effect of finishing mode (pasture- of mixed-diet) on lipid composition, colour stability, and lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle.” Meat Science : 69 (1), 175-186 (2005)

GEAY Y., BAUCHART D., HOCQUETTE J.-F., CULIOLI J. "Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat." Reproduction Nutrition Development : 41 (1), 1-26 (2001)

GRAY F.V., PILGRIM A.F., RODDA H.J. WELLER R.A. “Volatile fatty acids in the rumen of the sheep." Nature : 167(4259), 954 (1951)

GRÜNERT K.G. “what’s in a steak? A cross-cultural study on the quality perception of bee.” Food Quality and Preference : 8 (3), 157-174 (1997)

GONZÁLEZ-RODRíGUEZ M. J., ARREBOLA LIÉBANAS F. J., GARRIDO FRENICH A., MARTíNEZ VIDAL J. L., SÁNCHEZ LÓPEZ F. J. "Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry : 382 (1), 164-172 (2005)

GÓRECKI T., HARYNUK J., PANIC O. "The Evolution of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GCxGC)." Journal of Separation Science : 27, 431-441 (2004)

GUPTA S., NAYEK S., SAHA R. N., SATPATI S. “Assessment of heavy metal accumulation in macrophyte, agricultural soil, and crop plants adjacent to discharge zone of sponge iron factory.” Environmental Geology : 55(4), 731-739 (2008)

HA J.K., LINDSAY R.C. “Distribution of volatile branched-chain fatty acids in perinephric fats of various red meat species”. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie : 23 (5), 433-440 (1990)

HAENLEIN G.F.W. “Nutritional value of sheep milk”. Sheep Dairy News : 19, 5-11 (2002)

HAENLEIN G.F.W. “Goat milk in human nutrition”. Small Ruminant Research : 51, 155-163 (2004)

HAMBIDGE K.M., KREBS N.F. ”Zinc deficiency: a special challenge.” The Journal of Nutrition : 137, 1101-1105 (2007)

HARTMAN, A. M. *et al.* "Vitamins in Milk and Milk Products." American Diary Science Association: Champaign, IL. (1965)

HEATON T.H.E. “The $^{15}N/^{14}N$ ratios of plants in South Africa and Namibia: relationship to climate and coastal/saline environments." Oecologia : 74 (2), 236-246 (1987)

HEATON K., KELLY S.D., HOOGEWERF J., WOOLFE M. "Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis." Food Chemistry : 107, 506-515 (2008)

HEIM D., DETWILER L., WILLIAMS E., KIHM U. “Update on bovine spongiform encephalopathy, scrapie and chronic wasting disease.” 69th General session of the international committee, Paris, France, 27 May-1 June 2001

HEIM D., KIHM U. “Risk management of transmissible spongiform encephalopathies in Europe.” Revue Scientifique et Technique de l’Office International Des Epizooties (2003)

HELMIG D., VIERLING L. “Water Adsorption Capacity Of The Solid Adsorbents Tenax Ta, Tenax Gr, Carbotrap, Carbotrap C, Carbosieve Siii, And Carboxen 569 And Water Management Techniques For The Atmospheric Sampling Of Volatile Organic Trace Gases.” Analytical Chemistry : 67(23), 4380-4386 (1995)

HERNÁNDEZ A. J., PASTOR J. “Relationship between plant biodiversity and heavy metal bioavailability in grasslands overlying an abandoned mine.” Environmental Geochemistry and Health : 30, 127-133 (2008)

HILTON G.G., TATUM J.D., WILLIAMS S.E., BELK K.E., WILLIAMS F.L., WISE J.W., SMITH G.C. "An evaluation of current and alternative systems for quality grading carcasses of mature slaughter cows." Journal of Animal Science : 76, 2094-2103 (1998)

HINSHAW, J. V. “Purge-and-trap sampling system.” LC-GC International : 3 (22), 24-26 (1990)

HOPKINS D.L., NICHOLSON A. “Meat quality of wether lambs grazed on either saltbush (Atriplex mummularia) plus supplements or Lucerne.” Meat Science : 51, 91-95 (1999)

HUFFMAN K. L., MILLER M. F., HOOVER L. C., WU C. K., BRITTIN H. C., RAMSEY C. B. “Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in the home and restaurant.” Journal of Animal Science : 74 (1), 91-97 (1996)

JAMES A.T., PEETERS G., LAURYSSENS M. "Metabolism of Propionic Acid." Biochemical Journal : 64 (4), 726-730 (1956)

JENKINS T.C., BRIDGES W.C Jr. “Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle.” European Journal of Lipid Science and Technology : 109, 778-789 (2007)

JOST L.K., DINKEL C.A., COSTELLO W.J. “Beef Tenderness and Palatability as Influenced by Chemical Measures and Quality and Yield Grade Factors” Journal of Animal Science : 56, 1077-1087 (1983)

KÄHKÖNEN P, TUORILA H., RITA H. “How Information Enhances Acceptability of a Low-Fat Spread.” Food Quality and Preference : 7 (2), 87-94 (1996)

KANDLAKUNTA B., RAJENDRAN A., THINGNGANING L. "Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin." Food Chemistry : 106, 85-89 (2008)

KAWACHI H. "Micronutrients affecting adipogenesis in beef cattle." Animal Science Journal : 77, 463-471 (2006)

KELLY S., HEATON K., HOOGEWERF J. "Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis." Trends in Food Science & Technology : 16, 555-567 (2005)

KING M.-F., HAMILTON B.L., MATTHEWS M.A., RULE D.C., FIELD R.A. "Isolation and Identification of Volatiles in Raw Beef with Supercritical Carbon Dioxide Extraction." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 41, 1974-1981 (1993)

KNOWLES S.O., GRACE N.D., KNIGHT T.W., Mc NABBA W.C., LEE J. "Reasons and means for manipulating the micronutrient composition of milk from grazing dairy cattle." Animal Feed Science and Techology : 131, 154-167 (2006)

KONDJOYAN N., BERDAGUE J. L. “A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds.” Laboratoire Flaveur: Clermont Ferrand, France, 1996.

KORNEXL B.E., WERNER T., ROßMANN A., SCHMIDT H.-L. “Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients - a possible tool for origin assignment and quality control.” Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A : 205, 19-24 (1997)

KROKOS F, CREASER CS, WRIGHT C., STARTIN J.R. “Levels of selected ortho and non-ortho polychlorinated biphenyls in UK retail milk.” Chemosphere : 32, 667–673 (1996)

LANE G. A., FRASER K. "A comparison of phenol and indole flavour compounds in fat, and of phenols in urine cattle fed pasture or grain." New Zealand Journal of Agricultural Research : 42 (4), 289-296 (1999)

LARICK D.K., HEDRICK H. B., BAILEY M.E., WILLIAMS J.E., HANCOCK D.L., GARNER G.B., MORROW R.E. "Flavor constituents of beef as influenced by forage - and grain - feeding." Journal of Food Science : 52 (2), 245-251 (1987)

LEAF A., XIAO Y. F., KANG J. X., BILLAMN G. E. "Prevention of sudden cardiac death by n - 3 polyunsaturated fatty acids." Pharmacology and Therapeutics : 98, 355-377 (2003)

LECLERCQ S., MILO C., REINECCIUS G.A. "Comparison of antioxidants to prevent oxidation of sulphur flavour compound in sunflower oil." Flavour and Fragrance Journal : 23 (5), 333-339 (2008)

LEDOUX M., JUANEDA P., SEBEDIO J.-L. "Trans fatty acids: Definition and occurrence in foods." European Journal of Lipid Science and Technology : 109, 891-900 (2007)

LOMBARDI-BOCCIA G., LANZI S., AGUZZI A. "Aspects of meat quality: trace elements and B vitamins in raw and cooked meats." Journal of Food Composition and Analysis : 18, 39-46 (2005)

LONE M.I., HE Z.-L., STOFFELLA P.J. "Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives." Journal of Zhejiang University Science B : 9(3), 210-220 (2008)

LOOR J.J., DOREAU M., CHARDIGNY J.M., OLLIER A., SEBEDIO J.L., CHILLIARD Y. “Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of trans-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage.” Animal Feed Science and Technology : 119, 227-246 (2005)

LUKITO W., WATTANAPENPAIBOON N., SAVIGE G.S., HUTCHINSON P., WAHLQVIST M.L. “Nutritional indicators, peripheral blood lymphocyte subsets and survival in an institutionalized elderly population.” Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition : 13, 107-112 (2004)

MALTIN C., BALCERZAK D., TILLEY R., DELDAY M. "Determinants of meat quality: tenderness.” Proceedings of the Nutrition Society : 62, 337-347 (2003)

MARIE M. “Ethics: The new challenge for animal agriculture.” Livestock Science : 103, 203-207 (2006)

MARIACA R.G., BERGER T.F.H., GAUCH R., IMHOF M.I., JEANGROS B., BOSSET J.O. “Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavor compounds in milk and dairy products.” Journal of Agricultural and Food Chemistry : 45, 4423-4434 (1997)

MARTIN B., CORNU A., KONDJOYAN N., FERLAY A., VERDIER-METZ I., PRADEL P., ROCK E., CHILLIARD Y., COULON J.-B., BERDAGUE J.-L. "Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows". In *Indicators of milk and beef quality*, Hocquette J.F., Gigli S. (Eds), Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, EAAP Publication (2005)

Mc DOWALL F.H., Mc GILLIVRAY W.A. “Studies on the properties of New Zealand butterfat – VII. Effect of the stage of maturity of ryegrass fed to cows on the characteristics of butterfat and its carotene and vitamin A contents.” Journal of Dairy Research : 30(1), 59-66 (1963)

Mc DOWELL, A. K. R., Mc DOWALL F. H. “The vitamin A potency of New Zealand butter." Journal of Dairy Research : 20 (1), 76-82 (1953)

Mc GRATH S.P., ZHAO F.J., LOMBI E. "Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils." Plant and Soil : 232, 207-214 (2001)

Mc KINLAY R., PLANT J.A., BELL J.N.B., VOULVOULIS N. "Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment." Environment International : 34, 168-183 (2008a)

Mc KINLAY R., PLANT J.A., BELL J.N.B., VOULVOULIS N. "Calculating human exposure to endocrine disrupting pesticides via agricultural and non-agricultural exposure routes." Science of the Total Environment : 398, 1-12 (2008b)

MENNECKE B.E., TOWNSEND A.M., HAYES D.J., LONERGAN S.M. "A study of the factors that influence consumer attitudes toward beef products using the conjoint market analysis tool." Journal of Animal Science : 85, 2639-2659 (2007)

MELTON S.L. "Effects of Feeds on Flavor of Red Meat: A Review." Journal of Animal Science : 68, 4421-4435 (1990)

MESCHY F. "Alimentation minérale et vitaminique des ruminants : actualisation des connaissances." INRA Production Animale : 20 (2), 119-128 (2007)

MEYN K. "Competitiveness of Livestock Production in the Process of Joining the EU - a review." Agriculturae Conspectus Scientificus : 68 (2), 37-43 (2003)

MITCHELL P.L., Mc LEOD R.S. "Conjugated linoleic acid and atherosclerosis : studies in animal models." Biochemistry and Cell Biology : 86, 293-301 (2008)

MIRNA A., CORETTI K. "Influence of processing on the degradation of pesticides in meat products." Meat Science : 3 (2), 97-108 (1979)

MOLKENTIN J., GIESEMANN A. "Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acid analysis." Analytical and Bioanalytical Chemistry : 388, 297-305 (2007)

MOLONEY A.P., MOONEY M.T., KERRY J.P., TROY D.J. "Animal Nutrition and Metabolism Group Symposium on ‘Quality inputs for quality foods’ Producing tender and flavoursome

beef with enhanced nutritional characteristics." Proceedings of the Nutrition Society : 60, 221–229 (2001)

MOODY WG. "Beef Flavor - a review." Food Technology : 37(5), 227-238 (1983)

MORAND-FEHR P., FEDELE V., DECANDIA M., LE FRILEUX Y. "Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk." Small Ruminant Research : 68 (1), 20-34 (2007)

MOTTRAM D.S. “Flavour formation in meat and meat products: a review.” Food Chemistry : 62 (4), 415-424 (1998)

NAPOLITANO F., BRAGHIERI A., CAROPRESE M., MARINO R., GIROLAMI A., SEVI A. "Effect of information about animal welfare, expressed in terms of rearing conditions, on lamb acceptability." Meat Science : 77, 431-436 (2007)

NATHAN I., HACKETT A.F., KIRBY S.P. "The dietary Intake of a group of vegetarian children aged 7-11 years compared with matched omnivores." British Journal of Nutrition : 75, 533-544 (1996)

NOAKES M., NESTEL P.J., CLIFTON P.M. "Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products." The American Journal of Clinical Nutrition : 63, 42-46 (1996)

NOZIERE P., GRAULET B., LUCAS A., MARTIN B., GROLIER P., DOREAU M. "Carotenoids in ruminants: from forage to dairy products." Animal Feed Science and Technology : 131, 418-450 (2006a)

NOZIERE P., CALDERON F., MARTIN B., PRACHE S., PRADEL P., PAPON Y., JESTIN M., ANDUEZA D., "Comparaison de deux méthodes spectrales pour tracer l’alimentation de vaches laitières à partir du lait." Rencontre Recherche Ruminants. 13, 192 (2006b)

NOZIERE P., GROLIER P., DURAND D., FERLAY A., PRADEL P., MARTIN B., “Variations in Carotenoids, Fat-Soluble Micronutrients, and Color in Cows’ Plasma and Milk Following Changes in Forage and Feeding Level.“ Journal of Dairy Science : 89, 2634-2648 (2006c)

O’CONNELL J.E., FOX P.F. "Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milkand dairy products: a review." International Dairy Journal : 11, 103-120 (2001)

O’LEARY M.H. "Carbon isotope fractionation in plants.” Phytochemistry : 20 (4), 553-567 (1981)

OKUMURA T., SAITO K., NADE T., MISUMI S., SAKUMA H., NAKAYAMA S., MASUDA Y., FUJITA K., KAWAMURA T. "Effects of high protein levels in concentrate feed during the early fattening stage on physico-chemical composition and sensory characteristics of M. longissimus in Japanese Black heifers." Animal Science Journal : 79, 332-338 (2008)

ONODERA T., KIM C.K. "BSE situation and establishment of Food Safety Commission in Japan." Journal of Veterinary Science : 7 (1), 1-11 (2006)

OUALI A. “Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande.” INRA Production Animale : 4 (3), 195-208 (1991)

OURY M.-P., PICARD B., ISTASSE L., MICOL D., DUMONT R. "Mode de conduite en élevage et tendreté de la viande bovine." INRA Production Animale : 20 (4), 309-326 (2007)

PANKOW, J. F. “Technique For Removing Water From Moist Headspace And Purge Gases Containing Volatile Organic Compounds. Application In The Purge With Whole-Column Cryotrapping (P/Wcc) Method.” Environmental Science and Technology : 25 (1), 123-126 (1991)

P.A.N. "List of Lists: A catalogue of lists of pesticides identifying those associated with particularly harmful health or environmental impacts." Pesticide Action Network (2005)

PASCALEV A.K. "We and they: Animal welfare in the era of advanced agricultural biotechnology." Livestock Science : 103, 208-220 (2006)

PENNINGTON R.J. "The Metabolism Of Short-Chain Fatty Acids In The Sheep .1. Fatty Acid Utilization And Ketone Body Production By Rumen Epithelium And Other Tissues." Biochemical Journal : 51(2), 251-258 (1952)

PERES C., BEGNAUD F., BERDAGUE J.L. "Standard gas addition : a calibration method for handling temporal drifts of mass spectrometry-based sensors." Analytical Chemistry : 74, 2279-2283 (2002)

PHILLIPS C.J.C., CHIY P.C., OMED H.M. "The effects of cadmium in feed, and its amelioration with zinc, on element balances in sheep." : Journal of Animal Science 82, 2489-2502 (2004)

PIASENTIER E., VALUSSO R., CAMIN F., VERSINI G. "Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat." Meat Science : 64, 239-247 (2003)

PITTET A.. "Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review." Revue Médicale Vétérinaire : 149, 479-492 (1998)

PIZZOFERRATO L., MANZI P., MARCONI S., FEDELE V., CLAPS S., RUBINO R. "Degree of Antioxidant Protection: A Parameter to Trace the Origin and Quality of Goat’s Milk and Cheese." American Dairy Science Association, 90, 4569-4574 (2007)

P.N.U.E. Programme des Nations Unies pour l’Environnement. "Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants." http://chm.pops.int (2001)

PRACHE S., THERIEZ, M. “Traceability of lamb production systems: carotenoids in plasma and adipose tissue.” Animal Science : 69: 29-36 (1999)

PRACHE S., PRIOLO A., GROLIER P. "Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep : Its significance for the traceability of grass-feeding." Journal of Animal Science : 81, 360-367 (2003a)

PRACHE S., PRIOLO A., GROLIER P. "Effect of concentrate finishing on the carotenoid content of perirenal fat in grazing sheep: its significance for discriminating grass-fed, concentrate-fed and concentrate-finished grazing lambs.” Animal Science : 77, 225-233 (2003b)

PRACHE S., M. B., NOZIERE P., ENGEL E., BESLE J.M., FERLAY A., MICOL D., CORNU A., CASSAR-MALEK I., ANDUEZA D. “Authentification de l'alimentation des ruminants à partir de la composition de leurs produits et tissus.” INRA Productions animales : 20(4), 295-308 (2007)

PRECHTHAI T., PARKPIAN P. VISVANATHAN C. " Assessment of heavy metal contamination and its mobilization from municipal solid waste open dumping site." Journal of Hazardous Materials : 156(1-3), 86-94 (2008)

PREZIOSI P., HERCBERG S., GALAN P., DEVANLAY M., CHEROUVRIER F., DUPIN H. "Iron status of a healthy French population: factors determining biochemical markers." Annals of Nutrition and Metabolism : 38, 192-202 (1994)

PRIOLO A., MICOL D., AGABRIEL J. "Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour. A review." Animal Research : 50, 185-200 (2001)

PRIOLO A., CORNU A., PRACHE S., KROGMANN M., KONDJOYAN N., MICOL D., BERDAGUE J.-L. "Fat Volatile Tracers of Grass Feeding in Sheep." Meat Science : 66, 475-481 (2004)

PRIOLO A., VASTA V. "Effects of tannin-containing diets on small ruminant meat quality." Italian Journal of Animal Science : 6 (S1), 527-530 (2007)

RAES K., B. A., DIRINCK M., DE WINNE A., CLAYES E., DEMEYER D., *et al.* “Meat quality, fatty acids composition and flavour analysis in belgian retail beef.” Meat Science : 65 (4): 1237-1246 (2003)

RATEL J., BERGE P., BERDAGUÉ J.-L., CARDINAL M., ENGEL E. "Mass Spectrometry Based Sensor Strategies for the Authentication of Oysters According to Geographical Origin." Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 321-327 (2008)

RAYMAN M.P. "The importance of selenium to human health." The Lancet : 356, 233-241 (2000)

REILLY C. "Selenium in food and health." London : Blackie Academic and Professional (1996)

RENERRE M. "La couleur de la viande et sa mesure." Viande et Produits Carnés : 2, 10-16 (1981)

RENOU J.-P., DEPONGE C., GACHON P., BONNEFOY J.-C., COULON J.C., GAREL J.-P., VERITE R., RITZ P. “Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk.” Food Chemistry : 85 (1), 63-66 (2004a)

RENOU J.-P., BIELICKI G., DEPONGE C., GACHON P., MICOL D., RITZ P. “Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II: Beef meat.” Food Chemistry : 85, 251-256 (2004b)

RIOS J.J., FERNANDEZ-GARCIA E., MINGUEZ-MOSQUERA M..I, OEREZ-GALVEZ A. “Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins.” Food Chemistry : 106, 1145-1153 (2008)

ROUSSET-AKRIM, S., YOUNG O. A., BERDAGUE J. L. "Diet and growth effects in panel assessment of sheepmeat odour and flavour." Meat Science ; 45:169-181 (1997)

ROY N.C., FRASER K., LANE G.A., REYNOLDS G.W., DEIGHTON M.H., PETERS J.S., *et al.* "The effects of condensed-tannins on the net flux of skatole and indole across the mammary gland and their ribose and polyunsaturated fatty acids." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 50 (5), 1126-1132 (2004)

ROY A., FERLAY A., SHINGFIELD K.J., CHILLIARD Y. "Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid." Animal Science : 82, 479-492 (2006)

ROWE A., MACEDO F. A. F., VISENTAINER J.V., SOUZA N.E., MATSUSHITA N. “Muscle composition and fatty acid profile in lambs fattened in drylot or pasture.” Meat Science : 51, 283-288 (1999)

RYCHEN G., JURJANZ S., TOUSSAINT H., FEIDT C. "Dairy ruminant exposure to persistent organic pollutants and excretion to milk." Animal : 2 (2), 312-323 (2008)

SALLAM K.I., MORSHEDY A.E.M.A. "Organochlorine pesticide residues in camel, cattle and sheep carcasses slaughtered in Sharkia Province, Egypt." Food Chemistry 108, 154-164 (2008)

SANTÉ-LHOUTELLIER V., ENGEL E., GATELLIER PH. "Assessment of the influence of diet on lamb meat oxidation." Food Chemistry : 109, 573-579 (2008)

SCHMIDT O., QUILTER J.-M., BAHAR B., MOLONEY A.P., SCRIMGEOUR C.M., BEGLEY L.S., MONAHAN F.J. "Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis." Food Chemistry : 91, 545-549 (2005)

SCHOR A., COSSU M.E., PICALLO A., FERRER J.M., NAON-G. J.J., COLOMBATTO D. "Nutritional and eating quality of Argentinean beef: A review." Meat Science 79, 408-422 (2008)

SCHREUDER B.E.C., SOMERVILLE R.A. "Bovine spongiform encephalopathy in sheep?" Revue Scientifique et Technique de l’Office International des Epizooties : 23 (1), 285-295 (2003)

SCHREURS N.M., TAVENDALE M.H., LANE G.A., BARRY T.N., Mc NABB W.C. "Effect of white clover (Trifolium repens), perennial grass (Lolium perenne) and Lotus corniculatus on in vitro skatole and indole formation." In *Proceedings of the 25nd biennial conference of the Australian society of animal production, animal production in Australia*, 4–8 July 2004, Victoria, Australia, pp. 164-167 (2004)

SCOLLAN N., HOCQUETTE J.-F., NUERNBERG K., DANNENBERGER D., RICHARDSON I., MOLONEY A. "Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality." Meat Science : 74, 17-33 (2006)

SEBASTIAN I., VIALLON-FERNANDEZ C., BERGE P., BERDAGUÉ J.L. "Analysis of the volatile fraction of lamb fat tissues : influence of the type of feeding.” Sciences des Aliments : 23, 497-511 (2003)

SHEATH G.W., COULON J.B., YOUNG O.A. “Grassland management and animal product quality.” In *Proc. XIX International Grassland Cong., Sao Paulo (Brazil)*, 11-21 February 2001, pp. 1019-1026 (2001)

SIMOPOULOS A. P. "Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases." Food Reviews International : 20, 77–90. (2004)

SUTTON J.D. "Altering milk composition by feeding." Journal of Dairy Science : 72, 2801-2814 (1989)

SUZUKI J., BAILEY M.E. “Direct Sampling Capillary GLC Analysis of Flavor Volatiles from Ovine Fat.” Journal of Agricultural and Food Chemistry : 33 (3), 343-347 (1985)

TAVENDALE, M.H., LANE, G.A., SCHREURS, N.M., FRASER, K., AND MEAGHER, L.P. "The effects of condensed tannins from *Dorycnium rectum* on skatole and indole ruminal biogenesis for grazing sheep." Australian Journal Agriculture Research : 56, 1331-1337 (2005)

TEIRA G. *et al.* "Influence of feeding system and finishing feeding in tie stall housing on sensory quality of beef produced in NE Argentinean area". In Proceedings 49th international congress of meat science and technology (pp. 179–180) (2003)

THOMAS G.O., SMITH K.E.C., SWEETMAN A.J., JONES K.C. “Further studies of the air–pasture transfer of polychlorinated biphenyls.” Environmental Pollution : 102, 119–128 (1998)

THOMPSON J., BANNIGAN J. “Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo.” Reproductive Toxicology : 25, 304-315 (2008)

TRANCHANT J. “Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse”. Masson, 4ième edition (1995)

URBACH G., “Effect of feed on flavor in dairy foods.” Journal of Dairy Science 73, 3639-3650 (1990)

VASTA V. PRIOLO A. “Ruminant Fat Volatiles as Affected by Diet. A Review." Meat Science 73(2), 218-228 (2006)

VASTA V., RATEL J., ENGEL E. "Mass Spectrometry Analysis of Volatile Compounds in Raw Meat for the Authentication of the Feeding Background of Farm Animals.” Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 4630-4639 (2007)

VALSTA L.M., TAPANAINEN H., MÄNNISTÖ S. “Meat fats in nutrition.” Meat Science : 70, 525-530 (2005)

VENTANAS S., ESTEVEZ M., ANDRES A.I., RUIZ J. “Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED." Meat Science 79 : 172-180 (2008)

VERDIER-METZ I., COULON J.B., PRADEL P., VIALLONAND C.,BERDAGUE J.-L. "Effect of forage conservation (hay or silage) and cow breed on the coagulation properties of milks and on the characteristics of ripened cheeses." Journal of Dairy Research : 65 (1), 9-21 (1998)

VIALLON C., MARTIN B., VERDIER-METZ I., PRADEL P., GAREL J.P., COULON J.B., BERDAGUÉ J.L. “Transfer of monoterpenes ans sesquiterpenes from forages into milk fat.” Lait : 80, 635-641 (2000)

VIRUEGA J.-L. "Traçabilité: Outils, méthodes et pratiques". Paris. 2005

VOLATIER J.L. "Apports en énergie et nutriments pour les adultes et les enfants." In : *Enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires*, Tec et Doc, Lavoisier (Ed), Paris, France, 101-119 (2000)

WAMPLER T. "Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques. Flavor, fragrance and odor analysis". Marcel Dekker. M. R. New York: p. 45-54 (2004).

WANG Y., Mc CAFFREY J., NORWOOD D.L. "Recent Advances in Headspace Gas Chromatography." Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies : 31 (11-12), 1823-1851 (2008)

WARREN H.E., SCOLLAN N.D., ENSER M., HUGHES S.I., RICHARDSON R.I., WOOD J.D. "Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition." Meat Science : 78, 256-269 (2008)

WELLS A.M., HAUB M.D., FLUCKEY J., WILLIAMS D.K., CHERNOFF R., CAMPBELL W.W. "Comparison of vegetarians and beef-containing diet on haematological indexes and iron stores during a period of resistive training in older men." Journal of the American Dietetic Association : 103, 594-601 (2003)

WELSCH-PAUSCH K, Mc LACHLAN MS, UMLAUF G. "Determination of the principal pathway of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to lolium multiflorum (Welsh Ray Grass)." Environmental Science and Technology : 29, 1090-1098 (1995)

WELSCH-PAUSCH K., Mc LACHLAN M.S., "Fate of airborne polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in an agricultural ecosystem." Environmental Pollution : 102, 129–137 (1998)

WHO. "Public health impact of pesticides used in agriculture." WHO in collaboration with the UNEP. Geneva: World Health Organization. (1990)

WHO. "Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases." Report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO technical report series 916, Geneva (2003)

WILLIAMS C.M. "Dietary fatty acids and human health." Annales de Zootechnie : 49, 165-180 (2000)

WILLIAMSON C.S., FOSTER R.K., STANNER S.A., BUTTRISS J.L. "Red meat in the diet." British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin : 30, 323-335 (2005)

WOOD J.D., ENSER M. "Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality." British Journal of Nutrition : 78(Sup1), S49-S60 (1997)

WOOD J.D., RICHARDSON R.I., NUTE G.R., FISHER A.V., CAMPO M.M., KASAPIDOU E., SHEARD P.R., ENSER M. "Effects of fatty acids on meat quality: a review." Meat Science : 66, 21-32 (2003)

YAMANOUCHI K., YOSHIKAWA Y. "Bovine spongiform encephalopathy (BSE) safety measures in Japan." Journal of Veterinary Medical Science : 69 (1), 1-6 (2007)

YANG A., LARSEN T. W., TUME R.K. “Carotenoid and retinal concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoids transport in sheep, goats and cattle.” Australian Journal of Agricultural Research : 43, 1809-1817 (1992)

YANG A, TUME RK "A comparison of beta-carotene-splitting activity isolated from intestinal mucosa of pasture-grazed sheep, goats and cattle." Biochemistry and Molecular Biology International : 30 (2), 209-217 (1993)

YIANNIKOURIS A., JOUANY J-P. "Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal." INRA Production Animale : 15(1), 3-16 (2002)

YOUNG O. A., BERDAGUE J.-L., VIALLON C., ROUSSET-AKRIM S., THERIEZ M. "Fat-borne Volatiles and Sheepmeat Odour." Meat Science : 45 (2), 183-200 (1997)

YOUNG O. A., BAUMEISTER B. M. B. "The effect of diet on the flavour of beef and the odour compounds in beef fat." New Zealand Journal of Agricultural Research 42(4), 297-304 (1999)

YOUNG O. A., LANE G. A., PRIOLO A., FRASER K. "Pastoral and species flavour in lambs raised on pasture, lucerne or maize." Journal of the Science of Food and Agriculture : 83 (2), 93-104 (2003)

Résumé

Il existe une forte demande sociétale de moyens analytiques robustes permettant d'authentifier de manière objective les modes d'élaboration des produits alimentaires, notamment lorsqu'ils sont d'origine animale.

L'objectif de cette thèse était de développer une méthode d'authentification de l'alimentation à l'herbe des agneaux, basée sur l'analyse de la fraction volatile de leurs tissus adipeux. Les animaux étudiés ont été élevés dans le cadre de dispositifs expérimentaux, où leur alimentation était étroitement contrôlée. Les tissus périrénal, sous-cutané caudal, et péricardiaque ont été analysés au moyen d'un système d'Espace de Tête Dynamique - Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (ETD-CPG-SM), dont le signal a été corrigé et stabilisé par différentes procédures chimiométriques.

La première étape de ce travail de recherche visait à identifier les traceurs distinctifs de tissus adipeux d'agneaux nourris soit à l'herbe soit aux concentrés. Une fois les conditions d'analyse des composés volatils optimisées, 126 traceurs de l'alimentation au pâturage ont été identifiés. Cette expérimentation a également permis de montrer l'intérêt de l'analyse parallèle de tissus de natures différentes pour la discrimination des deux alimentations.

La deuxième étape avait pour objectif de montrer l'intérêt de l'analyse de la fraction volatile de tissu adipeux d'agneau pour l'authentification des régimes alternés. Ces régimes, couramment utilisés pour l'élevage des ruminants consistent à alterner une période d'alimentation au pâturage avec une finition aux concentrés, ou inversement. Les variations des abondances des traceurs volatils d'une alimentation au pâturage ont été suivies dans les tissus adipeux d'animaux nourris avec ces régimes alternés. Les résultats montrent que les composés volatils permettent de discriminer des tissus adipeux d'animaux nourris d'une part à l'herbe et finis aux concentrés pour un engraissement final de 0, 4, 8, ou 12 kg ; et d'autre part aux concentrés et finis au pâturage durant 0, 17, 51, ou 85 jours.

Couplés aux données de la littérature, l'ensemble des dispositifs d'élevage mis en œuvre au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence 19 composés volatils traceurs de l'alimentation à l'herbe particulièrement robustes et génériques. Ces travaux démontrent également la faisabilité de l'authentification de l'alimentation d'animaux nourris au moyen de régimes contrastés ou alternés. Enfin, ils confirment également l'intérêt des procédures de traitement du signal, comme la correction des dérives instrumentales ou l'utilisation de ratios de variables, pour amplifier le pouvoir discriminant des modèles d'authentification.

Mots Clefs : Authentification des aliments, alimentation au pâturage, ruminants, composés volatils, tissus adipeux, latence, persistance, CPG-SM, correction des dérives instrumentales.

Abstract

There is an increasing consumer demand for robust analytical tools for objective authentication of the processing practices in food production chains, in particular for animal products.

The aim of this work was to develop an authentication tool of grass feeding in lambs by analysing the volatile fraction of their adipose tissues. The animals were raised under experimental conditions allowing a strict control of feeding. The perirenal, caudal sub-cutaneous, an heart fat tissues were analysed by Dynamic Headspace - Gas Chromatography - Mass Spectrometry (DH-GC-MS). The analytical signal was stabilized and the drifts were corrected by using chemometrics tools.

The purpose of the first step of the study was to identify the compounds discriminating the adipose tissues of lambs fed either pasture or concentrate. Using an improved analytical procedure, 126 pasture diet tracers were identified. This experiment also showed the interest of analyzing different types of adipose tissues in parallel for discriminating the two diets.

The second step of the study aimed at assessing the relevance of the volatile fraction of lamb adipose tissues to authenticate alternate diets. These diets, widely used for the ruminant rearing, consist in switching from pasture to a concentrate based diet before slaughter, or vice versa. The variations in the amounts of pasture diet volatile tracers were monitored in different adipose tissues of lambs fed with such alternate diets. Volatile compounds enabled to discriminate lambs fed at pasture then finished on a concentrate diet for periods corresponding to 0, 4, 8, or 12 kg of the final weight gain. Likewise, the lambs fed concentrate and finished at pasture for periods corresponding to 0, 17, 51, 85 days were successfully discriminated.

In addition to litterature data, all the experimental rearing systems used in this work allowed to reveal 19 particularely robust and generic volatile tracers of pasture diet. This work evidenced the feasibility of the authentication of feeding practices of lambs fed alternate diets. It also reinforces the ability of procedures of analytical signal treatment like instrumental drifts correction and ratios of variables to improved the discrimination power of authentication models.

Keywords : Food Authentication, Pasture feeding, ruminants, volatile compounds, adipose tissues, latency, persistence, GC-MS, instrumental dirfts correction.