



**HAL**  
open science

# Perception du gras : variabilité interindividuelle et origine

Rachel Schoumacker

► **To cite this version:**

Rachel Schoumacker. Perception du gras : variabilité interindividuelle et origine. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS030 . tel-01918836

**HAL Id: tel-01918836**

**<https://theses.hal.science/tel-01918836>**

Submitted on 12 Nov 2018

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

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



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Bourgogne

*Discipline : Sciences de l'Alimentation. Analyse sensorielle, Physico-Chimie, Biologie*

Présentée par **Rachel SCHOUMACKER**

Le 10 novembre 2016

# Perception du gras : variabilité interindividuelle et origine

Directeur de thèse

**Jean-Luc LE QUERE**

Co-encadrant de thèse

**Hélène LABOURE**

## *Jury*

Pr. A. Buettner

Dr. J. Delarue

Dr. I. Souchon

Pr. P. Cayot

Dr. E. Guichard

Dr. J.L. Le Quéré

Dr. H. Labouré

Professeur, Université de Erlangen-Nuremberg

Maître de conférences, AgroParisTech, Massy

Directrice de recherche INRA, Grignon

Professeur, AgroSup Dijon

Directrice de Recherche INRA, Dijon

Ingénieur de Recherche INRA, Dijon

Maître de conférences, AgroSup, Dijon

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrant, invitée



## **Remerciements**

Je remercie Monsieur Luc PENICAUD directeur de l'UMR (Unité Mixte de Recherche) Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA), ainsi que Madame Elisabeth GUICHARD et Monsieur Christian SALLES responsables de l'équipe 1 dont la thématique est de comprendre les mécanismes conduisant à la libération des molécules de la flaveur et leur impact sur la perception sensorielle globale chez l'homme, de m'avoir accueillie au sein de l'unité et de l'équipe pour accomplir ce travail de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres du projet QualigrasPhy et l'institut Carnot pour le financement de ce projet.

De même, je remercie les partenaires externes de ce projet : Le centre de transfert agroalimentaire Welience de Dijon pour la formulation de crèmes desserts réduites en matière grasse, l'INRA de Grignon pour les travaux de recherche notamment sur la caractérisation des bols alimentaires, l'UMR QUAPA (Qualité des Produits Animaux) de Clermont Ferrand pour la formulation des saucisses réduites en matière grasse et les travaux de recherche sur ces saucisses et Monsieur Roberto VARGIOLU du laboratoire de tribologie et dynamique des systèmes de l'Ecole Centrale de Lyon pour le traitement des mesures de rugosité de la langue de nos sujets.

Je remercie Madame Andrea BUETTNER et Monsieur Julien DELARUE, rapporteurs de ce manuscrit, Madame Isabelle SOUCHON, Madame Elisabeth GUICHARD et Monsieur Philippe CAYOT membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur Franco BIASIOLI et Madame Carole PROST d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et de leurs conseils avisés sur le sujet.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse Monsieur Jean-Luc LE QUERE et ma co-encadrante de thèse Madame Hélène LABOURE pour leur constante disponibilité tout au long de cette thèse. Je les remercie pour ces nombreux moments d'échanges et discussions toujours dans la bonne humeur, leur aide en toute circonstance et les nombreux conseils scientifiques qui ont toujours été constructifs pour moi et qui ont permis de faire avancer ce projet. Je les remercie aussi de m'avoir donné la possibilité de communiquer mes résultats de thèse dans des congrès internationaux. Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous pendant ces trois années de thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Christophe MARTIN pour son implication irréprochable dans cette thèse. Je le remercie pour les nombreuses discussions scientifiques et personnelles qui m'ont beaucoup fait réfléchir et avancer. Je le remercie aussi pour son aide dans les analyses statistiques et dans la conduite des séances d'évaluation sensorielle. Merci à lui pour sa rigueur, son soutien et ses qualités humaines. Merci également à lui pour sa collaboration tant dans la rédaction des articles scientifiques que dans la relecture de cette thèse.

Ce projet est le fruit d'une collaboration entre l'équipe 1 (mécanismes conduisant à la libération des molécules de la flaveur et leur impact sur la perception sensorielle globale chez l'homme) et l'équipe 2 (mécanismes moléculaires qui sous-tendent la perception chimiosensorielle des molécules sapides et odorantes qui sont responsables de la flaveur des aliments) de l'UMR CSGA de Dijon. Ainsi, je remercie l'ensemble des membres de ces équipes avec qui j'ai pu interagir tout au long de ces trois

années de thèse. Je remercie tout particulièrement Monsieur Philippe FAURE et Monsieur Jean-Marie HEYDEL pour leur disponibilité, leur soutien, leurs conseils scientifiques et pour toutes ces expérimentations réalisées dans la joie et la bonne humeur. Je les remercie aussi pour leur contribution dans la correction de ce manuscrit. Je remercie Madame Chantal SEPTIER et Madame Claire FOLLOT pour leur aide précieuse sur la mesure du tapissage oral et l'extraction des lipides. Je remercie Monsieur Thierry THOMAS DANGUIN pour ses précieux conseils en évaluation sensorielle et pour la relecture de mes articles.

Je remercie la Plateforme ChemoSens pour m'avoir donné accès aux équipements physico-chimiques et d'évaluation sensorielle. Je remercie plus particulièrement Monsieur Etienne SEMON pour m'avoir transmis son savoir et sa passion pour la spectrométrie de masse. Merci à lui pour ses cours de biochimie et pour les nombreuses heures passées à la construction du système de mesure des métabolites en continu. Je remercie aussi Madame Karine GOURRAT et Madame Isabelle ANDRIOT pour m'avoir fait découvrir la chromatographie et pour avoir surmonté avec moi les difficultés concernant les SAFEs sur les fromages blancs.

Je remercie Monsieur Jacques Maratray pour l'outil d'analyse qu'il m'a créé.

Je remercie Madame Fabienne BOUILLOT et Madame Betty LEMAN pour leur aide précieuse dans le recrutement des sujets et l'organisation des séances.

Je tenais aussi à remercier ma collègue de bureau Madame Carole TOURNIER d'avoir toujours été positive concernant mes travaux de recherche et mes choix de carrière professionnelle.

Je remercie mon amie Aline ROBERT-HAZOTTE pour son soutien et son aide précieuse dans les différentes expérimentations. Entre travail à « 4-mains » et fous-rires, nous avons toujours su avancer et ces moments resteront pour moi inoubliables.

Merci également à tous les stagiaires : Aline, Manon, Marilou, Margot, Pauline, Doris, Emiko, Aurélien, Sasha et Adrien que j'ai eu le plaisir de co-encadrer et qui ont participé à ce travail.

Je remercie l'ensemble du panel QualigrasPhy pour leur fidélité et leur enthousiasme.

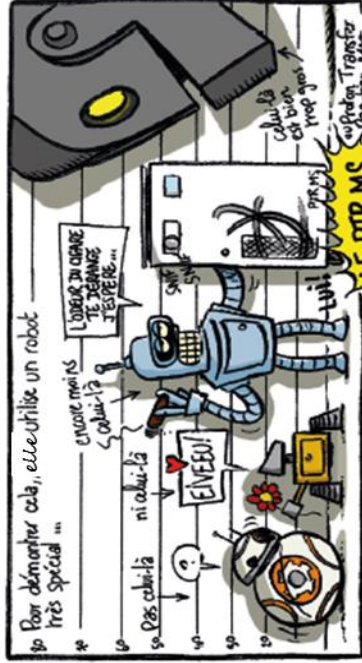
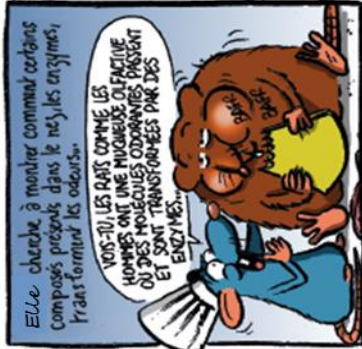
Je remercie Madame Sophie NICKLAUS, Madame Christine LANGE, Monsieur Loïc BRIAND et Madame Christine BELLOIR de m'avoir transmis la flamme de la recherche scientifique durant mes stages de master. Merci à eux de m'avoir aidé à arriver jusqu'à la thèse.

Je remercie Monsieur Fabrice STEHLIN pour notre amitié, son soutien et ces longues discussions scientifiques.

Enfin, et bien évidemment, je remercie mes parents ainsi que Marlène et Michael pour m'avoir toujours soutenu.

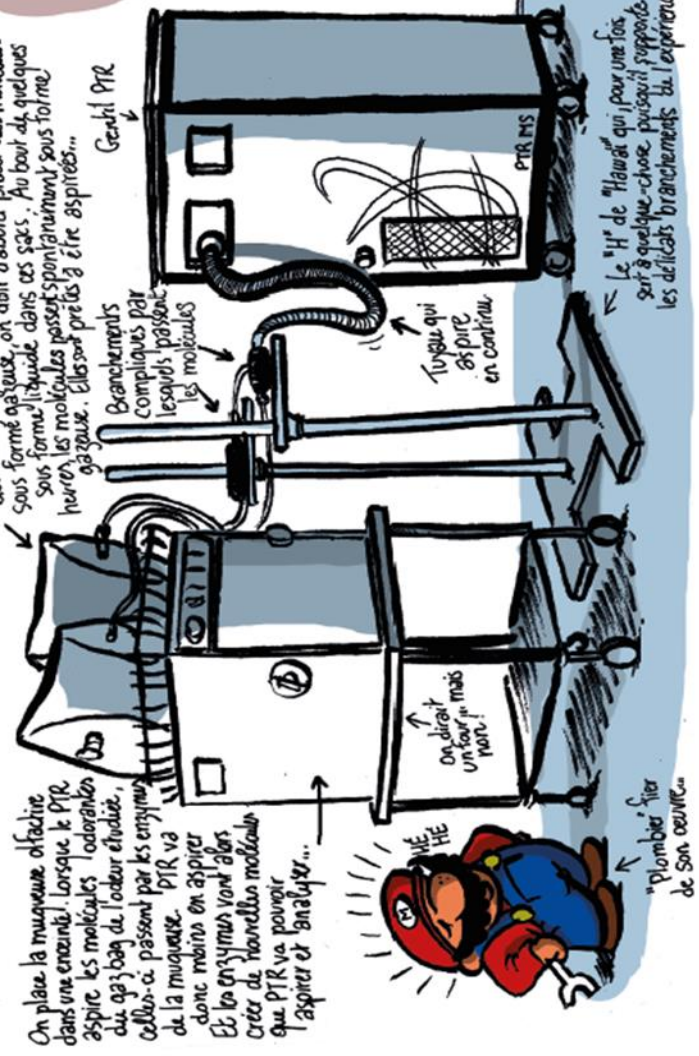
J'espère n'avoir oublié personne à travers ces quelques lignes dans cet exercice toujours délicat que sont les remerciements et avoir pu témoigner ma profonde reconnaissance. Cette thèse restera gravée dans mes souvenirs et je vous en remercie !

# RACHEL ET SA MACHINE A SENTIR



"LE PIRMS - "PIR" POUR LES INTIMES - ASPIRE ET LES ANALYSE... GRÂCE À LUI, ON PEUT REGARDER CE QUI SE PASSE QUAND LE NEZ SENT UNE ODEUR... ON A BEAUCOUP BARDOUÏE (DANS LE JARGON, ON DIT "FAIRE DE LA PLOMBERIE") POUR METTRE AU POINT L'INSTALLATION QUI PERMET AU PIR D'ASPIRER LES MOLECULES ODORES QUI PASSERONT AU PREALABLE PAR LA MUCQUEUSE OLFRACTIVE..."

## LA PLOMBERIE EN QUESTION





## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1: Etat de l'art</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Les lipides et les graisses dans les aliments</b> .....	<b>9</b>
1.1. Acides gras (AG).....	9
1.2. Triglycérides .....	10
1.3. Phospholipides .....	10
<b>2. Détection et discrimination de la matière grasse dans les aliments</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Modalités de perception de la flaveur</b> .....	<b>12</b>
3.1. Composantes sapides dans la perception .....	12
3.1.1. Perception des composés non volatils .....	12
3.1.2. Les 5 saveurs et ... le goût du gras ? .....	14
3.2. Composante somesthésique (tactile et thermique) dans la perception.....	16
3.3. Composante olfactive dans la perception.....	18
3.3.1. Fonctionnement du système olfactif .....	18
3.3.2. Modulation de la perception olfactive : les évènements péri-récepteurs.....	20
3.4. Interactions entre sens.....	23
<b>4. Mesure de la libération des arômes</b> .....	<b>26</b>
4.1. Méthodes de mesure .....	26
4.1.1. Méthodes discontinues .....	26
4.1.2. Méthodes continues et en temps réel .....	29
4.2. Protocole de consommation libre ou imposé .....	32
4.3. Méthodes d'analyse des profils de libération en continu.....	33
<b>5. Quels liens entre la libération des composés d'arôme et perception ?</b> .....	<b>36</b>
5.1. Libération des composés d'arôme <i>in vitro</i> et données sensorielles .....	36
5.2. Mesure non simultanée de la libération des composés d'arôme <i>in vivo</i> et perception sensorielle .....	37
5.2.1. Libération des composés d'arôme <i>in vivo</i> et perception sensorielle statique sur deux panels différents.....	37
5.2.2. Libération des composés d'arôme <i>in vivo</i> et perception sensorielle statique sur un panel unique.....	39
5.2.3. Libération des composés d'arôme <i>in vivo</i> et perception sensorielle dynamique.....	40



5.3.	Mesure simultanée de la libération des composés d'arôme <i>in vivo</i> et de la perception sensorielle dynamique .....	44
5.3.1.	Impact du saccharose .....	44
5.3.2.	Impact de la teneur en arôme .....	45
5.3.3.	Impact des agents de textures .....	45
5.3.4.	Impact de la teneur en matière grasse .....	46
5.3.5.	Impact de la variabilité interindividuelle .....	46
<b>6.</b>	<b>Paramètres impliqués dans la libération des composés d'arôme .....</b>	<b>47</b>
6.1.	Propriétés de l'aliment impliquées dans la libération des arômes .....	47
6.1.1.	Impact de la composition de l'aliment .....	47
6.1.2.	Impact de la structure (texture) d'un aliment .....	50
6.2.	Paramètres physiologiques impliqués dans la libération des arômes .....	51
6.2.1.	Mastication et salivation .....	51
6.2.2.	Velum .....	53
6.2.3.	Flux respiratoire .....	54
<b>7.</b>	<b>Stratégies de réduction du gras dans les aliments .....</b>	<b>55</b>
7.1.	Rôle du gras dans les aliments et difficultés qu'engendre sa réduction .....	55
7.2.	Réduction du gras dans les aliments .....	56
7.2.1.	Ajout d'un arôme .....	57
7.2.2.	Ajout d'un agent de texture .....	58
7.2.3.	Température de service .....	58
<b>8.</b>	<b>Objectifs et démarche expérimentale .....</b>	<b>59</b>

<b>Chapitre 2 : Réduction du gras dans les aliments et variabilité interindividuelle de la perception multimodale du gras. Constat et recherche d'explications.....</b>		<b>64</b>
<b>1.</b>	<b>Les sujets .....</b>	<b>67</b>
<b>2.</b>	<b>Les produits .....</b>	<b>67</b>
<b>3.</b>	<b>Réduction de la matière grasse dans les aliments.....</b>	<b>69</b>
3.1.	Réduction de la matière grasse dans les saucisses par ajout de fibres.....	69
3.1.1.	Matériels et Méthodes .....	69
3.1.2.	Résultats .....	71
3.2.	Réduction de la matière grasse dans le fromage blanc par ajout d'un arôme .....	72
3.2.1.	Matériels et Méthodes .....	73

3.2.2.	Résultats .....	75
3.3.	Discussion et conclusion.....	77
<b>4.</b>	<b>Caractérisation instrumentale des matrices alimentaires .....</b>	<b>80</b>
4.1.	Caractéristiques de texture .....	80
4.1.1.	Matériels et Méthodes.....	80
4.1.2.	Résultats .....	81
4.2.	Composition aromatique.....	83
4.2.1.	Matériels et Méthodes : Extraction des composés volatils de la matrice .....	83
4.2.2.	Résultats fromage blanc .....	84
4.2.3.	Résultats saucisses .....	85
4.3.	Libération des composés d'arôme <i>in vitro</i> .....	87
4.3.1.	Matériels et Méthodes.....	87
4.3.2.	Résultats .....	87
4.4.	Discussion et conclusion.....	89
<b>5.</b>	<b>Caractérisation sensorielle des produits et tapissage en bouche.....</b>	<b>93</b>
5.1.	Profil sensoriel ( <b>article 1</b> ) .....	93
5.2.	Quantification du film de gras .....	107
5.2.1.	Matériels et Méthodes.....	107
5.2.2.	Résultats et discussions.....	108
5.3.	Conclusion .....	112
<b>6.</b>	<b>Percevons-nous tous le gras de façon similaire ? (<b>article 2</b>).....</b>	<b>113</b>
6.1.	Résultats complémentaires.....	121
6.2.	Conclusion .....	122
<b>7.</b>	<b>Recherche des paramètres physiologiques pouvant expliquer la variabilité interindividuelle de sensibilité au gras.....</b>	<b>122</b>
7.1.	Matériels et Méthodes.....	124
7.1.1.	Volume oral .....	124
7.1.2.	Flux respiratoire, Fréquence respiratoire et Volume courant .....	124
7.1.3.	Flux salivaire au repos .....	125
7.1.4.	Viscosité de la salive .....	125
7.1.5.	Comptage des papilles fongiformes .....	126
7.1.6.	Tapissage et lipides résiduels .....	127
7.1.7.	Rugosité de la langue .....	127
7.1.8.	Libération des composés d'arôme en bouche .....	127

7.2.	Résultats .....	129
7.2.1.	Volume oral .....	129
7.2.2.	Flux respiratoire, Fréquence respiratoire et Volume courant .....	129
7.2.3.	Flux salivaire .....	131
7.2.4.	Viscosité de la salive .....	131
7.2.5.	Comptage des papilles fongiformes .....	132
7.2.6.	Tapissage et lipides résiduels .....	133
7.2.7.	Rugosité de la langue .....	133
7.2.8.	Libération des composés d'arôme en bouche .....	134
7.2.9.	Discussion .....	136
7.2.10.	Conclusion .....	138
<b>8.</b>	<b>Conclusion du chapitre .....</b>	<b>139</b>

## **Chapitre 3 : Métabolisme de la muqueuse olfactive.....142**

<b>1.</b>	<b>La muqueuse olfactive du rat, un tissu qui produit des métabolites issus de molécules odorantes .....</b>	<b>143</b>
1.1.	Etude du métabolisme de la muqueuse olfactive du rat par PTR-MS en temps réel et de manière discontinu ( <b>article 3</b> ) .....	144
1.2.	Détermination du coefficient de partage gaz/liquide des molécules odorantes étudiées.	150
1.3.	Résultats complémentaires .....	153
1.3.1.	2,3-pentanedione .....	153
1.3.2.	2,3-hexanedione .....	154
1.3.3.	2-acetoxy-3-butanone .....	154
1.4.	Discussion et conclusion .....	156
<b>2.</b>	<b>Rapidité du système de biotransformation des odorants .....</b>	<b>156</b>
2.1.	Etude du métabolisme de la muqueuse olfactive du rat par PTR- MS en temps réel et de manière continu ( <b>article 4</b> ) .....	157
2.2.	Résultats complémentaires .....	175
2.2.1.	2,3-hexanedione .....	175
2.2.2.	3,4-hexanedione .....	176
2.2.3.	2-acetoxy-3-butanone .....	177
2.3.	Discussion et conclusion .....	178
<b>3.</b>	<b>Identification des métabolites produits .....</b>	<b>179</b>
3.1.	Matériels et Méthodes .....	179

3.2.	Conclusion des résultats de l'article 4 .....	179
3.3.	Résultats complémentaires.....	179
3.1.	Conclusion .....	184
<b>4.</b>	<b>Et l'homme dans tout cela ? .....</b>	<b>184</b>
4.1.	Matériels et Méthodes.....	185
4.1.1.	Dispositif de prélèvement de l'air expiré par le sujet .....	185
4.1.2.	Système d'apport des molécules odorantes dans la cavité nasale de l'Homme .....	187
4.1.1.	Traitement des données obtenues par PTR-MS.....	189
4.1.2.	Identification des métabolites par CPG-MS .....	189
4.2.	Résultats .....	190
4.2.1.	Suivi du métabolisme des odorants <i>in vivo</i> par PTR-MS .....	190
4.2.2.	Identification des métabolites par CPG-MS .....	193
4.3.	Discussion et conclusion.....	194
<b>5.</b>	<b>Métabolisme de la 2,3-pentanedione par la MO des sujets retenus dans le projet QualigrasPhy</b>	<b>194</b>
5.1.	Matériels et Méthodes.....	194
5.1.1.	Sujets .....	194
5.1.2.	Suivi du métabolisme de la 2,3-pentanedione <i>in vivo</i> .....	195
5.2.	Résultats et discussion .....	195
5.3.	Conclusion .....	195
<b>6.</b>	<b>Identification de la qualité de l'odeur des métabolites .....</b>	<b>196</b>
6.1.	Matériel et Méthode : Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'évaluation olfactive CPG/O	196
6.2.	Résultats .....	198
6.1.	Discussion et conclusion.....	199
<b>7.</b>	<b>Un ou plusieurs métabolites ? .....</b>	<b>200</b>
7.1.	Matériel et Méthodes .....	200
7.2.	Résultats et discussion .....	201
<b>8.</b>	<b>Conclusion du chapitre.....</b>	<b>202</b>
	<b>Liste des figures et des tableaux.....</b>	<b>208</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>216</b>
	<b>Résumé.....</b>	<b>240</b>



# ***Introduction***

La sédentarisation des modes de vie actuels alliée à l'abondance d'aliments riches en lipides, en glucides et pauvres en fibres ont conduit à l'augmentation considérable de différentes pathologies (obésité, diabète, hypertension, accident cardiovasculaire...). Afin de lutter contre ce problème de santé publique, les autorités françaises ont mis en place depuis 2001 le Programme National Nutrition Santé (PNNS). Suite aux recommandations de ce programme, les industriels de l'agroalimentaire ont essayé d'améliorer la qualité nutritionnelle de leurs produits en réduisant les teneurs en sucre, en sel et en matière grasse tout en maintenant une bonne acceptabilité pour le consommateur.

La réduction de ces composés dans les aliments peut poser des problèmes de conservation, de process et /ou d'acceptabilité par le consommateur. Dans ce cadre, plusieurs études se sont penchées sur la réduction du sel (Hellemann, 1992, Lawrence et al., 2011), du sucre (Clark et Lawless, 1994, Hort et Hollowood, 2004) et du gras (Frost et al., 2001, Yackinous et al., 2000, Pinero, 2008). Une répartition hétérogène des composés sapides (Mosca et al., 2012) ou encore l'utilisation de composés d'arôme congruents avec la saveur induite par le composé sapide à réduire ont été proposées comme stratégie opérationnelle pour la réduction en sel et en sucre (Frank et Byram, 1988, Lawrence et al., 2011). La substitution du gras est plus complexe car sa perception implique différentes modalités sensorielles telles que la gustation, l'olfaction et le toucher (Frost et al., 2001, Mattes, 2009). Aussi, différentes solutions ont été envisagées pour compenser une réduction de teneur en matière grasse. Du gel de Konjac a été utilisé avec succès dans des saucisses de Frankfort (Jiménez-Colmenero et al., 2010). Des fibres ont été utilisées dans d'autres matrices (confiserie, steak haché) (Hadnadev et al. 2014) et l'utilisation d'arômes a été proposée dans des purées ou des chips (Yackinous et al., 2000, Pinero, 2008). Cependant, ces travaux méritent d'être complétés pour mieux comprendre la perception du gras et pouvoir à terme, proposer des solutions de substitutions plus adaptées.

Dans ce contexte, le projet « QualigrasPhy », financé par l'institut Carnot Qualiment, vise à explorer les mécanismes impliqués dans la perception du gras, que ce soit au niveau de l'olfaction, de la gustation ou des sensations tactiles en bouche au moyen d'une démarche pluridisciplinaire à différentes échelles.

Ce projet a rassemblé 3 laboratoires publics et 1 centre de transfert agroalimentaire. Les 4 principaux objectifs du projet « QualigrasPhy » étaient les suivants :

- Au niveau du produit, évaluer l'impact de la structure de la matrice et de la teneur, la nature et le mode de cristallisation de la matière grasse sur la libération des molécules de la flaveur dans la bouche
- Au niveau physiologique, mesurer les interactions arôme-salive-muqueuse en fonction du produit, de sa composition et de la physiologie des individus, étudier les paramètres de

libération des arômes in vivo, et tenter de relier les profils de préférence à certaines caractéristiques phénotypiques et génétiques

- Au niveau cognitif, évaluer le poids respectif des composantes gustative et olfactive dans la perception globale du gras et explorer les interactions entre différentes modalités sensorielles en fonction des individus et des produits
- Au niveau mécanique, approfondir les connaissances sur les interactions entre les odorants et les cibles biologiques impliquées dans la détection des signaux (protéines présentes dans la salive et le mucus, récepteurs olfactifs).

Mon travail de thèse s'est inscrit dans les trois premiers points de ce projet et avait pour objectif **de contribuer à la compréhension de la perception du gras au travers de l'étude de la variabilité interindividuelle de la perception du gras et de la recherche de son origine.**

Pour cela, une approche pluridisciplinaire mêlant physico-chimie de molécules aromatiques à connotation grasse, physiologie orale des sujets, processus en bouche et perception sensorielle au cours de la consommation a été mise en place. Une attention toute particulière a été portée sur la composante olfactive de la perception du gras et en particulier sur la potentielle contribution des métabolites produits dans la cavité nasale de l'Homme à partir de composés volatils odorants.

Ce document débute par une présentation du contexte scientifique qui aboutit à la présentation des objectifs détaillés du travail et des choix méthodologiques. Ensuite, les travaux effectués sont relatés dans deux chapitres (chapitres 2 et 3). Une dernière partie de conclusion et perspectives termine le manuscrit.

Ce travail de thèse a fait l'objet des publications et communications suivantes :

**Article dans des périodiques soumis à comité de lecture :**

Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Heydel, JM., Faure, P., Le Quéré, JL. (2016). Real time monitoring of the metabolic capacity of ex-vivo rat olfactory mucosa by Proton Transfert Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(6), 1539-1543.

Schoumacker, R., Martin, C., Thomas Danguin,T., Guichard,E., Le Quéré, JL., Labouré, H. (2016). Fat perception in cottage cheese: the contribution of aroma and tasting temperature. *Food Quality and Preference*, in press. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.04.003>.



Schoumacker, R., Martin, C., Bourjade, D., Thomas Danguin, T., Guichard, E., Le Quéré, J.L., Labouré, H. Impact of fat content and tasting temperature on sensory characteristics of cottage cheese. *Dairy Science and Technology*, in press. DOI 10.1007/s13594-016-0301-6.

Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Sémon, E., Guichard, E., Le Quéré, J.L., Faure, P., Heydel, J.M. *Ex-vivo* real-time monitoring of volatile metabolites resulting from odorant nasal metabolism. En cours de rédaction.

#### **Communications orales et affichées :**

**Août 2014** IMSC (International Mass Spectrometry Conference) – Genève, Poster exposé : “Real time monitoring of the metabolic capacity of *ex vivo* rat olfactory mucosa by PTR-MS” Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Heydel, J.M., Faure, P., Le Quéré, J.L.

**Juin 2015** Journée des doctorants – Dijon, Communication orale : “Si vous n’aimez pas le gras, pincez-vous le nez à froid” Schoumacker, R., Martin, C., Thomas Danguin, T., Guichard, E., Le Quéré, J.L., Labouré, H.

**Juin 2015** FJC (Forum des jeunes chercheurs) – Dijon, Poster exposé : “Real time monitoring of the metabolic capacity of *ex vivo* rat olfactory mucosa by PTR-MS” Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Heydel, J.M., Faure, P., Le Quéré, J.L.

**Août 2015** Pangborn (Pangborn Sensory Science Symposium) – Gotheborg, Poster exposé : “Perception thresholds for fat in cottage cheese: inter-individual variability, aroma contribution and impact of tasting temperature” Schoumacker, R., Martin, C., Thomas Danguin, T., Guichard, E., Le Quéré, J.L., Labouré, H.

**Septembre 2015** SFSM (Société Française de Spectrométrie de Masse) – Ajaccio, Poster exposé : “Real time monitoring of the metabolic capacity of *ex vivo* rat olfactory mucosa by on-line PTR-MS” Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Sémon, E., Heydel, J.M., Faure, P., Le Quéré, J.L.

**Février 2016** PTR-MS Conference – Obergurgl, Communication orale : “Aroma volatile metabolites at olfactory mucosa level evidenced by *in vitro* PTR-ToF-MS studies” Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Sémon, E., Heydel, J.M., Faure, P., Le Quéré, J.L.

**Mai 2016** Olfaction and Issues – Milan, Poster exposé : « Real time monitoring of the metabolic capacity of *ex-vivo* rat olfactory mucosa by on-line PTR-MS” Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Sémon, E., Heydel, J.M., Faure, P., Le Quéré, J.L.

**Juin 2016** FJC (Forum des jeunes chercheurs) – Besançon, Communication orale : “Inter-individual variability of fat perception in cottage cheese” Schoumacker, R., Martin, C., Thomas Danguin, T., Guichard, E., Le Quéré, J.L., Labouré, H.

**Juin 2016** Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology – Eisenach, Communication orale : “Aroma volatile metabolites at olfactory mucosa level evidenced by *in vitro* and *in vivo* PTR-ToF-MS studies” Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Sémon, E., Heydel, J.M., Faure, P., Le Quéré, J.L.

Septembre 2016 ECRO 2016 – Athènes, Poster exposé : “Aroma volatile odorous metabolites at olfactory mucosa level evidenced by ex vivo and in vivo PTR-MS studies” Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Sémon, E., Guichard, E., Heydel, JM., Faure, P., Le Quéré, JL.

Septembre 2016 Eurosens – Dijon, Poster exposé : “Inter-individual variability of fat perception in cottage cheese” Schoumacker, R., Martin, C., Thomas Danguin, T., Guichard, E., Le Quéré, JL., Labouré, H.



## ***Chapitre 1 : Etat de l'art***

Pour comprendre **la perception du gras au travers de l'étude de la variabilité interindividuelle de cette perception et de la recherche de son origine**, il est nécessaire de bien définir la notion de gras et les mécanismes de sa perception.

Un objectif à long terme de ce travail est de réduire la teneur en matière grasse dans les aliments sans en modifier l'acceptabilité par le consommateur. Avant de traiter les mécanismes impliqués dans la perception du gras, nous ferons un bilan des connaissances sur la détection et la discrimination de la matière grasse dans les produits modèles et/ou dans des aliments de consommation courante.

La perception sensorielle d'un aliment résulte de l'intégration par le cerveau de l'ensemble des sensations générées par les différents stimuli induits par la consommation de l'aliment. En plus des stimulations visuelles et auditives non abordées dans cette thèse, sont impliquées (1) les stimulations gustatives via les composés sapides, (2) les stimulations olfactives à partir des composés d'arôme volatils et (3) les stimulations somesthésiques provenant de la texture de l'aliment. Nous étudierons donc le fonctionnement de ces systèmes sensoriels.

Bien que ces trois modalités sensorielles soient prises en compte, ce travail de thèse est principalement axé sur l'olfaction. En effet, sa contribution à la perception globale peut être facilement étudiée en la supprimant par l'intermédiaire d'un pince-nez. Pour comprendre la perception olfactive, il est primordial d'étudier la libération des arômes. En effet, pour être perçus, les composés d'arôme contenus dans l'aliment devront être libérés pour atteindre les récepteurs olfactifs. De ce fait, un bilan méthodologique présentera les différentes stratégies permettant de mesurer, de quantifier et d'identifier les composés odorants au sein d'une matrice alimentaire mais aussi dans l'haleine de l'Homme.

Plusieurs auteurs ont cherché à établir des relations entre la libération des composés d'arôme *in vivo* et la perception. Ce lien n'est pas bien compris en particulier en raison de l'importante variabilité entre les individus mais aussi entre les produits étudiés. Dans ce contexte, l'objectif a été de faire le point sur les travaux qui visent à étudier l'impact des propriétés des aliments et des paramètres physiologiques des sujets sur la libération aromatique.

Après avoir établi le rôle de l'olfaction dans la perception du gras, nous ferons un point sur les études portant sur la réduction du gras par ajout d'un arôme sans pour autant impacter la perception sensorielle. Enfin, comme la perception du gras est multisensorielle, nous ferons également le point sur les autres stratégies de réduction de la teneur en matière grasse.

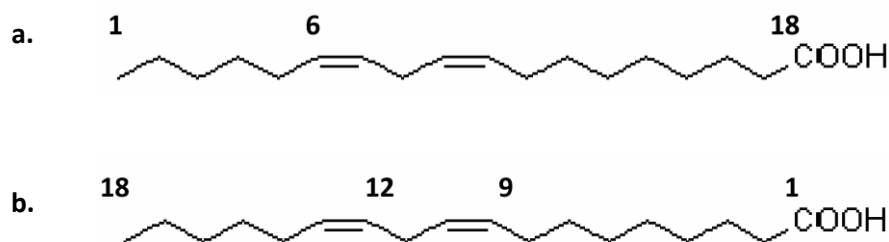
## 1. Les lipides et les graisses dans les aliments

Ce premier paragraphe de l'état de l'art présente les principaux lipides présents dans les matrices alimentaires. La classification des lipides dépend de plusieurs paramètres qui sont : leurs propriétés physiques à température ambiante, leur polarité, leur caractère essentiel ou non d'un point de vue nutritionnel et leur structure. L'unité de base de la structure d'un lipide est l'acide gras.

### 1.1. Acides gras (AG)

Les acides gras sont constitués d'une chaîne d'atomes de carbone (souvent entre 4 et 24) avec une fonction carboxyle à une extrémité de la chaîne et une fonction méthyle à l'autre extrémité. La chaîne de carbone peut être composée d'une ou plusieurs insaturations. Ainsi, les acides gras sont soit saturés (AGS) soit insaturés. Les acides gras insaturés se distinguent en deux classes : les acides gras monoinsaturés (AGMI) et les acides gras polyinsaturés (AGPI). La partie hydrophobe de l'acide gras porte le groupement méthyle en fin de chaîne. La partie hydrophile provient quant à elle du groupement carboxyle.

Bien qu'une nomenclature des lipides aient été mise en place, il existe encore une discordance entre biologistes et chimistes. Alors que les biologistes partent de la fonction méthyle pour numéroter les atomes de carbones (Figure 1a), les chimistes commencent par la fonction carboxyle (Figure 1b).



**Figure 1 : a. Nomenclature utilisée par les biologistes. Exemple de l'acide linoléique 18 :2n-6 ou  $\omega$ 6 et b. Nomenclature utilisée par les chimistes. Exemple de l'acide linoléique 18 : $\Delta$ 9c, 12c.**

La classification des acides gras se fait selon la longueur de leur chaîne carbonée. Les acides gras à courte chaîne (AGCC) ne contiennent que 4 à 8 atomes de carbone. Par exemple, les acides butyriques (4 atomes de carbone) et caproïque (6 atomes de carbone) présents respectivement dans le lait de vache et de chèvre font partie de cette famille. Les acides gras possédant entre 10 et 14 atomes de carbone représentent la famille des acides gras à moyenne chaîne (AGMC). Les plus connus sont les acides laurique et myristique (12 et 16 atomes de carbone respectivement). Les acides gras qui sont composés de 16 atomes de carbone ou plus sont intégrés dans la famille des

acides gras à longue chaîne (AGLC). C'est par exemple le cas des acides palmitique, stéarique et oléique (16, 18 et 18 atomes de carbone respectivement).

## 1.2. Triglycérides

La majorité des lipides présents dans les aliments sont sous forme de triglycérides (95 à 98%). Un triglycéride est composé d'une molécule de glycérol dans laquelle chacun des trois groupements hydroxyles est estérifié par un acide gras. Les trois acides gras peuvent être identiques ou différents. La structure et donc les propriétés d'un triglycéride (biodisponibilité par exemple) dépendent de la position des différents acides gras sur le glycérol (Figure 2).

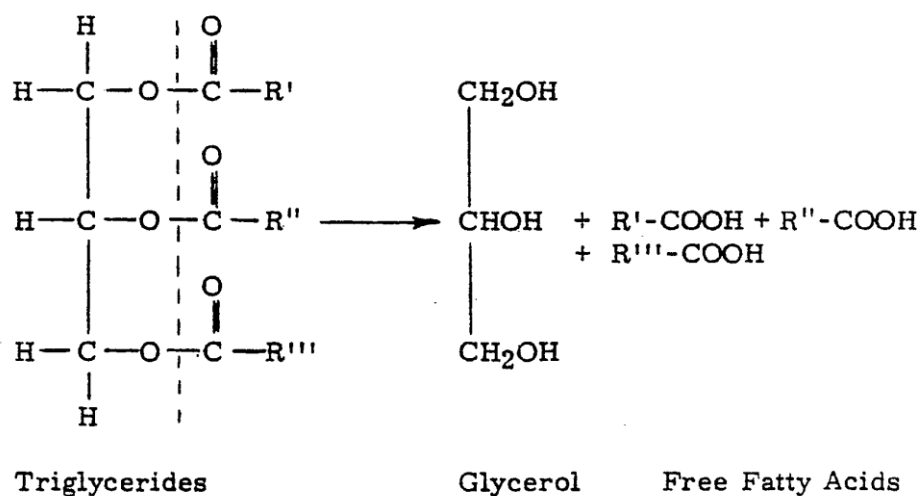


Figure 2 : Structure d'un triglycéride.

## 1.3. Phospholipides

Les phospholipides sont également présents au sein des produits alimentaires. Ils sont composés d'une molécule de glycérol dont deux fonctions alcool sont estérifiées par un acide gras et la troisième par une molécule d'acide phosphorique elle-même associée à une amine ou à un sucre. Cette composition particulière rend les phospholipides amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils sont à la fois lipophile (chaîne hydrophobe des acides gras) et hydrophile (partie polaire des sucres).

## 2. Détection et discrimination de la matière grasse dans les aliments

La capacité de l'homme à détecter le gras dans des produits alimentaires et à discriminer des produits alimentaires à différentes teneurs en matière grasse a très peu été étudiée. La majorité des

études ont porté sur la sensibilité aux acides gras en solution (Schiffman et al., 1998, Poette et al., 2013, Tucker et al., 2013, Zahn et al., 2013). Bien que ces études ne soient pas comparables à celles effectuées sur des produits alimentaires, elles apportent tout de même des informations concernant la variabilité interindividuelle de la sensibilité au gras. A titre d'exemple, le seuil de détection moyen du gras dans des émulsions (huile de soja et huile minérale) est de 5,3% de matière grasse pour les sujets les plus jeunes (23 ans en moyenne) contre 15,8% de matière grasse pour les sujets les plus âgés (87 ans en moyenne) (Schiffman et al., 1998). Cet effet âge relativement important dans cette étude, n'a pas été retrouvé dans les travaux de Tucker et al. (2013) visant à mesurer le seuil de détection de l'acide oléique en solution. Dans l'étude de Poette et al. (2013), les auteurs ont mis en évidence une augmentation des seuils de détection de l'acide oléique en émulsion lorsque les sujets portaient un pince-nez. En d'autres termes, les auteurs montrent la contribution de l'olfaction dans la détection de la matière grasse. Par ailleurs, la mesure de ces seuils a permis d'identifier des sujets hypo et hyper sensibles à l'acide oléique (Stewart, et al., 2010, Stewart, Newman, & Keast, 2011). Par contre, l'origine de cette différence de sensibilité à l'acide oléique n'est pas connue.

Seules quelques études ont été menées sur des produits alimentaires (Drewnowski et al., 1989, Hopper et al., 2012, Le Calve et al., 2015). Le Calve et al. (2015) ont mis en évidence l'influence de la matrice alimentaire sur la discrimination sensorielle du gras. En effet, l'étude montre que la teneur en matière grasse des produits peu visqueux (émulsion à 10% de matière grasse et sauce blanche à 15% de matière grasse) pourrait être réduite de 50% sans impacter la perception du gras. Au contraire, une différence de 1,75% de matière grasse dans un produit plus visqueux comme le yaourt a été perçue comme étant significative (Le Calve et al., 2015). En travaillant sur d'autres types de produits, Drewnowski et al. (1989) ont constaté que les individus sont capables de détecter des teneurs en matière grasse croissantes (1, 4, 12 et 36% de matière grasse) dans les matrices liquides (différents types de laits) mais pas dans les matrices semi-solides (fromage blanc et fromage crémeux, 1, 4, 12 et 36% de matière grasse), et ce, malgré des notes hédoniques plus élevées pour les produits plus gras. Le niveau de matière grasse choisi comme échantillon de référence ne semble pas impacter le seuil de discrimination du gras (Hoppert et al., 2012). En effet, plusieurs produits ont été choisis comme référence (5%, 15% puis 25% de matière grasse) pour calculer le seuil de discrimination du gras des produits à 1, 5, 10, 15, 20, 25 et 29% de matière grasse.

La capacité de l'homme à détecter la matière grasse et discriminer différents niveaux de matière grasse dans les aliments est peu décrite dans la littérature comparée à celle des saveurs fondamentales. Cette absence peut se justifier par la difficulté à formuler un aliment à différents niveaux de matière grasse. De plus, il a été montré que la perception du gras est multimodale, faisant intervenir l'olfaction, la gustation et les sensations tactiles en bouche (Mattes, 2009). Ceci rend



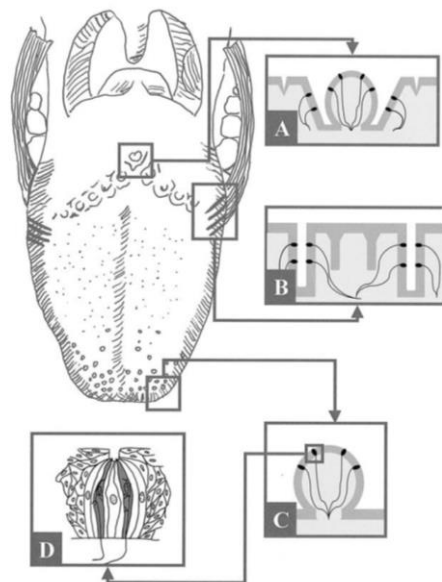
l'étude de la perception du gras plus complexe. Pour mieux comprendre le fonctionnement de la perception du gras dans les aliments, la suite de ce chapitre présentera ces trois modalités sensorielles.

### 3. Modalités de perception de la flaveur

#### 3.1. Composantes sapides dans la perception

##### 3.1.1. Perception des composés non volatils

Les stimuli sapides présents dans les aliments sont détectés au niveau des récepteurs gustatifs localisés dans la cavité buccale. Il existe chez l'Homme 5 saveurs fondamentales : l'acide, l'amer, le sucré, le salé et l'umami (Lindemann, 2001). L'umami est un terme japonais qui signifie délicieux. Cette saveur est générée par des acides aminés tels que le L-glutamate. Le glutamate monosodique, est couramment utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, comme exhausteur de goût. Les seuils de perception pour les différentes saveurs sont très variables. Par exemple, la sensibilité aux sucres naturels est relativement haute (le seuil de perception du saccharose est de 25-50 mM) contrairement à celle des molécules amères (le seuil de perception de la quinine est de 8  $\mu$ M).

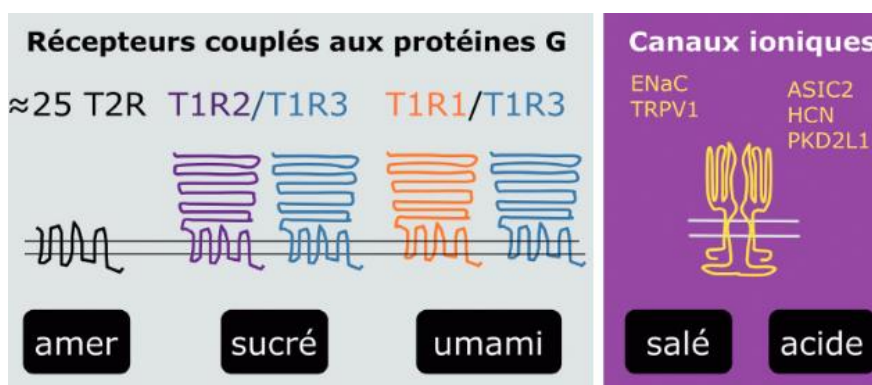


**Figure 3 : Répartition des papilles sur la muqueuse linguale. Le bourgeon gustatif (D) est l'organe récepteur du goût. Il est porté en plusieurs exemplaires par les papilles caliciformes (A), les papilles foliées (B) et par les papilles fongiformes (C). D'après Kettaneh et al., 2002.**

C'est au niveau des cellules sensorielles des bourgeons du goût qui se trouvent sur la langue et le voile du palais que les saveurs sont perçues. Sur la langue, ces bourgeons sont portés par des papilles

gustatives (Figure 3). Les papilles fongiformes situées sur le tiers antérieur de la langue, les papilles foliées situées sur les côtés de la langue et les papilles caliciformes qui forment le V lingual à l'arrière de la langue sont les papilles qui interviennent dans la perception des saveurs et qui possèdent donc des bourgeons du goût (Kettaneh et al., 2002). Les papilles filiformes, dépourvues de bourgeons sont les plus nombreuses.

A la surface des cellules gustatives présentes dans les bourgeons du goût, se trouvent deux types de récepteurs : les canaux ioniques qui permettent la détection des composés salés et acides et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui permettent la perception du sucré, de l'amer et de l'umami (Figure 4).



**Figure 4 : Récepteurs gustatifs impliqués dans la perception des différents saveurs (Maitrepierre et al., 2011).**

En ce qui concerne la perception du sucré et de l'umami, les premiers récepteurs identifiés appartiennent à la famille des gènes T1R (Hoon et al., 1999). Le gène T1R1 est principalement exprimé dans les papilles fongiformes, sur la partie antérieure de la langue tandis que le gène T1R2 est exprimé majoritairement sur la partie postérieure de la langue. La présence d'un troisième gène (T1R3) a également été montrée. Chaque récepteur est composé de deux sous-unités formant un hétérodimère. Les molécules sucrées sont perçues par le couple de récepteurs T1R2/T1R3 et le goût umami par le couple T1R1/T1R3. Ces récepteurs ont la particularité de posséder un domaine N-terminal extracellulaire de grande taille constitué de deux lobes formant une structure tridimensionnelle nommée « piège à mouche ». La détection des composés responsables de la saveur amère repose quant à elle sur une trentaine de récepteurs de la famille T2R (Adler et al., 2000).

Les stimuli gustatifs salés et acides quant à eux interagissent directement avec les canaux ioniques, c'est-à-dire des protéines membranaires qui laissent entrer ou sortir les ions  $H^+$  et  $Na^+$  de la cellule. Pour le salé, l'entrée dans la cellule gustative des ions  $Na^+$  déclenche la transduction du signal. Enfin,

la perception du goût acide est directement liée à la détection des protons  $H^+$ . Il semblerait que les récepteurs impliqués soient des canaux ioniques qui s'ouvrent suite à l'hyperpolarisation de la membrane.

### 3.1.2. Les 5 saveurs et ... le goût du gras ?

On identifiait jusqu'à présent cinq saveurs fondamentales : le sucré, le salé, l'amer, l'acide et l'umami. Des chercheurs affirment désormais que le gras serait une saveur à part entière distincte des cinq autres. Néanmoins, le consensus sur les critères d'appartenance à une saveur primaire fait défaut. Selon certains scientifiques, pour être considérée comme une saveur primaire, une saveur doit : 1) être induite par une classe chimique spécifique, 2) activer des récepteurs du goût spécifiques, 3) être détectée par le nerf gustatif et traitée dans le centre du goût, 4) posséder une qualité sans chevauchement avec les autres saveurs et 5) provoquer une réponse comportementale ou physiologique (Kurihara et Kashiwayanagi, 1998, Mattes 2011). A ce jour, aucun récepteur aux triglycérides, forme prédominante des lipides dans notre alimentation, n'a été identifié (Mattes, 2011). Il a cependant été montré que les acides gras respectaient les critères 3 et 5 (Gilbertson et Khan, 2014, Tucker et al., 2014, Running et Mattes 2015a). Cependant, la documentation indiquant que l'exposition aux AG provoque une sensation perceptible unique est rare. En 2010, Pittman montre chez le rongeur que l'aversion provoquée aux acides gras à longue chaîne ne se généralise pas aux autres saveurs. En travaillant sur le même modèle animal, Kawai et al., 2003 ont indiqué une perte de préférence pour les triglycérides en présence d'un inhibiteur de la lipase linguale suggérant que les AG libres joueraient un rôle important dans la détection orosensorielle du gras.

Des études ont décrit le récepteur CD36 comme étant un récepteur spécifique du transport des acides gras à longue chaîne chez le rat (Fukuwatari et al., 1997) et la souris (Laugerette et al., 2005). Ce récepteur, peu exprimé dans les papilles fongiformes est très présent dans les papilles caliciformes et foliées de la langue du rat (Fukuwatari et al., 1997, Laugerette et al., 2005). Deux autres récepteurs de la famille des GPCR (GPR 120 et GPR 40) exprimés dans l'épithélium gustatif de la langue de souris, pourraient être impliqués dans la perception de la matière grasse. En effet, les souris knock-out dépourvues de ces récepteurs ont présenté moins de préférence pour les acides oléique et linoléique (Cartoni et al., 2010). Cependant, l'étude de Martin et al. (2011) n'a pas confirmé le rôle des GPR 40 dans la perception du gras chez la souris. Une des hypothèses serait l'existence d'un système gustatif spécifique permettant la détection des AG libres à longue chaîne. La préférence pour les saveurs amère et sucré n'ont pas été modifiées chez les souris CD36 -/-

(Laugerette et al., 2005). Les récepteurs CD36 ne seraient donc pas impliqués dans la détection de l'amère et du sucré. De façon similaire, les préférences pour le salé, l'umami, l'acide et le sucré sont restées inchangées chez les souris GPR120 -/- (Cartoni et al., 2010). Les récepteurs GPR120 ne seraient donc pas impliqués dans la détection du salé, de l'umami, de l'acide et du sucré. Concernant la détection des AG libres à courte et moyenne chaîne, des auteurs ont suggéré l'implication des récepteurs GPCR 41 et 43 (Mattes, 2009).

Chez l'homme, les papilles fongiformes interviendraient à la fois dans la perception des stimuli gustatifs et somesthésiques. Le nombre de ces papilles a un effet significatif sur l'évaluation des seuils d'intensité de matière grasse du lait ou d'un mélange lait/crème (Nachtsheim et Schlich, 2014, Nachtsheim et Schlich, 2013). Par ailleurs, Galindo et al. (2011) ont identifié des récepteurs aux AG libres dans les bourgeons du goût des papilles fongiformes. Ce résultat laisse supposer une relation directe entre la quantité de récepteurs aux AG libres et la sensibilité au gras. Deux récepteurs étudiés dans le modèle animal ont été retrouvés chez l'homme : CD36 et GPR 120. Le récepteur CD36 a été localisé dans les papilles caliciformes et foliées (Simons et al., 2011). Pepino et al. (2012) ont mis en évidence le rôle de ce récepteur dans la perception gustative du gras. En effet, les sujets ayant une plus forte expression du récepteur CD36 possèdent des seuils de sensibilité à l'acide oléique plus faibles. Le récepteur GPR 120 quant à lui, a été identifié dans l'ARNm et les protéines des bourgeons du goût par Galindo et al. (2011) mais son implication dans la perception gustative du gras n'a pas été démontrée.

Chalé Rush (2007) a mesuré des seuils de détection des acides gras libres (oléique, linoléique et stéarique) en testant différents signaux sensoriels : le goût, l'olfaction par voie orthonasale et l'olfaction par voie rétronasale. La suppression de l'intégralité du système sensoriel olfactif par le port d'un pince-nez a conduit à la perception des AG libres, laissant supposer une contribution du goût et une contribution tactile dans la perception des AG libres. En 2010, Stewart et al. ont repris cette hypothèse en montrant une forte corrélation entre la sensibilité aux AG oléique et linoléique, suggérant un mécanisme de détection commun. Récemment, Running et al. (2015b) ont montré via un panel de dégustateurs, que l'Homme est capable de distinguer des solutions d'AG libres à longue chaîne de solutions contenant d'autres molécules sapides. Les sujets portaient un pince-nez pour qu'aucun arôme ne puisse interférer. Les échantillons étaient présentés dans des coupelles opaques et leur viscosité était similaire. Le goût était donc l'unique sens à disposition des panélistes. Les résultats ont montré que les panélistes distinguent le sucré, le salé et l'acide mais que des confusions existent entre les solutions d'umami et des solutions d'AG libres à longue chaîne. D'après les auteurs le manque de familiarité des sujets avec la saveur umami plus que la ressemblance entre les deux saveurs serait à l'origine de cette confusion.

Bien que la présence et le rôle des récepteurs aux AG dans la perception gustative aient été mis en évidence chez l'animal, le sujet reste très controversé chez l'Homme. En effet, de potentiels récepteurs aux acides gras ont été identifiés sur la langue humaine mais leur rôle n'est pas encore bien défini. De plus, certains critères d'appartenance à une saveur primaire sont peu décrits dans la littérature. Des études complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ou non le gras comme une sixième saveur primaire.

### 3.2. Composante somesthésique (tactile et thermique) dans la perception

La texture d'un aliment est un élément clef à l'origine des sensations tactiles en bouche. Elle résulte de la structure initiale de l'aliment mais également de la manière dont il va se déstructurer au cours de la consommation. En effet, au cours de la consommation, la structure du produit est modifiée par l'action des dents, de la langue et de la salive. La perception de la texture est donc un phénomène dynamique. Elle résulte de la combinaison de deux mécanismes (Cardello, 1996): la composante tactile par contact entre l'aliment et les tissus de la bouche (langue, joues, dents, gencives....) et la composante kinesthésique provenant de la force nécessaire pour manipuler et déstructurer le produit en bouche.

La perception de la texture via la composante tactile peut également intervenir après déglutition du produit. En effet, après déglutition, des résidus alimentaires peuvent être retenus dans la cavité orale et forment alors ce que nous appellerons le tapissage oral. La texture d'un aliment, due à sa composition et aux propriétés physico-chimiques de ses constituants, pourrait donc avoir un impact sur le tapissage en bouche. Le tapissage oral est connu pour influencer la perception des sensations résiduelles induites par la consommation d'un aliment qui peuvent être de nature gustative ou tactiles (Ahn et al., 2002, Madrigal-Galan et al., 2006, De Wijk et al., 2009, Camacho et al., 2015). Dans l'étude de Ahn et al. (2002), les sujets devaient évaluer l'intensité de la saveur sucrée d'une solution de saccharose immédiatement après avoir consommé du coca, du lait entier ou de l'eau. L'intensité de la saveur sucrée de la solution de saccharose a été jugée moins importante après la consommation du coca et du lait entier qu'après celle de l'eau. Le rinçage de la bouche par du coca retarde la perception de la saveur sucrée, par rapport aux autres produits de rinçage. D'après les auteurs, cette perception de sucré peut s'expliquer par la présence d'un film résiduel sucré dans la cavité buccale après déglutition du coca. La présence de ce film résiduel, plus persistant que celui de l'eau, serait à l'origine de la diminution de l'intensité sucrée perçue. Concernant le lait, le rinçage pourrait laisser un film résiduel lié au gras qui serait à l'origine de la diminution de l'intensité sucrée

perçue. Par analogie entre la sensation sucrée et la sensation de gras, nous pouvons donc supposer qu'un film résiduel en bouche pourrait moduler la perception du gras.

La perception des sensations résiduelles en bouche qui résulte du tapissage dépend aussi de la fermeté du produit (Camacho et al., 2015). En effet, la formation du film oral tapissant la bouche (et son nettoyage) pourrait dépendre de la composition de l'aliment (type et niveau de matière grasse, protéine, glucides), de ses propriétés physico-chimiques (propriétés rhéologiques, pH) et de la morphologie de la langue (Ahn et al., 2002, Madrigal-Galan et al., 2006, De Wijk et al., 2009, Camacho et al., 2015). A titre d'exemple, il a été montré que le nettoyage du film résiduel induit par la consommation d'une émulsion huile/eau a été plus rapide lorsque l'émulsion était stabilisée avec du caséinate de sodium qu'avec des lysozymes. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de caséinate de sodium a facilité l'élimination du tapissage oral.

La composante somesthésique interviendrait aussi dans la perception du gras. L'étude de De Wijk et al. (2006) a mis en évidence l'augmentation de la perception du gras de crèmes desserts lorsque le tapissage en bouche augmentait. Ce tapissage serait davantage influencé par le process en bouche que par la déglutition. Ainsi, une plus forte activité mécanique réduirait la viscosité des produits et la quantité de résidus dans la bouche (De Wijk et al., 2006).

Enfin, la température de consommation du produit peut intervenir dans la perception des sensations somesthésiques soit directement en modifiant la viscosité des produits par exemple soit indirectement en modulant la libération des composés d'arôme qui peuvent être associés à des composantes tactiles (crémeux). Dans l'étude menée par Engelen et al. (2003), l'augmentation de la température d'un aliment a entraîné une augmentation de la perception des attributs de flaveur (vanille, crémeux) dans des crèmes desserts peu grasses. En effet, l'élévation de la température augmenterait la volatilité des molécules aromatiques qui seraient alors présentes en plus grande concentration au niveau des récepteurs de la cavité nasale. L'augmentation de la température pourrait aussi diminuer la viscosité des produits facilitant ainsi la libération des composés. Cette différence de viscosité a d'ailleurs été perçue par les sujets.

Bien que la texture intervienne dans la perception du gras, la composante tactile intervenant après déglutition reste peu étudiée. Or, le film résiduel en bouche qui dépend de la composition et de la fermeté du produit pourrait moduler la perception du gras. Enfin, la température interviendrait aussi dans la perception du gras en favorisant la libération aromatique et en réduisant la viscosité des produits.

### 3.3. Composante olfactive dans la perception

#### 3.3.1. Fonctionnement du système olfactif

L'olfaction est un sens particulièrement important chez l'Homme. Il lui permet de percevoir les substances volatiles odorantes de faible poids moléculaire (entre 30 et 300 Da) présentes dans son environnement. Ces composés volatils organiques appartiennent à différentes classes chimiques (alcools, acides, esters) et présentent des seuils de perception variables sur une large gamme (au moins  $10^6$ ). Par exemple dans les vins, le seuil de perception du 2-phenylethanol est de 14 mg/L alors que le seuil de perception du 2,4,6-trichloroanisole (responsable du goût de bouchon) est de 1,5 ng/L. Face à un produit, l'odorat permet de distinguer les substances potentiellement dangereuses. Cette distinction a lieu grâce à la voie directe dite également orthonasale donc par inhalation des composés odorants du milieu extérieur vers la cavité nasale (Figure 5). Au cours de la consommation alimentaire, la perception olfactive fait intervenir une seconde voie, indirecte, la voie rétronasale, qui permet aux stimuli volatils libérés en bouche de remonter les voies respiratoires pour atteindre la cavité nasale (Figure 5) (Buettner et al., 2002). C'est donc la combinaison de ces deux voies qui intervient dans la perception olfactive des aliments.

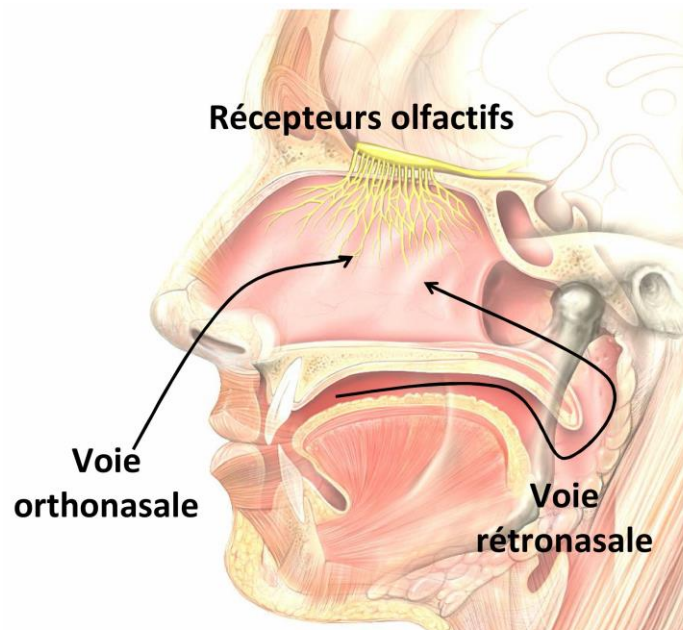
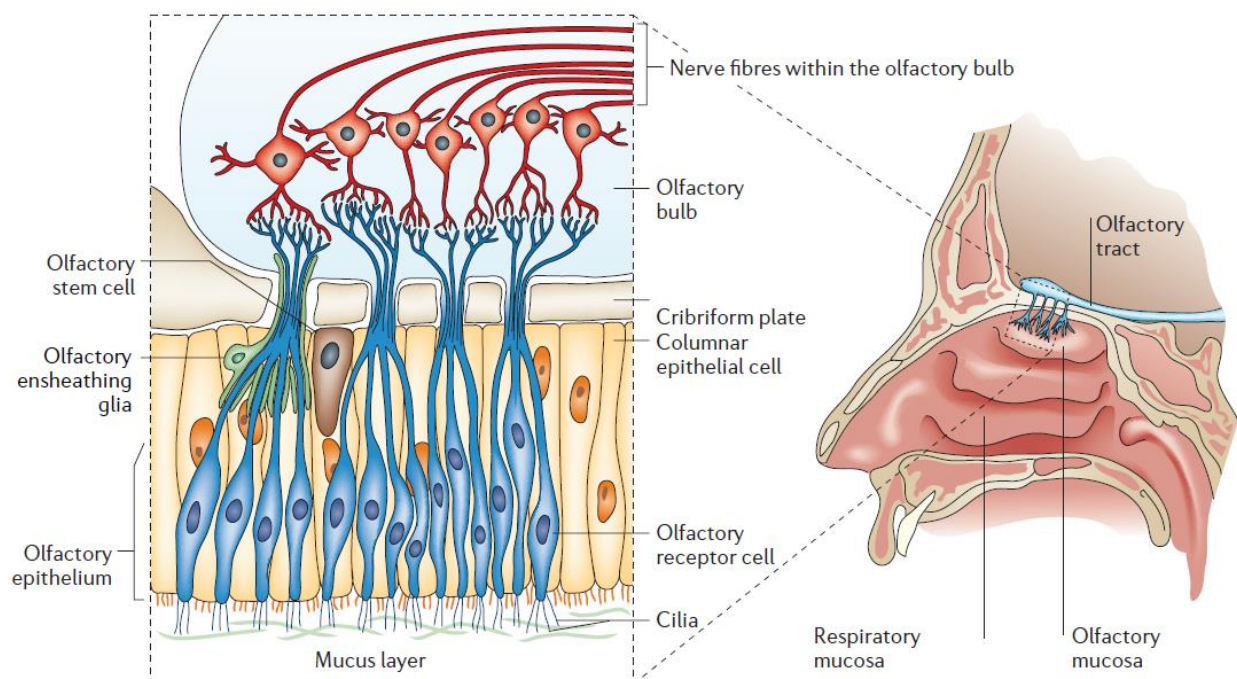


Figure 5 : Représentation des voies orthonasale et rétronasale intervenant dans la perception des composés d'arômes. Les récepteurs olfactifs représentés sur ce schéma, se situent dans la muqueuse olfactive.

Les mécanismes périphériques de la physiologie de l'olfaction ont lieu dans la muqueuse olfactive (Figure 6). Elle tapisse les fosses nasales de l'homme sur une surface de 2 à 3 cm<sup>2</sup> (Guerrier et Uziel, 1983) et se compose de deux couches cellulaires distincts : un épithélium olfactif et un tissu connectif plus fin appelé la sous-muqueuse (ou lamina propria). L'épithélium olfactif contient trois

types de cellules majeurs : les neurones sensoriels, les cellules de soutien (cellules sustentaculaires) qui séparent et enveloppent les neurones et les cellules basales qui régénèrent les neurones. Les neurones sensoriels représentent 60 à 80% des cellules de l'épithélium olfactif. Il s'agit de neurones bipolaires dont les axones se rejoignent dans la sous-muqueuse pour former les nerfs olfactifs. Les faisceaux nerveux traversent ensuite la boîte crânienne pour se projeter dans le bulbe olfactif. A l'opposé, le prolongement périphérique dendritique se termine en cils mobiles portant les récepteurs olfactifs qui baignent dans l'épaisse couche de mucus (Buck et Axel, 2004). La mise en contact d'une molécule volatile odorante avec un récepteur olfactif entraîne une cascade de réactions qui aboutit à l'information olfactive (Figure 6).



**Figure 6 : Muqueuse olfactive, localisation et structure (Reproduction d'après Thuret et al., 2006).**

L'olfaction est un système sensoriel constamment mis à contribution au cours de la consommation alimentaire et permet, entre autre, de distinguer, sans les voir, différents types d'aliments ou un même aliment avec des compositions différentes. L'étude de Boesveldt et al. (2014) par exemple a montré que l'homme est capable de discriminer le lait à 0,125% de matière grasse de celui à 2,8% de matière grasse en se basant uniquement sur l'odorat, démontrant ainsi l'implication du système olfactif par la voie orthonasale dans la perception du gras. La voie rétronasale peut également être impliquée dans la perception du gras. En effet, certaines molécules composant la matière grasse sont volatiles et odorantes. La matière grasse peut donc directement agir sur la composition aromatique de la matrice. Par ailleurs, la teneur en matière grasse peut modifier le coefficient de partage des composés d'arôme entre l'aliment et l'air, et par conséquent la nature et la quantité des molécules



présentes au niveau des récepteurs olfactifs. La teneur en matière grasse peut aussi modifier la texture d'un aliment qui va elle-même être impliquée dans la perception du gras en modulant la libération des composés d'arôme perçus par la voie rétronasale, point qui sera abordé dans la suite de ce manuscrit.

### **3.3.2. Modulation de la perception olfactive : les évènements péri-récepteurs**

A la surface de l'épithélium olfactif, les glandes de Bowman's et les cellules de soutien sécrètent le mucus olfactif, une interface aqueuse entre l'air qui entre dans la cavité nasale et les récepteurs olfactifs (Heydel et al., 2013). Le mucus olfactif est composé principalement d'eau (95%), de mucopolysaccharides (2%), de sels, d'OBPs (odorant binding protein) et d'enzymes (Nagashima et al., 2010, Débat et al., 2006). Contrairement à l'épithélium respiratoire, l'épithélium olfactif ne contient pas de cellules ciliées capables par leurs battements mécaniques de produire un flux continu de mucus dirigé vers le nasopharynx qui élimine les composés inhalés. Par conséquent, d'autres mécanismes seront nécessaires pour éliminer les molécules odorantes dans la cavité nasale afin d'éviter l'accumulation de ces molécules et ainsi de conserver la sensibilité du système olfactif. La présence d'OBPs dans l'environnement péri-récepteur (mucus, cellules de l'épithélium olfactif) interviendrait dans le transport et le contrôle de la biodisponibilité des molécules odorantes généralement hydrophobes au niveau des récepteurs olfactifs (Getchell et al., 1984). Le second groupe de protéines impliqué dans les évènements péri-récepteurs olfactifs plus particulièrement étudiés dans cette thèse concerne les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMXs). Ces enzymes fortement exprimées et actives dans la muqueuse olfactive sont impliquées dans le métabolisme des odorants (Heydel et al., 2013). Par conséquent, la biotransformation des molécules odorantes par ces enzymes interviendrait dans la perception des odeurs en modulant la disponibilité des odorants au niveau des récepteurs olfactifs.

#### **a. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques**

Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques catalysent des réactions de biotransformation dont le but est d'éliminer les composés exogènes (aliments, polluants, médicaments) ou endogènes (hormones, bilirubine, acide biliaire,...) potentiellement toxiques pour l'organisme. Bien que le foie soit l'organe principal du métabolisme des EMXs, ces enzymes sont également présentes dans la muqueuse olfactive. Les xénobiotiques, substances étrangères à l'organisme, sont généralement des molécules hydrophobes de faible poids moléculaire qui pénètrent facilement dans la cellule. Par

conséquent, les réactions catalysées par les EMXs conduisent à la formation de composés plus hydrophiles a priori désactivés en tant que stimulus et prompts à être éliminés. Ce processus de détoxification par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques s'organise en 3 phases (Figure 7).

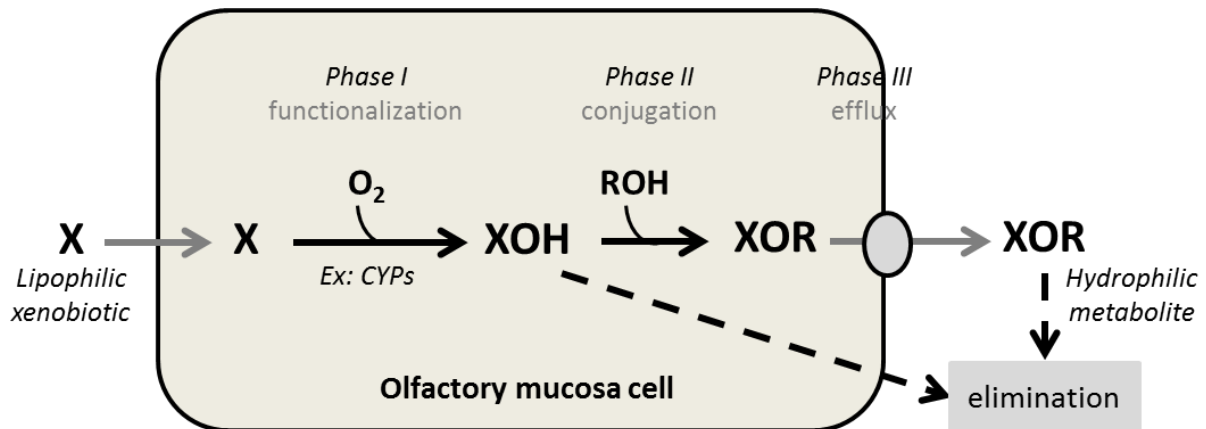


Figure 7 : Fonctionnement des enzymes du métabolisme des xénobiotiques

La phase I, dite phase de fonctionnalisation correspond principalement à des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse (Lauwerys et al., 2007). Il en résulte une augmentation de la polarité des molécules par ajout d'un groupe polaire ( $COOH$ ,  $OH$ ,  $NH_2$ ). Ces composés pourront alors être directement éliminés de la cellule ou pris en charge par les enzymes de phase II. Les cytochromes P450 (CYPs) sont les principales enzymes impliquées dans cette phase I. A partir d'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) et d'un donneur d'électron, elles introduisent un atome d'oxygène dans le substrat tandis que l'oxygène est réduit en molécule d'eau (Lauwerys et al., 2007) selon la réaction suivante :  $RH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + NADP^+ + H_2O$ . Il existe d'autres enzymes impliquées dans la phase I notamment les réductases, les oxydases, les carboxylestérases ou les déshydrogénases (Oppermann et Maser, 2000).

Les enzymes de la phase II, dite phase de conjugaison prennent en charge les métabolites issus de la phase de fonctionnalisation pour y greffer un substrat hydrophile le rendant encore plus polaire. Les trois principales familles d'enzymes qui catalysent ces réactions sont les UDP-glucuronosyltransférases (UGT), les glutathion-transférases (GST) et les sulfo-transférases (ST), (Green et al., 2005, Heydel et al., 2010).

Enfin, pendant la phase III dite phase d'élimination, les métabolites hydrophiles sont pris en charge par des transporteurs membranaires pour être excrétés de la cellule puis éliminés via l'urine ou la bile (Beaune et Lorient, 2000, Jones et George, 2004).

## b. Impact des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMXs) dans la perception olfactive

De par sa localisation, la muqueuse olfactive est en contact direct avec les composés volatils potentiellement toxiques présents dans notre environnement. De ce fait, les molécules que nous inhalons peuvent s'accumuler dans la cavité nasale entraînant une exposition prolongée avec les récepteurs ou une trop forte concentration en odorant ce qui peut être néfaste pour la perception olfactive. En 1997, Thornton-Manning et Dahl ont montré la présence de molécules toxiques mille à dix mille fois plus concentrées dans le mucus que dans l'air inspiré. Le système olfactif pourrait moduler la perception olfactive puisque des auteurs ont montré que les molécules odorantes sont plus efficacement métabolisées par les EMXs dans l'épithélium olfactif comparé à d'autres tissus ou organes dont le foie (Nef et al., 1989, Ben-Arie et al., 1993, Lazard et al., 1991, Leclerc et al., 2002). Ces résultats appuient l'hypothèse d'un rôle des enzymes du métabolisme des xénobiotiques d'une part dans la protection du tissu olfactif et d'autre part dans la modulation de la perception olfactive. Ces EMXs olfactives impliquées plus spécifiquement dans le métabolisme des molécules odorantes seront appelées Enzymes du Métabolisme des Odorants (EMOs) pour la suite de ce manuscrit.

A ce jour, peu d'équipes scientifiques se sont intéressées à l'impact des EMOs sur la perception olfactive. Seule deux études menées chez le rongeur ont montré leur rôle sur le métabolisme des odorants et dans la modulation du signal olfactif (Nagashima et Touhara en 2010, Thiebaud et al., 2013). Une des stratégies utilisée consistait à mesurer l'impact d'une modulation de l'expression ou de l'activité de ces enzymes sur la perception olfactive. Chez le rat, une inhibition des CYP450 a provoqué une augmentation de l'amplitude du signal sur un électro-olfactogramme générée par une stimulation de l'épithélium par des molécules odorantes connues pour être métabolisées par ces enzymes. Au cours des stimulations suivantes, ce signal diminuait progressivement montrant une saturation des récepteurs qui par un phénomène d'adaptation ne déclenchaient plus de signal olfactif (Thiebaud et al., 2013). Ce terme de « phénomène d'adaptation » désigne une modification temporaire d'un organe sensoriel olfactif, gustatif ou du toucher, à la suite d'une stimulation prolongée. Une stimulation prolongée peut avoir pour conséquence l'élévation du seuil de perception (définition AFNOR). Cette première étude montre l'importance des EMO dans la modulation du signal olfactif. Dans l'étude menée chez la souris par Nagashima et Touhara en 2010, l'inhibition de carboxylestérases *in vivo* a induit une augmentation du nombre de glomérules activés enregistrée par imagerie calcique. Parallèlement, cette étude a également mis en évidence une activité de biotransformation directement dans le mucus olfactif. De façon similaire, des travaux menés chez l'Homme ont permis d'obtenir une première approche sur le métabolisme des odorants (Schilling et al., 2007, Schilling et al., 2010). Cette étude montre pour la

première fois la présence de métabolites potentiellement odorants dans l'air expiré par les sujets en les analysant par spectrométrie de masse à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et par spectrométrie de masse par transfert de proton (PTR-MS). L'inhalation d'un odorant supplémentée par un inhibiteur des CYPs a induit une modification de la qualité de l'odeur. Ces résultats suggèrent que les métabolites produits par les EMO contribuent à la perception olfactive.

En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, les transformations enzymatiques au niveau des composés volatils pourraient influencer la perception olfactive de différentes manières : en convertissant des molécules odorantes en molécules non odorantes, en synthétisant des métabolites potentiellement capables d'interagir avec les récepteurs, en éliminant l'excès d'odorant pour éviter la saturation des récepteurs (Thornton-Manning et Dahl, 1997, Leclerc et al., 2002). Longtemps, ce processus a été proposé comme un mécanisme important mais principalement impliqué dans l'élimination de l'excès d'odorant. Cependant, les données *in vivo* récentes suggèrent fortement que la biotransformation des molécules odorantes par les enzymes olfactives est un processus rapide et dynamique car elle affecte la perception quasiment en temps réel. Ces enzymes pourraient, à travers la synthèse de métabolites, être à l'origine de nouveaux signaux olfactifs

L'importante expression et activité des EMOs dans la muqueuse olfactive laisse supposer leur implication dans la perception olfactive. Quelques travaux menés sur le modèle animal soutiennent cette hypothèse mais leur effet chez l'Homme reste à démontrer.

### 3.4. Interactions entre sens

La perception sensorielle d'un aliment provient de la combinaison complexe des signaux de saveur, d'arôme et de texture qui sont simultanément intégrés par le cerveau. Des travaux menés par Rolls (2005) ont mis en évidence par imagerie cérébrale la convergence de ces signaux sensoriels au niveau du système nerveux central. C'est donc le résultat de cette convergence qui provoquerait des interactions entre nos différents sens. De nombreux investigateurs ont étudié ces interactions cognitives. La majorité d'entre eux se sont intéressés aux interactions saveur/arôme. Ainsi, il a été montré que l'ajout d'arôme de fraise, de vanille ou d'amande dans des matrices sucrées (boisson, solution ou crème fouettée) renforce la perception de la saveur sucrée (Clark et Lawless, 1994, Cliff et Noble, 1990, Frank et Byram, 1988, Hort et Hollowood, 2004, Stevenson et al., 1999, Tournier et al., 2009). Réciproquement, l'ajout de saccharose a induit une augmentation de l'intensité des descripteurs vanille (solution aqueuse) (Kuo et al., 1993), amande et fruits (solution aqueuse et crème dessert laitière) (Hollowood et al., 2002, Hort et Hollowood, 2004, Lethuaut et al., 2005,

Pfeiffer et al., 2006). Ces interactions saveur/arôme, très largement étudiées avec la saveur sucrée, ont également été retrouvées avec les autres saveurs (Cook et al., 2003, Saint-Eve et al., 2004, Lawrence et al., 2011). Par exemple, la perception de la saveur salée a été augmentée en ajoutant des odeurs de sardine et de comté dans des fromages (Lawrence et al., 2011). Ces interactions saveur/arôme sont donc mises à profit pour compenser les réductions de sel et de sucre. Elles pourraient également fonctionner pour réduire la teneur en gras. Cependant, ces interactions ne sont observées que pour des couples saveur/arôme spécifiques, c'est-à-dire que l'arôme doit être congruent avec la saveur étudiée et inversement. En effet, le remplacement de l'arôme fraise par un arôme beurre de cacahuète dans la crème fouettée n'augmente pas la perception sucrée (Frank et Byram 1988). Si l'on considère le gras au même titre que les saveurs sucrée et salée, l'utilisation d'un arôme congruent avec le gras pourrait permettre de réduire la teneur en matière grasse d'un aliment sans modifier la perception de gras.

L'impact de la texture sur le goût et les odeurs a également été étudié. Une augmentation de la viscosité réduit l'intensité des saveurs et des arômes perçus (Baine et Morris, 1987, Cook et al., 2002, Costell et al., 2000, Lethuaut et al., 2003, Pangborn et al., 1973, Boland et al., 2006, Ferry et al., 2006, Juteau et al., 2004b). La texture influence donc la perception olfactive et, réciproquement, l'arôme peut lui aussi moduler la perception de la texture. Saint-Eve et al. (2004) ont ainsi observé une épaisseur perçue plus importante pour des yaourts présentant des arômes de noix de coco et de beurre par rapport à ceux présentant des arômes de pomme verte et d'amande.

Des interactions existent également entre arômes ou entre saveurs. Par exemple, l'addition de sel dans des soupes augmente la perception sucrée et diminue celle de l'amertume (Gillette et al., 1995). De même, un pain paraîtra plus salé si l'on ajoute de l'acide (Hellemann, 1992).

Concernant le gras, peu d'études se sont intéressées aux interactions perceptuelles saveur/gras ou arôme/gras. Une étude menée sur des biscuits a montré qu'une réduction du niveau de sucre n'a pas impacté la perception du gras alors qu'une réduction du taux de matière grasse diminuait la perception sucrée (Biguzzi et al., 2014). De façon similaire, l'ajout de sucre dans le lait ou le yaourt n'a eu aucun effet sur la perception du gras (Le Calvé et al., 2015). Syarifuddin et al. (2016) ont étudié les interactions arôme/texture/saveur en ajoutant des arômes sardine et beurre dans des matrices fromagères modèles à teneurs en matière grasse et en sel variables. Les résultats montrent que l'arôme de sardine augmente la perception du salé et que l'arôme beurre augmente la perception du gras. L'ajout d'un arôme peut donc augmenter la perception d'une saveur primaire ou du gras à condition qu'il soit congruent avec celle-ci.

La perception sensorielle d'un aliment ne se réduit donc pas à la somme des différentes modalités sensorielles sollicitées (odeur, goût et texture). Elle fait aussi intervenir de nombreuses interactions entre toutes les modalités. Ainsi, les interactions entre sens s'ajoutent à la perception multisensorielle du gras, rendant sa compréhension particulièrement complexe. Comme il est difficile de supprimer le goût et le toucher pour mieux comprendre la perception du gras, nous avons donc concentré notre attention sur le rôle de l'odorat dans la sensation de gras.

Alors que les interactions entre différentes modalités sensorielles impactent directement la perception sensorielle des sujets, la composition de la matrice peut d'abord impacter la libération des composés d'arôme pour venir, dans un second temps, impacter leur perception. L'étude de Saint-Eve et al. (2006b) a révélé qu'une réduction de la viscosité des yaourts favorise la libération des arômes expliquant ainsi l'augmentation de l'intensité aromatique perçue par les sujets. Cependant, d'autres études visant à augmenter la consistance des produits ont montré une diminution de l'intensité aromatique perçue, et ce, malgré une quantité d'arôme libérée qui reste inchangée (Cook et al., 2005, Lethuaut et al., 2004, Hollowood et al., 2002, Weel et al., 2002). Ces résultats mettent à nouveau en évidence des interactions entre sens évoquées plus haut, interactions qui rendent difficile l'étude du rôle de la texture sur la perception aromatique liée à la libération des stimuli de la matrice alimentaire. Pour contourner le problème de cette étape de libération, des auteurs ont eu l'idée de dissocier libération et perception en apportant l'odeur directement dans la cavité nasale à l'aide d'un olfactomètre pendant la consommation d'une matrice alimentaire (Bult et al., 2007, Visschers et al., 2006). Les résultats de ces travaux ont montré une diminution de l'intensité aromatique perçue quand la viscosité du produit augmente.

Les interactions entre le gras et les autres modalités sensorielles ont été peu étudiées. Les quelques études présentes dans la littérature n'ont pas d'hypothèses robustes pouvant expliquer ces mécanismes. Des études plus approfondies sont donc nécessaires pour mieux comprendre les interactions cognitives, en lien avec la perception du gras.

La libération des composés d'arôme semble donc être un élément clef dans la perception sensorielle. Dans le but de comprendre l'impact de la libération des composés d'arôme sur la perception, la partie qui suit vise à établir un bilan des différentes approches qui peuvent être utilisées pour mesurer les composés aromatiques.

## 4. Mesure de la libération des arômes

La libération des composés aromatiques d'une matrice alimentaire peut être étudiée en condition *in vitro*, ce qui permet de s'affranchir de l'influence du sujet, mais aussi *in vivo* en utilisant différentes approches. Parmi ces approches, les méthodes discontinues permettent d'analyser des composés volatils à un instant donné. En complément, des études dites en continu permettent de mesurer la cinétique de libération des composés d'arôme au cours du temps.

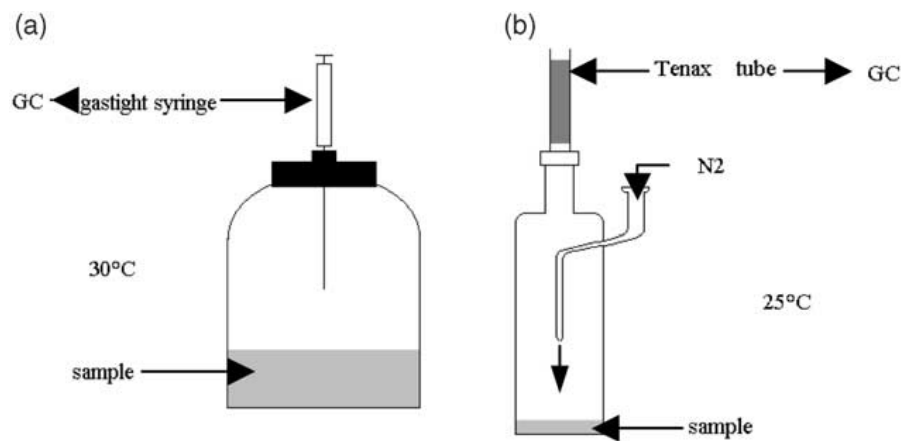
### 4.1. Méthodes de mesure

#### 4.1.1. Méthodes discontinues

Les méthodes de mesure discontinues de la libération des composés aromatiques consistent à étudier le partage des molécules volatiles entre l'aliment et la phase gazeuse (headspace). Ces mesures peuvent être effectuées en mode statique, c'est-à-dire à l'équilibre, ou en mode dynamique. L'analyse de l'headspace (espace de tête) à l'équilibre (Figure 8) permet d'obtenir le coefficient de partage des composés d'arôme entre l'aliment et l'air (Terta et al., 2006). Cette technique consiste à prélever un petit volume de gaz, dans la partie supérieure d'un flacon contenant l'échantillon capable de libérer des molécules odorantes sous forme gazeuse pour être analysé en chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Figure 8a). Afin de déterminer la composition aromatique de l'échantillon et par conséquent le coefficient de partage, la CPG est couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID) ou à un spectromètre de masse (CPG-MS).

Cependant, la libération des composés d'arôme résultant de la consommation alimentaire est un processus dynamique au cours duquel l'équilibre n'est pas atteint. Une méthode en mode dynamique semi continue (Figure 8b) peut alors être utilisée pour représenter au mieux la cinétique de libération des composés aromatiques en bouche. Le principe est identique à celui en mode statique mais un échantillon de la phase gazeuse est régulièrement prélevé et analysé pour suivre l'évolution de la composition aromatique au cours du temps (Bakker et al., 1998, Andriot et al., 2000, Juteau et al., 2004b, Terta et al., 2006). Pour se rapprocher au mieux de la réalité, l'échantillon peut être agité, en présence ou non de salive et la température est programmable. Une autre approche consiste à piéger les composés d'arôme sur un polymère comme le Tenax® ou sur une fibre SPME (Solid Phase Micro Extraction). Dans ce cas, un flux gazeux (d'azote ou d'hélium) arrive continuellement à la surface d'un aliment placé dans un flacon, provoquant une libération des composés aromatiques qui sont entraînés vers le haut du flacon pour être piégés sur l'absorbant ou la fibre. Après désorption en CPG-FID ou CPG-MS, les composés aromatiques pourront être analysés

(Cayot et al., 2004, Juteau et al., 2004b, Ventanas et al., 2010, Mitchell et al., 2011). Ce système de piégeage permet d'accumuler et par conséquent de concentrer les composés volatils libérés de l'échantillon. Il est particulièrement utile lorsque la concentration de molécules aromatiques est faible ou en dessous du seuil de détection de l'appareil.



**Figure 8 : Systèmes expérimentaux pour l'analyse de l'espace de tête en mode statique (a) et en mode dynamique (b). (Reproduction d'après Juteau et al., 2004).**

L'analyse de l'espace de tête par systèmes de piégeage a également été employée *in vivo* en collectant une partie de l'air expiré par le nez de l'Homme (nosepace) durant la consommation d'un aliment (Figure 9). Linforth et al. (1994) ont appliqué cette technique de piégeage sur Tenax® lors d'une étude sur les composés volatils libérés lors de la consommation de tomate. La courbe représentant le profil de libération en nosepace a été différente de celle obtenue avec la méthode classique en headspace soulignant ainsi l'importance des études *in vivo*. De façon similaire, Ingham et al. (1995) ont étudié le profil de libération aromatique de bonbons à la menthe via le système de piégeage sur Tenax en sortie des narines. La technique s'est révélée efficace pour mettre en évidence la variabilité entre les sujets et les différences de libération en fonction des propriétés physicochimiques des composés d'arôme. Ces différences de libération entre les individus proviendraient probablement de différences de processus en bouche (durée et force de mastication entre autres) (Ingham et al., 1995).



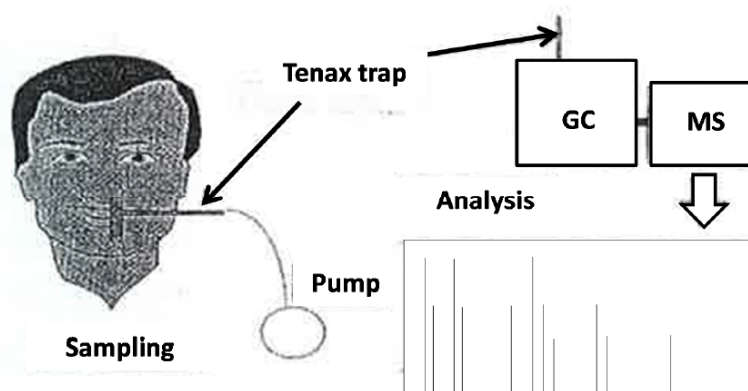


Figure 9 : Principe général d'analyse de l'air expiré par piégeage sur Tenax (Reproduction d'après Taylor et Linforth, 2000).

En 1997, Grote et Pawliszyn utilisent pour la première fois des fibres SPME dans le cadre d'une étude médicale et toxicologique pour étudier la composition aromatique de l'haleine chez l'Homme. La quantification de l'éthanol, de l'acétone et de l'isoprène a été réalisée en plaçant la fibre directement dans la bouche des sujets sur un temps défini soulignant ainsi la facilité d'utilisation de ces fibres dans les études *in vivo*. Plus tard, Pionnier et al. (2005) ont montré que des prélèvements de 8 secondes effectués en sortie de cavité nasale répétés sur une période de 3 minutes permettaient de suivre la cinétique de libération des arômes au cours de la consommation d'un morceau de fromage.

Bien que ces techniques de piégeage soient indispensables pour mesurer le coefficient de partage d'une molécule et aient été un outil fondamental pour étudier la nature des composés d'arôme libérés par l'aliment *in vitro* et *in vivo*, elles présentent aussi quelques limites non négligeables. Tout d'abord, les fibres sont exposées à l'air et peuvent être contaminées (Grote et al., 1997). Ensuite, les fibres utilisées sont sélectives (Roberts et al., 2000). Selon la nature de l'absorbant de la fibre (phase polaire ou apolaire) et des composés volatils à capter, l'adsorption et la désorption se feront plus ou moins bien. De plus, les échantillons à faible concentration nécessitent un temps de piégeage relativement long pour dépasser le seuil de sensibilité des appareils de mesure (Pionnier et al., 2005). Le temps de piégeage est donc une limite de cette méthode ne permettant pas de suivre des variations qui se produisent sur des temps réduits. Par ailleurs, certaines études ont utilisé plusieurs fibres en demandant aux sujets de consommer plusieurs fois l'aliment pour obtenir la cinétique de libération des composés aromatiques (Ingham et al., 1995). Par exemple, une première fibre évalue la libération sur les 15 premières secondes lors d'une première consommation. Puis lors d'une deuxième consommation, une seconde fibre mesure les 15 secondes qui suivent. Ce procédé présente un biais car la consommation du produit peut différer entre deux mises en bouche. Pour

finir, les techniques de piégeage ne permettent pas de prélever la phase gazeuse en continu de la mise en bouche à la déglutition, ce qui ne représente pas totalement la réalité du process en bouche.

Il est difficile de vouloir généraliser l'ensemble des phénomènes qui interviennent dans la libération des arômes au cours de la consommation étant donné leur complexité et la variabilité en fonction de la matrice utilisée et des sujets. En effet, la combinaison de différents facteurs comme la mastication, la dilution par la salive et la déglutition modifie la partition des arômes entre l'aliment et l'espace de tête. C'est pourquoi, la méthode de mesure en « nosespace » permettant d'échantillonner directement les effluves aromatiques en continu et en temps réel dans la cavité nasale des sujets au cours de la consommation d'un produit est à privilégier.

#### 4.1.2. Méthodes continues et en temps réel

Le développement d'une méthode continue par des techniques de spectrométrie de masse comme l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) (Figure 10) ou la réaction par transfert de protons (PTR) (Figure 11), apporte de nouvelles opportunités pour étudier la libération des composés aromatiques durant la consommation alimentaire, et par conséquent, leur perception en lien avec les caractéristiques de la matrice. Ces techniques sont relativement simples d'utilisation et possèdent à la fois une bonne sensibilité et une bonne résolution temporelle. Elles sont efficaces et complémentaires des méthodes telle que la chromatographie en phase gazeuse discutée précédemment. Chez l'Homme, l'haleine est directement collectée au niveau des narines de façon à analyser les composés volatils au plus près de la muqueuse olfactive.

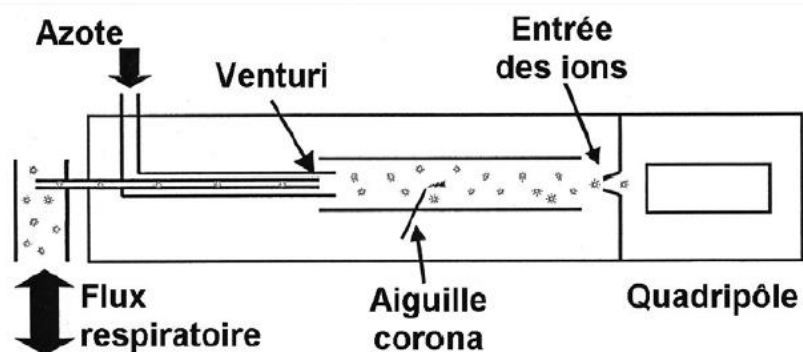
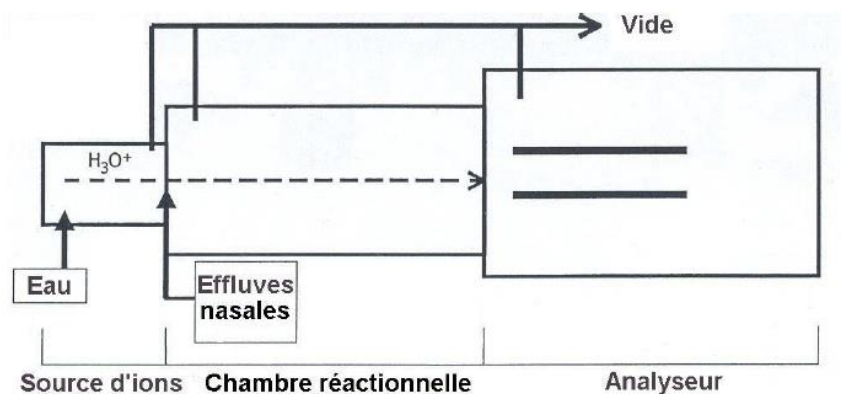


Figure 10 : Interface MS-Nose<sup>TM</sup> développée par Taylor et Linforth dans le but d'étudier la libération des composés d'arôme durant la consommation d'un aliment (Reproduction d'après Taylor et Linforth, 2000).



**Figure 11 : Représentation d'un spectromètre de masse à source à ionisation par PTR-MS (Reproduction d'après Hansel et al., 1995). Cette méthode apporte de nouvelles opportunités concernant le suivi de la libération des composés d'arôme au cours de la consommation d'un aliment.**

Les deux méthodes reposent sur une ionisation douce, ce qui signifie que les ions réactants ont assez d'énergie pour ioniser les molécules tout en limitant la fragmentation. L'ionisation de la molécule (M) est basée sur une réaction par transfert de protons à partir de l'ion hydronium  $H_3O^+$ :  $H_3O^+ + M \rightarrow MH^+ + H_2O$ . Les modes d'ionisation par l'APCI et par le PTR sont des réactions chimiques visant à former des ions protonés ( $MH^+$ ) avec quelques différences sur la façon de générer les ions précurseurs  $H_3O^+$  et sur la pression dans le système. Dans le cas de l'APCI, les composés volatils sont introduits dans la source par un effet Venturi avant d'être ionisés en présence de vapeur d'eau à pression atmosphérique (Taylor et al., 2000). Le gaz de nébulisation est ionisé par une aiguille corona. Ces ions et ceux formés à partir des gaz atmosphériques par l'aiguille corona transfèrent leurs charges à l'eau (atmosphérique et provenant des effluves nasals) qui forme alors les ions précurseurs  $H_3O^+$  qui réagissent avec les molécules M pour former les  $MH^+$ . Suite au développement de l'interface MS-Nose<sup>TM</sup> permettant l'introduction des effluves nasals dans la source par l'effet Venturi, les premiers travaux utilisant l'APCI ont majoritairement été conduits par Linforth et Taylor (Taylor and Linforth, 2010). Dans le cas du PTR, la source d'ions consiste en une cathode qui permet la formation des ions réactants  $H_3O^+$  à partir d'eau injectée dans la source d'ions. Ces ions primaires abondants ( $H_3O^+$  et clusters d'eau) sont alors transmis à pression et température contrôlée dans la chambre réactionnelle, le drift tube, lieu d'introduction des composés volatils en phase gazeuse (Hansel, 1995). Afin d'analyser la composition en arôme des effluves nasals, une interface adaptée a été développée entre les narines du sujet et l'entrée du spectromètre de masse (Figure 12).

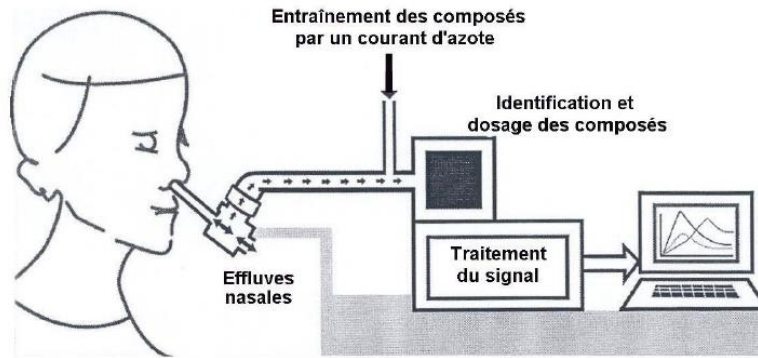


Figure 12 : Analyse d'effluves nasals par nosespace APCI-MS (Reproduction d'après Harvey et Barra, 2003).

Dans ces deux approches, l'air expiré par le sujet est aspiré en continu et en temps réel sans pour autant perturber sa consommation alimentaire. Le temps de transfert de ses flux gazeux dans l'appareil est suffisamment court pour étudier la cinétique de libération aromatique en lien avec la consommation du produit (Taylor et al., 2000). De ce fait, ces méthodes d'analyse ont été employées *in vivo* pour étudier l'influence du process en bouche (salivation, mastication et déglutition) sur la libération des arômes (Hodgson et al., 2003, Haahr et al., 2004, Pionnier et al., 2004b, Mestres et al., 2005, Tarrega et al., 2007). D'autres auteurs ont utilisés le PTR-MS ou l'APCI pour comprendre l'impact du changement de viscosité, de l'ajout d'arômes ou de la réduction en sel/sucre/gras des matrices alimentaires sur la libération aromatique (Brauss et al., 1999a, Lethuaut et al., 2004, Mei et al., 2004, Burseg et al., 2009, Déléris et al., 2011). Bien que ces méthodes aient été développées pour des études chez l'Homme, elles sont aussi utilisées pour des études *in vitro*. Elles permettent par exemple de mesurer la cinétique de libération aromatique à partir d'un simulateur de mastication (Gierczynski et al., 2007, Poinot et al., 2009). Cependant, des auteurs ont mis en évidence des différences significatives entre la libération des composés aromatiques *in vitro* et *in vivo* soulignant ainsi l'importance des études *in vivo* pour caractériser d'une part la cinétique de libération des composés aromatiques au cours du temps et d'autre part étudier les relations entre libération et perception (Linthorpe et al., 1994, Linthorpe et al., 2002, Roberts et al., 2003, Bolan et al., 2006, Carrapiso et al., 2007, Gierczynski et al., 2007). Par exemple, Robert et al. (2003) ont montré une diminution de la libération aromatique due à l'augmentation de la teneur en matière grasse plus marquée *in vitro* qu'*in vivo*. En effet, ces auteurs indiquent que la libération en bouche n'est pas un phénomène statique mais dynamique modulé par la mastication, la dilution avec la salive, la déglutition et le transport rétronasal des composés volatils vers la cavité nasale.

Ces techniques de spectrométrie de masse en mode d'ionisation par APCI et par PTR présentent toutefois certaines limites. En particulier, les composés de même masse moléculaire ne peuvent pas être différenciés car il n'y a pas de séparation en amont comme en CPG-MS (Brauss et al., 1999a). Les

analyseurs de masse à temps de vol (au PTR-MS) permettent cependant d'obtenir des spectres à plus haute résolution que le quadripôle utilisé avec l'APCI qui possède une résolution unitaire. De plus, la sensibilité est molécule-dépendante (poids moléculaire, classe chimique). Les molécules présentant un poids moléculaire important sont souvent plus difficiles à suivre. Concernant les classes chimiques, les esters, les alcools et les cétones peuvent très bien être étudiées au PTR-MS contrairement aux acides et aux lactones. Par ailleurs, l'analyse quantitative par ces méthodes peut être compliquée à cause des phénomènes de compétitions entre les composés volatils présents dans la source d'ionisation (Le Quéré et al., 2006, Le Quéré et al., 2009). Au moment de l'ionisation, le signal d'un composé peut être atténué ou augmenté en comparaison avec le signal qu'il génère s'il est seul.

#### 4.2. Protocole de consommation libre ou imposé

L'étude de la libération des composés d'arôme *in vivo* lors de la consommation d'un produit alimentaire pose la question du protocole de consommation du produit par le sujet. Soit le protocole de consommation est libre et le sujet consomme l'aliment de la façon la plus naturelle possible soit il est imposé et le sujet consomme l'aliment en suivant un protocole fixé par l'expérimentateur. Imposer la façon de consommer un aliment présente l'avantage de standardiser la durée de résidence du produit en bouche, la durée de mastication et/ou le nombre de coups de dent ce qui facilite l'exploitation des données. Ce mode opératoire est largement utilisé dans les études qui visent à comprendre l'impact des propriétés d'une matrice sur la libération des composés aromatiques associés (Roberts et al., 2003, Miettinen et al., 2004, Buffo et al., 2005, Denker et al., 2006, Mestres et al., 2006, Carrapiso, 2007, Gierczynski et al., 2007, Linforth et al., 2007, Kühn et al., 2009, Arancibia et al., 2011). Il est aussi utilisé pour étudier des paramètres physiologiques (principalement masticatoires) en limitant la variabilité interindividuelle (Mestres et al., 2006, Tarrega et al., 2007, Gierczynski et al., 2008). Par exemple, un temps de mastication de 20 sec a été choisi pour l'ensemble des juges et des produits (gels) dans l'objectif de limiter la variabilité interindividuelle (Gierczynski et al., 2008). Les résultats de cette étude ont mis en évidence un pic de libération aromatique à 26 sec et ce, malgré les variations de structure des produits. Ainsi, le protocole imposé permet d'étudier des facteurs bien définis.

L'inconvénient majeur du protocole imposé reste l'éloignement avec les conditions réelles de consommation. De ce fait, quelques expérimentateurs se sont dirigés vers le protocole « semi libre » n'imposant pas de temps de mastication ou de déglutition précis (Burseg et al., 2009) mais demandant aux sujets de ne déglutir qu'une seule fois et d'indiquer ce moment. D'autres encore, ont

choisi de ne rien imposer aux sujets en utilisant un protocole libre (Aprea et al., 2006, Ruijschop et al., 2009, Blee et al., 2011, Repoux et al., 2012a). Par exemple, Aprea et al., 2006 ont observé d'importantes variations des profils de libération des arômes d'une crème dessert lorsque le protocole était libre en comparaison avec le protocole imposé. Le protocole libre est particulièrement recommandé lorsque l'étude porte sur la compréhension des différences interindividuelles. Pour étudier l'effet produit, ce protocole est souvent moins intéressant que le protocole imposé.

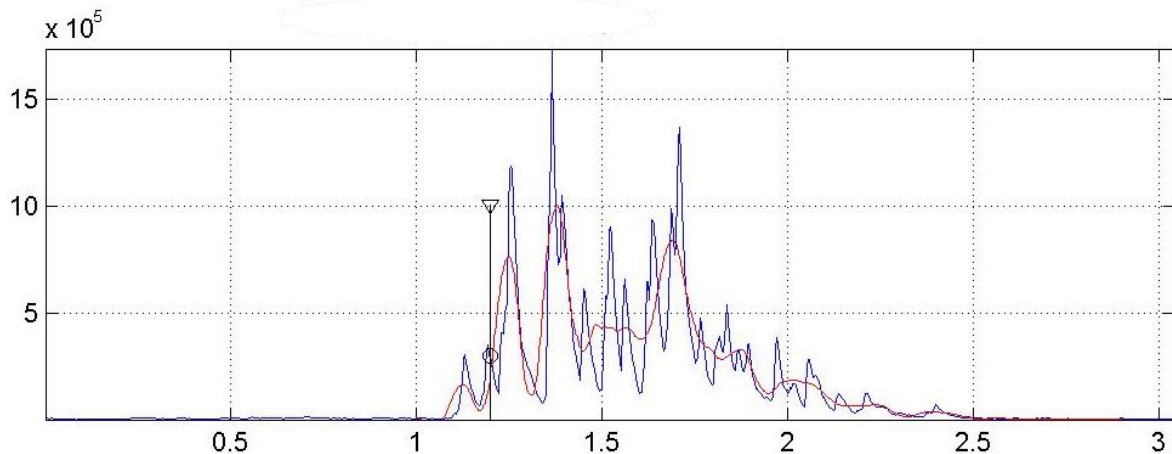
Ainsi, le choix du protocole de consommation d'un aliment est déterminant dans l'exploitation et l'interprétation des données. Dans l'objectif d'étudier les variations interindividuelles, le protocole libre semble être le plus adapté.

### 4.3. Méthodes d'analyse des profils de libération en continu

L'évolution des méthodes de mesure en continue de la libération des composés d'arômes *in vivo*, de plus en plus précises, performantes et complètes, met l'expérimentateur face à une difficulté dans l'exploitation des données. Dans le cadre des mesures effectuées par APCI-MS ou PTR-MS, les méthodes d'exploitation des profils de libération des composés d'arôme diffèrent principalement par trois points que sont : le traitement des courbes de libération moyennes ou individuelles, l'utilisation ou non d'une méthode de lissage des courbes et le choix des paramètres extraits.

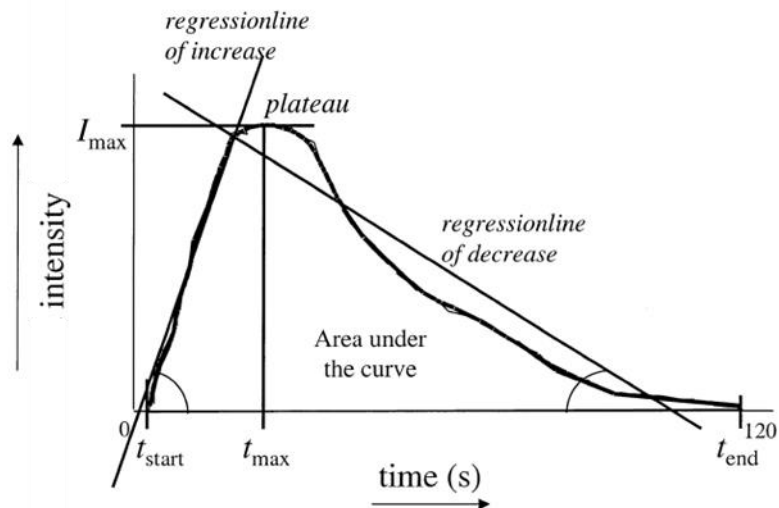
Au départ, la stratégie consistait à moyenniser les courbes de libération des sujets étudiés pour obtenir une vision globale du profil de libération par produit (Baek et al., 1999, Weel et al., 2002, Lethuaut et al., 2004, Schober et al., 2004). Dans ce cas, les auteurs s'intéressaient donc à la libération de l'ensemble du groupe. Constatant une grande variabilité interindividuelle des profils obtenus, il est apparu plus judicieux et plus rigoureux d'analyser les courbes individuelles. Traiter les données courbe par courbe permettrait donc d'éviter de masquer les différences interindividuelles (Mestres et al., 2006, Gierczynski et al., 2008, Délérís et al., 2011).

La majorité des auteurs procèdent à un lissage des courbes avant traitement. Ce lissage, qui ne doit pas modifier l'allure des courbes, (Lethuaut et al., 2004, Ovejero-López et al., 2004, Pionnier et al., 2004a, Schober et al., 2004) permet de minimiser les fluctuations du signal provenant des cycles respiratoires du juge (Figure 13).



**Figure 13 : Représentation du lissage d'une courbe de libération d'un arôme au cours du temps : courbe non lissée en bleue et courbe lissée en rouge. Le lissage ne modifie pas l'allure des courbes, il va minimiser les fluctuations du signal provenant des cycles respiratoires du juge.**

Les paramètres principalement extraits sont l'aire sous la courbe (AUC), l'intensité maximale ( $I_{\max}$ ) et le temps nécessaire pour atteindre cette intensité maximale ( $t_{\max}$ ) (Figure 14). Le  $t_{\text{start}}$  qui correspond au moment de la mise en bouche et le temps correspondant au retour des courbes de libération à la ligne de base sont aussi deux paramètres importants. D'autres auteurs étudient la vitesse de retour à la ligne de base pour avoir une idée de la persistance ou de la rémanence de l'arôme. Cette vitesse de retour correspond à la pente descendante. Cependant, dans le cas d'un profil accidenté, il peut être difficile d'évaluer la vitesse de retour par la pente. Dans ce cas, des aires sous la courbe à différents temps peuvent être calculées. Enfin, des auteurs ont étudié la vitesse de libération des composés d'arôme (Baek et al., 1999, Pionnier et al., 2004b, Aprea et al., 2006, Boland et al., 2006, Mestres et al., 2006, Repoux et al., 2012a). Cette vitesse de libération correspond à la pente ascendante ou à l'aire sous la courbe à différents temps. Selon les auteurs, la perception serait plus liée à la vitesse de libération qu'à l'intensité de libération totale (Boland et al., 2006, Mestres et al., 2005).



**Figure 14 : Paramètres fréquemment extraits des courbes de libération des composés d'arômes (Dijksterhuis and Piggott, 2001).**

Dans la majorité des études, les auteurs traitent le signal et extraient ses paramètres sur la totalité du profil de libération, c'est-à-dire de la mise en bouche à la fin de l'acquisition (Brauss et al., 1999b, Tarrega et al., 2007, Kersiene et al., 2008, Arancibia et al., 2011). Une seconde approche consiste à séquencer la période de consommation en deux phases, permettant de distinguer la libération des composés d'arôme pendant (phase 1) et après (phase 2) la déglutition principale (Gierczynski et al., 2007, Gierczynski et al., 2008, Délérís et al., 2010, Repoux et al., 2012a). Dans ce cas, les différents paramètres présentés plus haut sont étudiés avant déglutition d'une part et après déglutition d'autre part. Ce traitement par phase permet donc de distinguer la libération des composés d'arôme avant et après déglutition (Hansson et al., 2003, Buffo et al., 2005, Saint-Eve et al., 2006a).

Au regard de la littérature, nous venons de voir qu'il existe plusieurs approches pour étudier les composés d'arôme présents dans la sphère orale au cours de la consommation d'un aliment. Dans l'objectif d'étudier les variations de libération des composés d'arôme entre les individus, il semble préférable de lisser les données puis d'extraire les paramètres de chaque courbe individuelle. Par la suite, il semblerait intéressant de relier ces données de libération aux données de perception. Cette stratégie qui peut être abordée de différentes manières, fera l'objet de la partie 5.



## 5. Quels liens entre la libération des composés d'arôme et perception ?

Le lien entre la libération des composés d'arôme et la perception sensorielle fait l'objet d'une littérature abondante mais reste malgré tout difficile à faire. Comme nous l'avons vu précédemment, la perception des propriétés sensorielles d'un aliment est fonction de la composition et des caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques de la matrice mais aussi des caractéristiques physiologiques (par exemple le comportement masticatoire) des individus (Gierczynski et al., 2008).

Les mesures de perception sensorielle peuvent être séparées en deux groupes : les mesures statiques et les mesures dynamiques en temps réel. Les mesures statiques consistent à évaluer l'intensité globale de descripteurs pour obtenir un profil. Cependant, les changements de sensations perçus au cours de la consommation de matrices complexes ne sont pas pris en compte. Pour cette raison, une autre stratégie consiste à réaliser des mesures dynamiques. Par exemple, la méthode TI (Time Intensity) a été développée pour suivre l'évolution d'un descripteur au cours du temps (Lee and Pangborn, 1986). La limite que présente le TI reste le faible nombre de descripteurs évalué au cours d'une séance. Pour y remédier, une méthode innovante a été développée : le DTS (Dominance Temporelle des Sensations) (Pineau et al., 2004). Le sujet dispose en continu d'une liste de descripteurs choisis et optimisée par le panel. Il doit identifier le descripteur dominant à chaque instant de la consommation et éventuellement évaluer son intensité. Cette démarche est renouvelée jusqu'à extinction des perceptions.

### 5.1. Libération des composés d'arôme *in vitro* et données sensorielles

Les premières études sur le lien entre libération des composés d'arôme et perception sensorielle consistaient à analyser l'espace de tête d'un flacon contenant l'aliment et à mettre en relation la composition de cet espace de tête avec les données sensorielles. En 1998, Yven a étudié l'effet des hydrocolloïdes sur la rétention des composés d'arôme. Pour se faire, l'intensité aromatique du 1-octen-3-ol (champignon), du diallyl disulfide et du diallyl sulfide (ail) et du diacétyle (beurre) de trois solutions (eau, eau + gomme de guar et eau + xanthan) a été évaluée par les panélistes 5 secondes après déglutition. Dans cette étude, l'auteur a observé une intensité des descripteurs « ail » et « arôme global » plus intense pour la solution contenant de l'eau comparé aux solutions contenant des épaississants. Parallèlement, la libération des molécules « diallyl disulfide » et « diallyl sulfide », connues pour apporter une note d'ail, a été plus importante dans l'eau que dans les autres solutions. Ces résultats montrant un lien libération/perception ont été confirmés par d'autres auteurs dans les gels alimentaires (Carr et al., 1996, Beak et al., 1999). Cependant, les

matrices utilisées dans ces études sont des matrices modèles, de composition simple, non représentatives de la complexité des produits de consommation courants. En 2006, Biasioli et al. ont observé une augmentation de la libération des composés d'arôme entre des fromages de 8 et 28 mois d'âge, en accord avec les données sensorielles. L'étude menée par Gallardo-Escamilla et al., (2007) met en évidence un lien libération/perception pour certains agents de texture mais pas pour la gamme de xanthan. Au vu des résultats, il semble compliqué de corréler des données sensorielles avec des données *in vitro*. Bien que les études *in vitro* aient apporté des informations sur des paramètres physico-chimiques, elles ne prennent pas en compte les paramètres physiologiques tels les comportements de mastication, les phénomènes de déglutition et de dilution par la salive (Roberts et al., 2003).

## **5.2. Mesure non simultanée de la libération des composés d'arôme *in vivo* et perception sensorielle**

La déstructuration des aliments en bouche est un processus dynamique faisant intervenir des paramètres individuels, tels que le comportement de mastication, la déglutition et la physiologie orale. L'ensemble de ces éléments va moduler le profil de libération des composés d'arôme (Taylor and Linforth, 2000). Relier la libération des composés d'arôme *in vivo* avec la perception sensorielle est une stratégie utilisée pour étudier l'impact de la formulation d'un produit mais aussi de la variabilité interindividuelle sur la libération et la perception.

### **5.2.1. Libération des composés d'arôme *in vivo* et perception sensorielle statique sur deux panels différents**

De façon surprenante, la majorité des études décrites dans la littérature ont comparé les données de libération et de perception de deux panels distincts (Bayarri et al., 2006, Bursey et al., 2009, González-Thomàs et al., 2007). Ces méthodes statiques ont essentiellement été utilisées pour des applications alimentaires. Elles ont permis d'étudier l'effet de la teneur en matière grasse et en agents épaississants sur la libération des composés d'arôme et par conséquent sur la perception (Bayarri et al., 2006, Bayari et al., 2007, Bursey et al., 2009).

Comme décrit dans la première partie de ce chapitre, une modification de la teneur en matière grasse va avoir un impact sur la perception globale de l'aliment. Ainsi, la connaissance des différentes modalités sensorielles affectées par la réduction de la teneur en matière grasse, semble être indispensable pour reformuler les produits alimentaires. Des émulsions huile/eau à plus hautes

teneurs en matière grasse (30%) ont été perçues moins sucrées et moins fruitées que des émulsions à plus faible teneur en matière grasse (0,5 et 3%), malgré un niveau inchangé de libération des composé d'arôme (Bayarri et al., 2006, Bayarri et al., 2007). Pour être plus proche des produits de consommation courants, Bursey et al., (2009) ont étudié l'effet du taux de matière grasse et de saccharose sur la perception de biscuits aromatisés. Les biscuits les moins gras ont été perçus comme plus intense en arôme, en accord avec les profils de libération. Dans cette étude, le niveau de matière grasse a modifié la structure des biscuits. Or, la structure d'un aliment influence indirectement la libération des arômes en bouche, en modulant la salivation et le comportement masticatoire (Bursey et al., 2009). Par ailleurs, l'hydrophobicité des composés d'arôme doit être prise en compte dans l'interprétation des données de libération. En effet, dans une étude visant à comparer différents taux de matière grasse, le taux de matière grasse dans le lait n'a quasiment pas impacté la libération des composés peu lipophiles (González-Thomàs et al., 2007). Par contre, l'augmentation de la teneur en matière grasse dans des émulsions huile/eau a induit une réduction de l'intensité aromatique perçue et de la libération des composés d'arôme uniquement pour les composés les plus lipophiles (Arancibia et al., 2011).

Pour compenser la réduction de la teneur en matière grasse, des auteurs ont ajouté des agents de texture (González-Thomàs et al., 2007). Ces agents de texture peuvent modifier la texture des produits mais également la libération des composés d'arôme, la perception des composés sapides et celle des arômes. L'addition de K-carraghénane ou d'amidon dans des laits, n'a pas impacté la libération des composés d'arôme de l'arôme fraise ni sa perception sensorielle (González-Thomàs et al., 2007). En revanche, la présence de K-carraghénane a significativement réduit la perception de la saveur sucrée.

Les études visant à comprendre la contribution des agents texturants sur la libération et la perception sont nombreuses mais les résultats sont contradictoires. Par exemple, une augmentation de la viscosité a induit une diminution de la libération des composés d'arôme dans les yaourts et les crèmes (Guichard et al., 2010). Au contraire, ces auteurs ont observé une augmentation de la libération aromatique dans les fromages les plus fermes. Par ailleurs, les données sensorielles en contradiction avec les données de libération *in vivo* ont montré une intensité perçue plus élevée dans les fromages les moins fermes (Guichard et al., 2010). Les interactions cognitives pourraient être à l'origine de divergences entre perception et libération. D'autres auteurs ont modulé la viscosité des produits sans observer de différences de libération (Cook et al., 2003, González-Thomàs et al., 2008). En accord avec les données analytiques, González-Thomàs (2008) n'a pas observé de variations de l'intensité du descripteur fraise dans les crèmes desserts supplémentées en k-carraghénane ou en amidon et ce, malgré la perception des différences de viscosité. Au contraire, Cook et al. (2003) ont

mis en évidence une réduction de la perception de la saveur salée et des arômes champignon et ail lorsque la viscosité augmente. Ainsi, les nombreuses contradictions observées entre les études laissent supposer que le lien entre la libération et la perception est produit/dépendant.

Comme cité précédemment, les paramètres physiologiques tels que le comportement masticatoire et la salivation modulent la libération des composés d'arôme. La comparaison des données de perception et de libération issues de deux panels différents peut donc être biaisée par les différences physiologiques entre les individus des deux panels. Une façon de limiter ces variations consiste à utiliser le même panel pour les deux types de mesures.

### **5.2.2. Libération des composés d'arôme *in vivo* et perception sensorielle statique sur un panel unique**

Les travaux menés par Roberts et al., (2003) sur des laits à différentes teneurs en matière grasse ont conduit aux mêmes résultats que ceux de Gonzalez-Thomàs et al. (2007) cités précédemment : une augmentation de la teneur en matière grasse entraîne une plus faible libération des composés les plus lipophiles et une diminution de l'intensité perçue. L'étude menée par Boland et al. (2006) a mis en évidence une libération d'arôme plus importante dans les gels à base de pectine que dans ceux à base de gélatine. La nature de l'agent épaississant module donc la quantité d'arôme libérée dans la cavité buccale. Parallèlement, l'augmentation de la dureté des deux types de gels a induit une diminution de la libération des composés d'arôme dans la bouche, une diminution de l'arôme fraise perçue et une augmentation de l'épaisseur perçue. Dans l'étude menée par Van Ruth's et al. (2004) les auteurs ont observé une augmentation de la libération des composés d'arôme dans la bouche avec l'augmentation de la viscosité. Cependant, ces résultats obtenus *in vivo* ont été en opposition avec ceux obtenus *in vitro* qui ont montré une diminution de la libération aromatique avec l'augmentation de la rigidité des produits. Selon Van Ruth's et al. (2004), cette contradiction proviendrait du process en bouche comme le phénomène de mastication. Par ailleurs, les différences observées entre les deux études peuvent s'expliquer par le fait que ces auteurs n'ont pas utilisé le même type d'agent épaississant ni la même matrice alimentaire. Une des hypothèses pouvant expliquer les différences observées entre des matrices alimentaires plus ou moins rigides serait le temps de mastication en bouche plus long pour des produits fermes. En effet, les produits rigides demandent un effort masticatoire plus important que les produits plus fluides. Par ailleurs, les composés d'arôme seraient plus facilement retenus dans la matrice rigide. Enfin, si l'agent épaississant n'est pas le même, les interactions physico-chimiques peuvent être différentes ainsi que

les propriétés rhéologiques. Ces éléments pourraient expliquer les contradictions entre la libération aromatique et la perception sensorielle (Gierczynski et al., 2006).

L'intérêt de travailler avec un panel unique consiste à étudier la libération et la perception sur un même groupe d'individus permettant de s'affranchir de la variabilité inter groupe. L'étude menée par Mestres et al., 2005 sur des gels à différentes teneurs en protéine a mis en évidence des notes d'intensité aromatique plus élevées dans les gels contenant de faibles concentration en protéine. En revanche, les paramètres de libérations tels que  $I_{max}$ ,  $t_{max}$  et AUC n'étaient pas différents. En traitant les résultats individuellement, ces auteurs ont mis en évidence une importante variabilité interindividuelle qui les a conduits à séparer les dégustateurs en deux groupes. Le premier groupe libérait des composé d'arôme continuellement, et ce dès la mise en bouche, contrairement au deuxième groupe qui libérait seulement après chaque déglutition. Pour la majorité des sujets, le profil de libération des arômes entre les différents gels restait inchangé. Pour d'autres, le profil de libération était modifié par la texture des produits (Mestres et al., 2005). La différence entre les deux profils de libération peut s'expliquer par l'ouverture du velum (explication détaillée plus bas) pendant le processus de mastication uniquement pour le premier groupe (Peyron et al., 2002). Les auteurs ont cependant observé une quantité totale d'arômes libérée similaire entre les deux groupes. Concernant les données sensorielles, l'ensemble du panel a évalué les gels les plus rigides comme étant moins intenses. De plus, le premier groupe, qui libérait continuellement, a perçu les arômes plus intensément que le deuxième groupe (Mestres et al., 2005).

Malgré les contradictions, ces études mesurant la libération des composés d'arôme au cours du temps et la perception sensorielle statique, ont apporté de nouvelles connaissances sur le lien libération/perception. Ce processus semble être compliqué à élucider de par l'implication des variabilités interindividuelles, des interactions inter modales mais aussi de par le choix de la matrice alimentaire et de sa composition. Cependant, le choix d'un panel unique semble être plus approprié que deux panels distincts pour essayer de comprendre le lien entre la libération des composés d'arôme et la perception sensorielle.

### **5.2.3. Libération des composés d'arôme *in vivo* et perception sensorielle dynamique**

L'étude de la perception sensorielle dynamique permet de mesurer les changements de perception au cours de la consommation d'un produit alimentaire. Les deux méthodes principalement utilisées sont le Time Intensity (TI) et la Dominance Temporelle des Sensations (DTS).

### a. Méthode du TI

La méthode du TI appliquée à la thématique libération/perception est bien décrite dans la littérature, mais la majorité des travaux ont été menés sur deux panels distincts. Par exemple, Miettinen et al., (2004) ont utilisé cette méthode pour étudier l'effet de la teneur en matière grasse dans des laits aromatisés à la fraise. Le lait à faible teneur en matière grasse a prolongé la durée de présence du linalol dans la cavité buccale alors que la cinétique de libération du butyrate d'éthyle est restée inchangée entre les différents échantillons. Concernant les données sensorielles, l'ajout de matière grasse a réduit l'intensité maximale ( $I_{max}$ ) perçue du linalol et augmenté celui de la fraise. Ces résultats ne sont donc que partiellement en accord avec les études évoquées précédemment qui tendent à montrer une diminution de la libération des composés d'arôme dans les produits les plus gras. Une des explications possible pourrait être les propriétés physico-chimique des molécules et notamment leur caractère plus ou moins lipophile. Il est donc particulièrement compliqué de généraliser ces résultats. La méthode du TI a également été utilisée par Haahr et al., (2003) sur des chewing-gums contenant différents types de sucres et différentes quantités d'huile aromatisée. Le profil de libération des composés d'arôme a été dépendant du sucre ajouté. En effet, l'intensité maximale a été plus importante dans les chewing-gums contenant du xylitol que dans ceux contenant du sorbitol. Ce constat, retrouvé sur les données de perception temporelle, pourrait s'expliquer par la différence de rigidité apportée par les deux texturants (le sorbitol apporte plus de rigidité que le xylitol). La mise en relation des données de libération et de perception au cours du temps n'a mis en évidence qu'une différence entre les deux méthodes : la diminution de la perception aromatique après 2 minutes de consommation n'a pas été retrouvée sur le signal aromatique enregistré par l'APCI-MS. Un phénomène d'adaptation ou les différences physiologiques entre les deux panels telles que la composition salivaire, le volume de la sphère orale ou encore le comportement masticatoire pourraient être à l'origine de cette différence. De façon similaire, Schober et Peterson (2004) ont observé une bonne corrélation des données de perception et de libération sur les deux premières minutes de consommation d'un bonbon.

Tout comme en mode statique, la perception dynamique par la méthode de TI a permis d'explorer les variations interindividuelles. Malheureusement, la majorité des études ont travaillé sur de petits effectifs. Le nombre de sujets réduit peut être un biais, particulièrement lorsque les panels sont différents entre les deux types de mesures. Pour y remédier, il est nécessaire d'augmenter le nombre de dégustateurs ce qui rend la charge de travail considérable. La comparaison de 15 profils de libérations avec 24 mesures de TI a permis à Hort et al., (2004) de classer les dégustateurs dans différents groupes. Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés à l'effet du saccharose dans des solutions d'acétate d'isoamyle (arôme banane). Différents volumes de solution ont été délivrés

continuellement dans la cavité buccale des dégustateurs à l'aide d'une pompe contrôlée par ordinateur. Dans la première expérience, la solution de saccharose a été remplacée par de l'eau entre 30 et 120 secondes avant de réintroduire la solution de saccharose (à 120 secondes). Dans la seconde expérience, la solution de saccharose a été introduite graduellement dans la solution d'eau. Les résultats du premier test ont indiqué une diminution immédiate des notes du descripteur banane à 30 secondes donc lors de l'introduction de l'eau. Sur le second test, les notes du descripteur banane ont augmenté graduellement avec le gradient de concentration du saccharose. L'exploitation des données a montré de faibles variations de perception de l'arôme banane chez certains sujets alors que d'autres ont évalué ce descripteur selon le gradient de saccharose. La libération de l'acétate d'isoamyle dans la cavité buccale n'a pas été affectée par le niveau de sucre. Par conséquent, cette étude a mis en évidence (1) une interaction saveur/arôme et (2) une modulation de la perception de l'arôme banane par le niveau de sucre variable entre les individus.

Pour pouvoir comparer au mieux les données sensorielles et physico-chimiques, Ovejero-Lopez et al., (2004) ont utilisé un panel unique composé de 4 volontaires. En faisant varier le type de sucre et le niveau d'huile dans des chewing-gums, ces auteurs ont montré une réduction de la quantité libérée et de la perception de l'arôme avec l'augmentation de la teneur en matière grasse. A nouveau, une importante variabilité interindividuelle a été observée pour les deux types de mesures.

En conclusion, la méthode du temps intensité a permis de suivre la perception sensorielle d'un descripteur au cours de la consommation d'une matrice alimentaire. Par ailleurs, l'utilisation du même panel sur les mesures de libération et les mesures sensorielles a montré de bonnes corrélations entre les arômes libérés dans la cavité buccale du dégustateur et la perception. Les divergences décrites dans la littérature semblent provenir des interactions cognitives, des limites de sensibilité de l'Homme et des phénomènes d'adaptation. Le choix de classer les sujets en fonction de leur profil de libération et de perception semble être un bon choix méthodologique, mais il nécessite l'utilisation d'un panel unique composé d'un nombre important de sujets. La principale contrainte de la méthode du TI reste l'évaluation d'un descripteur unique par séquence de consommation. Par conséquent, les produits étudiés sont relativement simples et pas toujours au plus près de la réalité. Pour travailler sur des produits plus complexes, la méthode de la dominance temporelle des sensations pourrait être plus appropriée.

## b. Méthode du DTS

En lien avec la libération des composés d'arôme, la méthode DTS a par exemple été utilisée pour comprendre l'impact de la taille et de la dureté des morceaux de fruits sur la libération aromatique et la perception sensorielle de yaourts aromatisés à la poire (Mesurolle et al., 2013). Six molécules suivies par PTR-MS : « Cis-3-hexenyl acetate », « hexyl acetate », « isoamyl acetate », « furaneol », « diacetyl » correspondaient respectivement aux descripteurs sensoriels: fraîcheur verte, caramel, banane, fruit cuit et beurre. Dans cette étude, le protocole de consommation des yaourts a été imposé. Malgré la variabilité interindividuelle, le profil de libération aromatique globale a montré une rapide augmentation de libération des composés d'arôme immédiatement après la déglutition. Ensuite, l'intensité du signal a diminué progressivement pour retrouver son niveau de base. La libération des composés d'arôme n'a pas été affectée par la taille des morceaux de fruits au contraire de la rigidité. En effet, la consommation de yaourts contenant des morceaux de fruits plus rigides a provoqué une augmentation de l'intensité maximale de Cis-3-hexenyl acetate, hexyl acetate et furaneol avant déglutition et de Cis-3-Hexenyl acetate après déglutition. Les courbes de DTS ont indiqué une dominance du descripteur poire indépendante du type de yaourt (taille et dureté des fruits). L'augmentation de la dureté des morceaux de fruits a réduit la dominance des attributs sucré et beurre mais l'augmentation du  $I_{max}$  avant déglutition n'a pas impacté la perception sensorielle. En revanche, l'intensité maximale de Cis-3-hexenyl acetate plus élevée après déglutition, peut être reliée à l'augmentation de la note fraîcheur verte. Pour finir, l'augmentation de l'intensité maximale de la molécule de furaneol correspondant à l'attribut caramel n'a pas pu être reliée à la perception sensorielle (Mesurolle et al., 2013).

L'ensemble des résultats de cette étude montrent, comme cela était déjà le cas avec le TI, la difficulté à corréler la libération des composés d'arôme et perception sensorielle lors de la consommation d'une matrice alimentaire complexe. Plusieurs explications sont possibles. Dans certains cas, les arômes libérés par la matrice alimentaire peuvent être observés par spectrométrie de masse mais à un niveau inférieur de celui du seuil de perception. Par ailleurs, la présence d'un arôme dit dominant peut masquer la perception des autres composés. Si la méthode DTS illustre parfaitement le séquençage des sensations perçues au cours du temps, le traitement des données s'effectue sur l'ensemble du panel, éliminant l'information de la variabilité interindividuelle.



### 5.3. Mesure simultanée de la libération des composés d'arôme *in vivo* et de la perception sensorielle dynamique

Différentes stratégies ont jusqu'ici été présentées sur des boissons, des modèles de gels ou des produits alimentaires, en utilisant des méthodes statiques ou dynamiques, à partir de deux panels distincts ou d'un panel unique mais les résultats sont parfois contradictoires. La majorité des études ont souligné la complexité du phénomène libération/perception due aux paramètres physico-chimiques de la matrice, aux phénomènes d'interactions et aux variations interindividuelles. Pour ces raisons, une dernière stratégie consiste à étudier simultanément la libération aromatique en bouche et la perception sensorielle associée. Dans cette partie, nous allons passer en revue les différents paramètres de composition de la matrice et les différences interindividuelles qui ont été étudiées par mesure simultanée de la libération des composés d'arôme *in vivo* et de la perception sensorielle.

#### 5.3.1. Impact du saccharose

Davidson et al. (1999) sont parmi les premiers à avoir mesuré simultanément la libération aromatique et la perception sensorielle en suivant la méthode du TI. Les résultats de cette étude menée sur un chewing-gum aromatisé à la menthe, ont montré que la perception sensorielle de l'ensemble du panel ne suivait pas la courbe moyenne de libération de l'arôme. De façon surprenante, la courbe de libération du saccharose (obtenue par prélèvement d'échantillons de salive) suivait parfaitement la perception de l'arôme d'intérêt. Ce résultat laisse à nouveau supposer l'implication d'une interaction saveur/arôme. Une autre hypothèse serait le phénomène d'adaptation à l'arôme avec le temps qui pourrait coïncider avec le niveau de saccharose (Overbosch et al., 1991). Afin de limiter ces phénomènes d'adaptation, le produit étudié doit avoir un faible temps de résidence en bouche (Saint-Eve et al., 2009). Dans l'étude de Lethuaut et al. (2004), l'augmentation du saccharose dans les gels a induit une augmentation de la perception aromatique et ce, malgré l'absence de l'effet du saccharose sur la libération des composés d'arôme. Ce résultat représente la moyenne sur l'ensemble du panel mais n'est pas applicable à chacun des individus (Lethuaut et al., 2004). Par conséquent, les interactions saveur/arôme ne semble pas impacter les individus de façon similaire. A nouveau, le manque d'effectif conduisant à moyenniser les résultats peut masquer les variations interindividuelles.

### 5.3.2. Impact de la teneur en arôme

L'influence de la concentration en composé d'arôme a par exemple été étudiée par Hollowood et al. (2000) dans des gels aromatisés à la carvone. La quantité d'arôme libérée et la perception du descripteur menthe ont tous deux été corrélés à la concentration de carvone dans le gel. Cependant, l'intensité maximale perçue est atteinte avant l'intensité maximale de libération probablement à cause du phénomène d'adaptation. Ces résultats, confirmés par Cook et al. (2005) sur l'arôme de romarin, montrent l'importance de la concentration en arômes dans un aliment sur la libération et par conséquent, sur la perception.

### 5.3.3. Impact des agents de textures

La texture des aliments influence le comportement masticatoire et la libération aromatique (Mestres et al., 2005, Saint-Eve et al., 2006a). Une façon de moduler la texture consiste à changer la teneur en protéine (Mestres et al., 2006). Dans l'étude de Mestres et al. (2006), les gels contenant de faible quantité de protéines, ont induit une libération des arômes rapide au cours de la mastication. Au contraire, pour les gels plus rigides (qui contiennent plus de protéines), il a fallu attendre la phase de déglutition pour obtenir l'intensité maximale de libération des composés d'arôme. Dans l'étude de la texture, il est donc important d'arriver à dissocier la texture de la composition. Par ailleurs, un lien entre la libération des composés d'arôme et la perception associée a été observé. En effet, la texture des gels qui impacte la libération des arômes impacte aussi leur perception sensorielle. L'ajout de protéine a également été le sujet d'étude de l'article de Saint-Eve et al. en 2006a. Les résultats de cette étude ont mis en évidence une implication plus importante de la structure du produit que de sa composition en protéines. En effet, à composition identique, la diminution de la viscosité des yaourts par traitement mécanique a favorisé la libération (et la perception) des composés d'arôme (Saint-Eves en 2006a).

L'ajout d'agents texturants à différentes concentrations a été la stratégie utilisée par Beak et al. (1999) pour modifier la texture des gels. L'augmentation de la concentration en gélatine a provoqué une diminution de la perception aromatique en accord avec le profil de libération. En utilisant la même méthodologie, Weel et al. (2002) ont observé une libération dans la cavité buccale des composés de diacétyle et de butyrate d'éthyle indépendante de la quantité de gélatine introduite dans les gels contrairement à la perception aromatique qui diminue quand la rigidité augmente. Dans ce cas, il est possible que la différence de fermeté entre les gels n'ait pas été suffisamment importante pour mettre en évidence des variations du profil de libération des arômes

(Weel et al., 2002) . En travaillant sur des bonbons aromatisés (hexanoate d'éthyle, diacétyl, hex-3-en-1-ol et gamma-décalactone), Deléris et al. (2011) ont mis en évidence, au travers d'un protocole de consommation imposé, l'importance de la structure sur la perception temporelle des sensations. A titre d'exemple, le descripteur fraise (dû à la libération de l'hexanoate d'éthyle) a été jugé comme étant dominant dans les gels les plus liquides (sans gélatine). A 2% de gélatine, c'est le descripteur « vert » qui prend le dessus (dû à la libération l'hex-3-en-1-ol). Entre 5 à 15% de gélatine, la sensation dominante devient une note de beurre (dû à la libération du diacétyl). Par contre, lorsque le protocole de consommation était libre, seul le descripteur fraise a été dominant. Le temps de résidence en bouche, plus long dans le cas du protocole imposé permettrait au dégustateur de percevoir plusieurs descripteurs. Vous l'aurez compris, « prendre le temps de mastiquer vous permettra de profiter pleinement de votre palais de la flaveur » Prof. Henri Joyeux.

#### **5.3.4. Impact de la teneur en matière grasse**

L'impact de la teneur en matière grasse sur la libération et la perception des composés d'arôme a également été étudié au moyen des mesures simultanées (Brauss et al., 1999a, Shojaei et al., 2006). L'étude de Brauss et al. (1999a) conduite sur des yaourts à différents taux de matière grasse a confirmé les résultats obtenus par la majorité des études cités précédemment, à savoir une réduction de la quantité d'arômes libérée avec une augmentation du niveau de gras. Malgré le fait que l'intensité aromatique perçue ait probablement été à peine supérieure au seuil de perception, les résultats allaient dans la même direction que les profils de libération (Brauss et al., 1999a).

#### **5.3.5. Impact de la variabilité interindividuelle**

Bien que la majorité des études ait choisi de travailler sur des produits relativement simples, nombreuses sont celles qui ont observé des variations interindividuelles de libération et de perception des arômes. Dans l'étude de Pionnier en 2004c sur des fromages, les descripteurs : fruité, salé, acide, rance et moisi ont été associés respectivement aux ions d'hexanoate d'éthyle, de sodium, d'acide citrique, d'acide butyrique et de 2-heptanone. Les variations entre les individus ont été importantes tant sur la libération que sur la perception. A titre d'exemple, les sujets dont le  $T_{max}$  de l'acide, du salé et du moisi étaient retardés (par rapport aux autres sujets), libéraient aussi l'acide citrique, le sodium et la 2-heptanone plus tardivement. Le manque de corrélations entre certaines données peut à nouveau s'expliquer par la complexité du processus de perception (phénomène d'adaptation, paramètres physiologiques, structure des produits...). Par ailleurs, l'étude des

paramètres oraux a mis en évidence des liens entre la libération des composés d'arôme, l'activité des muscles, les performances de mastications et la respiration (Pionnier et al., 2004b).

L'ensemble des résultats soulignent qu'il n'est pas évident, avec les méthodes de mesures actuelles, d'établir des relations claires entre la libération des composés d'arôme et la perception sensorielle. Néanmoins, la perception des arômes semble être, au moins partiellement, fonction de la dynamique de leur libération dans la sphère orale. Par ailleurs, les propriétés de l'aliment semblent moduler la libération des composés d'arôme mais aussi la perception sensorielle. La majorité des auteurs se sont concentrés sur les effets produits. Certains d'entre eux ont tout de même mis en évidence des différences de profil de libération des composés d'arôme entre les individus mais sans pour autant faire le lien avec leur niveau de sensibilité sensorielle. Les paramètres physiologiques tels que le comportement de mastication, la salivation, la déglutition, la respiration ou le volume oral, très peu pris en compte dans les études, semblent avoir une influence sur les profils de libération et sur la perception sensorielle (Pionnier et al., 2004b). Si tel est le cas, ils pourraient alors être à l'origine de la variabilité interindividuelle tant au niveau de la libération que de la perception. La partie qui suit a donc pour objectif de comprendre l'origine des différences de libération entre différents produits et entre différents sujets.

## 6. Paramètres impliqués dans la libération des composés d'arôme

### 6.1. Propriétés de l'aliment impliquées dans la libération des arômes

La libération des composés aromatiques d'un produit alimentaire résulte du (1) coefficient de partage entre l'aliment et la phase gazeuse (Martuscelli et al., 2008) et de (2) leur mobilité entre les différentes phases de l'aliment (phase huile, phase air, phase eau...) (Guinard et al., 1995, Secouard et al., 2003, Siefarth et al., 2011). Ainsi, la libération des molécules aromatiques va dépendre de la composition et de la structure de la matrice.

#### 6.1.1. Impact de la composition de l'aliment

La composition d'un aliment peut directement moduler la libération des composés d'arôme en les liant ou en les piégeant dans la matrice. En plus de l'eau, composé important dans les aliments, les lipides, les protéines et les glucides sont les constituants majoritaires de la plupart des matrices alimentaires. Ils feront donc l'objet de cette partie.

### *Les lipides*

L'effet de la teneur en matière grasse d'un aliment sur la libération des composés d'arôme est bien décrit dans la littérature. En effet, la teneur en matière grasse modifie le coefficient de partage des arômes entre les phases aliment, salive et air, en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (Delahunty et al., 1996). Plusieurs études ont montré que les composés les plus lipophiles seraient les plus influencés par la teneur en lipides (Kersiene et al., 2008, Martuscelli et al., 2008). En effet, l'augmentation de la teneur en matière grasse favorise la rétention des composés lipophiles dans la matrice contrairement aux composés hydrophiles.

En 2009, Burseg et al. (2009) n'ont pas observé de relations entre la teneur en lipides de biscuits et la libération de la molécule d'anéthole. La libération de cette molécule serait modulée par d'autres composants des biscuits comme par exemple la quantité de farine. En effet, en augmentant la quantité de farine, on augmente la quantité d'amidon. Or, des interactions physico-chimiques entre l'amidon et la molécule d'arôme vont retenir l'arôme dans la matrice (Arvisenet et al., 2003). L'étude de la teneur en matière grasse sur la libération des composés d'arôme semble particulièrement complexe puisqu'elle fait intervenir la composition de l'aliment mais également sa structure comme nous l'avons vu plus haut.

### *Les protéines*

L'ajout de protéines (stabilisant, épaississant, gélifiant) dans les aliments est une pratique courante des industries agroalimentaires. Plusieurs auteurs se sont intéressés aux interactions entre les protéines et les molécules aromatiques mais les résultats diffèrent (Andriot et al., 2000, Chobpattana et al., 2002, Guichard, 2002, Boland et al., 2004, Tan et al., 2008, Zafeiropoulou et al., 2012). Les contradictions entre les différentes études proviendraient des caractéristiques physico-chimiques des arômes utilisés. Cependant, les auteurs semblent être en accord sur le fait que les interactions arôme/protéine sont plus importantes avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée entre deux composés d'une même famille. Par ailleurs, le coefficient de partage qui représente la libération des composés aromatiques est affecté par la solubilité, la volatilité et l'hydrophobicité des arômes (Hansson et al., 2003, van Ruth et al., 2003, Kopjar et al., 2010).

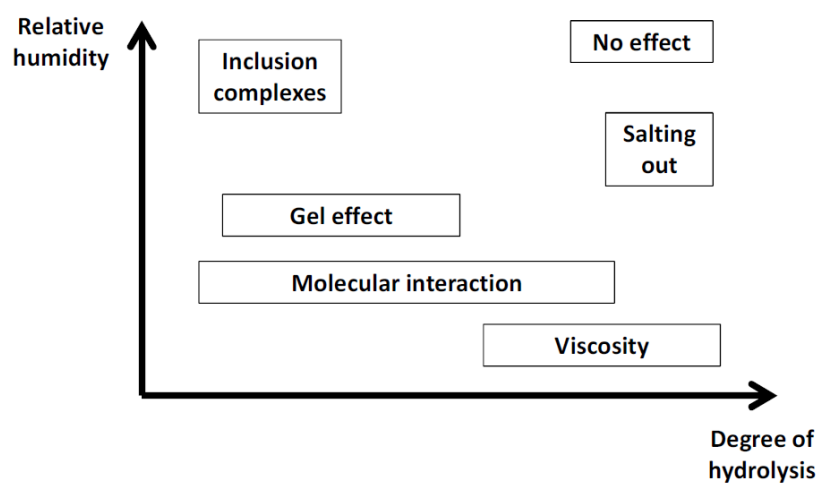
Enfin, la nature et la teneur en protéines qui modulent les propriétés mécaniques d'un aliment impactent la libération des molécules aromatiques. D'un point de vue général, la libération des arômes diminue avec la rigidité des gels (Carr et al., 1996, Baek et al., 1999, Déleris et al., 2011b).

### *Les glucides*

Les glucides appelés historiquement hydrate de carbone se distinguent en trois classes (les mono(di)saccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides) selon leurs poids moléculaires.

L'ajout de mono(di)saccharides comme le saccharose ou le glucose dans une matrice entraîne une augmentation de la volatilité des arômes polaires contrairement aux arômes apolaires. Ce phénomène serait associé aux liaisons des glucides avec les molécules d'eau qui favoriseraient la libération des molécules polaires (Nahon et al., 1998, Lubbers et al., 2003, Rabe et al., 2003). Cependant, les études menées *in vivo* sur le potentiel effet des mono (di) saccharides restent limitées.

La rétention des arômes contenus dans une matrice alimentaire contenant des polysaccharides est essentiellement due à (1) la diffusion des arômes dans l'aliment et (2) aux interactions physico-chimiques entre les arômes et l'aliment (Delarue et al., 2006). Une augmentation de la température et/ou de la teneur en eau d'une matrice alimentaire favorisent la diffusion des composés aromatiques. De façon similaire, la diffusion des arômes augmente lorsque ceux-ci sont de plus faibles poids moléculaires. Delarue et al., 2006 ont représenté les interactions arômes/polysaccharides (Figure 15) qui dépendent de l'humidité de la matrice et du degré d'hydrolyse des polysaccharides.



**Figure 15 : Interactions principales entre les arômes et les polysaccharides en fonction de l'humidité relative de la matrice et du degré d'hydrolyse des polysaccharides (Delarue et al., 2006).**

Une augmentation de la viscosité par ajout de polysaccharides (épaississants, stabilisants) a tendance à limiter la libération des molécules aromatiques d'une matrice (Secouard et al., 2003, Savary et al., 2007, Jouquand et al., 2008). Comme pour les lipides et les protéines, la teneur en glucides et le type de glucide ajouté dans une matrice affectent la libération des composés d'arôme rendant les conclusions parfois contradictoires et la compréhension de ces mécanismes complexe.

### 6.1.2. Impact de la structure (texture) d'un aliment

La texture, définie comme: « la manifestation sensorielle et fonctionnelle des propriétés structurales et mécaniques des aliments, détectée par la vue, l'ouïe, le toucher et les sensations kinesthésiques » (Szczesniak, 1998) peut être caractérisée selon deux approches distinctes: l'analyse sensorielle et l'analyse instrumentale.

L'impact de la texture sur la libération des composés aromatiques a été principalement étudié sur des matrices liquides ou semi-solides (gels, fromages frais, yaourts, crèmes-desserts, chewing-gum) (Boland et al., 2004, Ovejero-Lopez et al., 2004, Aprea et al., 2006, Boland et al., 2006, Mestre et al., 2006, Saint-Eve et al., 2006a, Gierczynski et al., 2007). En effet, certains auteurs ont mis en évidence la diminution de la libération des arômes lorsque la viscosité augmente (Lethuaut et al., 2004, Mestres et al., 2005, Mestres et al., 2006, Saint-Eve et al., 2006b, Tournier et al., 2009, Lubbers et al., 2010). D'autres au contraire ont montré qu'une augmentation de la viscosité entraîne une augmentation de la libération des arômes (Van Ruth et al., 2004, Gierczynski et al., 2007). Enfin, des études n'ont pas mis en évidence la contribution de la texture sur la libération des arômes (Weel et al., 2002, Mestres et al., 2005, Mestres et al., 2006). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par le fait que la majorité de ces auteurs ont modifié la texture des produits en modulant leur composition (Lethuaut et al., 2004, Van Ruth et al., 2004, Mestre et al., 2005, Saint-Eves et al., 2006a).

Ainsi, distinguer la part due à la composition de celle due aux variations de la texture sur la libération des composés aromatiques semble particulièrement compliqué (Cayot et al., 2008). Pour y remédier, des auteurs avaient pour objectif de moduler la texture sans changer la composition de la matrice (Saint-Eve et al., 2006b, Lafarge et al., 2008, Tournier et al., 2009, Lubbers et al., 2010). Par exemple, il a été possible de modifier la texture de crèmes desserts en faisant varier la vitesse de cisaillement durant leur fabrication (Tournier et al., 2009, Lubbers et al., 2010). Ainsi, l'augmentation de la vitesse de cisaillement entraîne une diminution de la viscosité des produits qui ne reviennent pas à leur état initial (Tournier et al., 2009). Dans son étude, Lubbers et al. (2010) a mis en évidence une augmentation de la libération des composés d'arôme pour les produits moins visqueux qui proviendrait de l'augmentation de la diffusion des arômes. Dans l'étude de Saint-Eves et al. (2006b) ces résultats n'ont été valables qu'après déglutition. Leur hypothèse a été que les produits moins visqueux recouvrent d'avantage les parois de la bouche augmentant la surface d'échange. Enfin, aucune différence de libération n'a été observée par Tournier et al. (2009). Ces discordances peuvent provenir de différences de texture plus ou moins grandes entre les échantillons et/ou de la nature des composés d'arômes étudiés.

Il est important de garder à l'esprit que ces auteurs ont travaillé sur des matrices différentes, sur des agents de texture différents et sur des composés aromatiques différents. Par ailleurs, d'une part les produits ne se déstructurent pas de façon similaire en bouche (Engelen et al., 2005, Foster et al., 2006, Woda et al., 2006) et d'autre part, pour un produit donné, la destruction en bouche va dépendre du sujet.

## **6.2. Paramètres physiologiques impliqués dans la libération des arômes**

Un certain nombre d'auteurs ont mis en évidence l'influence des caractéristiques physiologiques orales sur la libération des composés aromatiques (Mestres et al., 2006, Tarrega et al., 2007, Poinot et al., 2009, Genovese et al., 2009).

### **6.2.1. Mastication et salivation**

La composition, la structure et la forme d'un aliment sont des éléments clefs qui influencent l'ensemble du processus oral. La mastication, première étape de la consommation, est un processus physiologique et physico-chimique complexe conduisant à la réduction de la taille des particules pour favoriser la déglutition (Chen, 2009, Foster et al., 2011). Elle résulte de l'activité de plusieurs muscles de la mâchoire, des dents, de la langue et du palais. Au cours de la mastication, l'aliment se déstructure augmentant la surface d'échange entre le produit, l'air et les muqueuses de la bouche. Par conséquent, ce processus favorise la libération des composés aromatiques et sapides (Overbosch et al., 1991). Plusieurs études menées chez l'Homme ont montré que le nombre de mouvements masticatoires et la fréquence de mastication sont positivement corrélés à la concentration de molécules volatiles dans le nez (Hansson et al., 2003, Pionnier et al., 2004a, Haahr et al., 2004). Il a aussi été montré que la libération aromatique dépend du comportement masticatoire et de la composition du produit (Tarrega et al., 2007). En effet, la composition d'une matrice va déterminer la texture de l'aliment et par conséquent, l'activité masticatoire mise en œuvre pour former un bol alimentaire et donc, la libération des composés d'arôme. La majorité des études réalisées par électromyographie (EMG) ont révélé une augmentation de l'effort masticatoire avec l'augmentation de la fermeté du produit (Peyron et Mioche, 1993, Wilson et Brown, 1997). Des mesures en spectrométrie de masse (PTR-MS), (Bolan et al., 2006) ont montré une plus forte libération des arômes dans la cavité nasale pour les gels de gélatine les plus fermes.



L'influence de la mastication sur la libération des arômes a aussi été soulevée par des auteurs qui ont étudié la libération des arômes. Bien que la majorité des travaux visent à étudier l'impact de la modification de la composition d'une matrice alimentaire sur la libération aromatique, certains auteurs se sont focalisés sur les différences de mastication entre les sujets. Ingham et al. 1995 ont émis l'hypothèse que les différences de profil de libération des composés d'arôme observés lors de la consommation de bonbons pouvaient provenir d'une variation des paramètres de mastication. Cette hypothèse a été reprise par Hollowood et al. (2000) qui ont observé des différences de libération de la carvone de gels de gélatine entre les individus par des mesures conduites en APCI-MS. Malheureusement, aucune de ces deux études n'a caractérisé le comportement masticatoire des sujets pour valider cette hypothèse. Plus tardivement, des études ont permis de mettre en évidence d'importantes variations interindividuelles dues aux paramètres oraux et à leur impact sur la libération aromatique (Pionnier et al., 2004b). En effet, l'augmentation de la fréquence des coups de dents et de l'activité des muscles favorisent la libération des composés d'arôme. Dans ce cas, la surface de contact entre l'aliment et la phase gazeuse augmente, ce qui favorise le transfert des arômes de la matrice vers la phase gazeuse (Pionnier et al., 2004b).

A l'activité masticatoire s'ajoute la sécrétion salivaire. Ce liquide biologique produit majoritairement par les glandes parotides, sous mandibulaires et sublinguales (Pedersen et al., 2002) contribue à la dégradation de l'aliment par les enzymes qu'il contient et ses capacités d'hydratation. Au contact de la salive, l'aliment va se dissoudre et libérer des composés odorants et sapides. De plus, la salive va lubrifier le bol et compacter les particules pour favoriser la déglutition. Le flux salivaire au repos est environ de 0,5 mL/min. La quantité de salive sécrétée par une stimulation alimentaire varie en fonction de la matrice (Tournier et al., 2014). Ainsi un pain de seigle provoque une sécrétion de salive plus importante que les autres pains (baguette artisanales, baguette industrielle, pain toasté), et ce, malgré un nombre de cycle masticatoire identique entre les produits. Cette étude montre que la composition du pain modifie la sécrétion salivaire et dans cet exemple précis, la présence de fibres dans le pain de seigle pourrait stimuler la sécrétion salivaire. Par ailleurs, la baguette artisanale provoque une salivation supérieure à celle du pain industriel. Ce résultat peut s'expliquer par une différence de structure entre les pains. Ainsi, les ingrédients, la structure et la saveur des produits impactent significativement la sécrétion salivaire (Tournier et al., 2014).

En parallèle, de grandes différences de flux salivaires ont été observées entre les individus (Neyraud et al., 2003, Pionnier et al., 2004b, Engelen et al., 2005, Tournier et al., 2014, Méjean et al., 2015). Par exemple, Neyraud et al. (2003) ont mesuré le flux salivaire au cours de la mastication d'un film plastique de paraffine sur papier (Parafilm<sup>TM</sup>) sur 10 sujets. Les résultats ont montré une variation d'un facteur 10 (0,4 à 3,9 g/min). De par la difficulté de prélèvement de la salive durant une

stimulation alimentaire, la majorité des études visant à comprendre l'impact de la salive sur la libération des composés volatils ont été menées *in vitro*. En travaillant avec de la salive artificielle (Boland et al., 2004, Genovese et al., 2009) et de la salive réelle (van Ruth et al., 2000, Buettner et al., 2002, Genovese et al., 2009) ces études préliminaires ont montré qu'en fonction des composés aromatiques étudiés et de la matrice alimentaire, la salive peut être impliquée dans la rétention, la dilution et la libération. Cependant, au vu de la variabilité des conditions expérimentales, aucune conclusion n'a pu être établie. Quelques études ont tout de même été menées *in vivo* mais les conclusions sont contradictoires. Selon Haahr et al. (2004), l'augmentation du volume salivaire durant la consommation de chewing-gum retiendrait les composés volatils en phase aqueuse, limitant ainsi la proportion d'arômes en rétro olfaction. Au contraire, Pionnier et al. (2004b) n'ont observé aucun lien entre le flux salivaire et la libération aromatique en bouche en travaillant sur une matrice fromage.

En bouche, la mastication et la salivation participent largement à la destruction des aliments et favorisent la libération des composés aromatiques vers les récepteurs olfactifs. Malgré l'adaptation de l'activité masticatoire à la texture du produit consommé, il existe une grande variation entre les sujets dont il faut tenir compte dans les travaux visant à étudier la libération aromatique de matrices qui nécessitent un processus de mastication (principalement les matrices solides ou semi solides).

### 6.2.2. Velum

Au cours de la consommation d'un aliment, les molécules aromatiques libérées atteignent les récepteurs olfactifs de la cavité nasale en empruntant la voie rétro-nasale (Figure 5). Cependant, le transfert de ces molécules de la cavité buccale vers la cavité nasale n'est pas un processus continu (Buettner et al., 2001, Buttner et al., 2002, Mestres et al., 2006, Gireczynski et al., 2008). Par des méthodes de vidéofluorescence et d'imagerie par résonance magnétiques en temps réel, Buettner et al. (2001 et 2002) ont montré que les transferts gazeux par voie rétro-nasale sont dépendants de la position du voile du palais (velum). Ce velum, situé en prolongement du palais, joue un rôle de barrière entre la cavité buccale et le pharynx. En 2003, Hodson et al. ont montré que les actions de mastication provoquaient un entrainement de l'air de la cavité buccale vers la cavité nasale grâce à la mobilité du vélum. Ce sont les muscles de la langue et les muscles masticatoires qui permettent l'ouverture et la fermeture du voile du palais au cours de la mastication mais aussi lors de chaque déglutition. Ainsi, en fonction de l'aliment et de son mode de consommation, la position du vélum varie au cours de la transformation de l'aliment dans la bouche, induisant l'ouverture ou la fermeture de la barrière entre la cavité buccale et la cavité nasale et par conséquent le transfert ou

non des composés d'arôme. Plus récemment, Mestre et al. (2006), Gierczynski et al. (2008) et Repoux et al. (2012a) ont mis en évidence une grande variabilité des profils de libération des arômes entre les sujets. En effet, alors que certains sujets libèrent des molécules aromatiques dès la mise en bouche de la matrice alimentaire, d'autres ne libèrent pas le moindre composé d'arôme avant la première déglutition. Par ailleurs, Repoux et al. (2012a) ont observé des différences d'ouverture du velum en fonction des mouvements masticatoires et/ou des mouvements de la langue. Ainsi, certains sujets libèrent des composés d'arôme à chaque évènement alors que d'autres ne libèrent des arômes qu'au moment de la déglutition (Repoux et al., 2012a). Ainsi, pour pouvoir étudier plus précisément la libération des arômes au cours de la consommation, il est important de prendre en considération le fonctionnement du velum.

### 6.2.3. Flux respiratoire

En 2002, Linforth et al., ont observé des différences considérables entre les profils de libération d'arôme obtenus par prélèvement de la phase gazeuse dans la cavité buccale (mouthspace) et ceux obtenus par prélèvement dans la cavité nasale (nosespace). La concentration de composés volatils dans le nez serait modulée par le transport de ces composés de la cavité buccale vers la cavité nasale via le flux respiratoire. Les molécules les plus volatiles atteindraient le nez en plus grande quantité que les autres. Par ailleurs, les auteurs indiquent que la concentration de substances volatiles exhalées par le nez serait aussi affectée par l'absorption de ces composés au niveau de l'épithélium buccal et nasal. Bien que présentes dans la bouche, elles n'atteindraient pas les récepteurs olfactifs.

Dans une étude visant à mesurer la libération aromatique par spectrométrie de masse (APCI) au cours de la consommation de yaourts, Tréléa et al. (2008) ont intégré le flux respiratoire (mesuré à partir du signal de l'acétone dans les effluves nasals) dans un modèle mathématique prédictif de la libération des arômes en bouche. Dans ce modèle, le flux respiratoire a été un paramètre très important dans la modélisation de la libération des composés aromatiques. Un flux respiratoire moindre entraîne une persistance aromatique plus importante. Un flux respiratoire supérieur contribuerait à l'apport plus important des molécules volatiles au niveau des voies aériennes supérieures et par conséquent de l'air expiré (Hanaoka et al., 2001, Pionnier et al., 2004a). Plus tardivement, Doyennette et al. (2014) ont suggéré que l'augmentation de la fréquence respiratoire aurait un effet négatif sur la concentration des composés d'arôme dans le nez en favorisant leur élimination.

Certains auteurs se sont plus particulièrement intéressés aux différences interindividuelles (Pionnier et al., 2004, Repoux, 2012b). En effet, Pionnier et al. (2004a) ont montré une variabilité du flux respiratoire au repos mais aussi pendant la mastication d'une base fromagère. En effet, un flux respiratoire plus intense a pour conséquence une élévation du Cmax et de l'AUC de l'heptan-2-one et l'hexanoate d'éthyle. Ainsi, les auteurs émettent l'hypothèse qu'un flux respiratoire plus important contribue à un apport plus important des molécules odorantes dans l'air expiré des sujets. Cependant, les résultats du tmax et de la pente de la courbe n'étaient pas reliés aux paramètres oraux. Par ailleurs, le flux respiratoire des femmes semble moins important que celui des hommes (Repoux, 2012b). Ainsi, des différences de flux respiratoires pourraient contribuer à des différences de libération.

Au fil des paragraphes, nous venons de voir la complexité de la perception du gras. En effet, la perception du gras qui dépend des propriétés de l'aliment et des paramètres physiologiques de l'individu fait intervenir différentes modalités sensorielles. De plus, elle dépend de la libération des composés de la flaveur et particulièrement des composés d'arôme.

Ainsi, après avoir exposé le rôle du gras dans les aliments, l'objectif de la partie suivante consiste à étudier différents leviers de réduction de la matière grasse et leurs conséquences sur la perception sensorielle.

## **7. Stratégies de réduction du gras dans les aliments**

### **7.1. Rôle du gras dans les aliments et difficultés qu'engendre sa réduction**

La densité énergétique ingérée en Occident est à la hausse, tout comme la consommation de produits gras (Drewnowski and Popkin, 1997, Drewnowski, 2005). En France, la matière grasse représente 37 à 42% des apports quotidiens dont 16% seraient des acides gras saturés (Perrin et al., 2002, Astrog et al., 2004). Ces dernières années, l'amélioration de l'équilibre alimentaire de la population est devenue une priorité de santé publique et un enjeu majeur pour lutter contre des pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et l'obésité. Des plans de santé tel que le Programme National Nutrition Santé ont été mis en place pour améliorer les pratiques alimentaires de la population. L'un des objectifs est de limiter la consommation de matière grasse qui tient une place importante dans notre alimentation.

En plus d'être une source d'énergie contenant des acides gras essentiels, la matière grasse contribue à la texture, la saveur et l'arôme d'un aliment. Par conséquent, la quantité de lipides présente dans

un produit module sa palatabilité. Des études ont montré une préférence pour des aliments à haute teneur en matière grasse chez le rat (Ackroff et al., 1990) et chez l'homme (Bowen et al., 2003, Drewnowski 1995). Cette attraction envers les aliments gras pourrait provenir de la palatabilité qui est souvent liée à la densité énergétique et donc à la teneur en matière grasse puisqu'elle apporte 9 kcal par gramme alors que les glucides et protéines n'en apportent que 4. Au-delà de leurs fortes teneurs en lipides, ces aliments sont généralement riches en sucre et en sel. Ils sont alors particulièrement attrayants, et il est difficile d'y résister ! Compte tenu de l'importance des problèmes de santé publique, les industriels doivent s'adapter et prendre en compte les recommandations des politiques publiques. Ils doivent développer des produits « santé » contenant des niveaux de matière grasse réduits, sans pour autant modifier leurs propriétés organoleptiques. Cet objectif représente un réel challenge au vu du rôle important de la matière grasse dans un aliment. Il est bien connu que les lipides affectent les propriétés rhéologiques d'un aliment mais pas seulement. En effet, une réduction de la matière grasse peut moduler la perception sensorielle, et ce, malgré une éventuelle compensation par des agents de substitutions. Par exemple, des crèmes desserts moins grasses ont conduit au manque de lubrification dans la cavité buccale pouvant être désagréable (De Wijk et al., 2003). La matière grasse peut impacter l'humidité des gâteaux, la douceur et l'épaisseur des produits laitiers ou encore la jutosité de la viande (Drewnowski, 1997). Un autre rôle de la matière grasse consiste à moduler la perception aromatique des produits. C'est en modulant le coefficient de partage des composés volatils dans les aliments que les lipides peuvent modifier la libération des composés d'arômes et donc leur perception (Brauss et al., 1999b, Gierczynski et al., 2011). Ainsi, la matière grasse présente dans les matrices alimentaires impacte l'ensemble du processus en bouche et par conséquent la perception sensorielle.

## 7.2. Réduction du gras dans les aliments

Réduire la teneur en matière grasse des aliments semble être le moyen le plus efficace de diminuer leur densité énergétique (Smith et al., 1994). Cependant, réduire la matière grasse ne doit pas détériorer les propriétés organoleptiques des produits alimentaires. Comme discuté précédemment, la matière grasse a une influence majeure sur les propriétés physico-chimiques et donc sur la perception sensorielle. De multiples approches ont été développées pour tenter de réduire le niveau de gras sans impacter la perception du goût, des arômes, de la texture et du tapissage en bouche. Trois stratégies de réduction de la matière grasse seront développées dans ce chapitre : l'ajout d'un arôme, l'ajout d'un agent de texture et la température de service.

### 7.2.1. Ajout d'un arôme

La dimension olfactive tient une place importante dans la perception du gras. De ce fait, l'ajout d'arômes à connotation grasse pourrait permettre d'améliorer la sensation de gras perçue. Cette stratégie a d'ores et déjà permis la réduction du sel, dont la surconsommation entraîne des problèmes cardiovasculaire ou d'hypertension. A titre d'exemple, il a été montré que la présence d'arômes associés à des produits salés (sardine, jambon, fromage...) a permis d'augmenter la perception salée d'une solution aqueuse contenant du sel (Lawrence et al., 2009). Cette découverte a permis par la suite de compenser la réduction du sel dans les fromages par l'ajout d'arômes de type sardine et comté (Lawrence et al., 2011).

Dans le cas du gras, seuls quelques travaux ont été décrits dans la littérature (Tepper et al., 1994, Yackinous et al., 2000). Le lait à 5% de matière grasse contenant un arôme crème a été perçu comme étant aussi gras que celui à 10% de matière grasse non supplémenté en arômes (Tepper et al., 1994). Plus tardivement, Yackinous et al., 2000 ont étudié l'impact des arômes sur la perception sensorielle de produits de consommation courante. Dans cette étude, l'ajout d'un arôme beurre dans une purée de pommes de terre a augmenté la sensation de gras perçue. De façon similaire, des chips supplémentées en arôme crème et oignon ont été perçues comme aussi grasses que celles sans arômes ajoutés contenant de plus hautes teneurs en matière grasse. Cependant, cet effet semble être produit spécifique car il n'a pas été retrouvé dans toutes les matrices testées. En effet, l'addition d'un arôme chocolat blanc à un chocolat chaud ou d'un arôme laitier à une crème dessert à la vanille n'ont pas augmenté la perception du gras (Yackinous et al., 2000). Une des hypothèses discutée par les auteurs serait le manque de congruence des arômes utilisés avec la sensation de gras.

Une étude analogue modulant plusieurs paramètres de la matrice alimentaire a été menée par Frost et al. (2001). Ces auteurs ont montré que l'ajout d'épaississant, d'agent de blanchiment et d'arômes de type crème dans du lait à 0,1% de matière grasse a permis de mimer les propriétés sensorielles d'un lait à 1,3% de matière grasse. L'épaississant a permis l'obtention d'une texture plus crémeuse et d'un aspect plus proche du lait plus gras. L'agent blanchissant a été utilisé pour atténuer la transparence et les arômes ont, quant à eux, amplifiés la perception aromatique. Cette étude, qui confirme le caractère multimodale de la perception du gras, mène vers la seconde stratégie qui consiste à ajouter des agents de textures.

### 7.2.2. Ajout d'un agent de texture

Remplacer la matière grasse par des carbohydrates est une approche pertinente pour améliorer les propriétés nutritionnelles et technologiques (Thebaudin et al., 1997). En effet, certains carbohydrates seraient bénéfiques pour la santé en réduisant le risque d'hypertension, de diabète et des troubles gastro-intestinaux (Fuentes et al., 2010, Yu et al., 2009). Dans ce contexte, l'ajout de fibres a été utilisé pour réduire la teneur en matière grasse de produits carnés mais les résultats sont contradictoires (Hill et Prusa, 1989, Warner et Inglett, 1997, Pinero, 2008). En effet, la substitution de la matière grasse par des fibres n'a pas toujours fonctionné. La réduction de la matière grasse par ajout de fibre dans des aliments tels que les saucisses ou les steaks hachés est complexe car elle dépend du type de fibre ajouté, de la quantité de fibre ajoutée et de la composition de la matrice alimentaire. Cette complexité peut donc être à l'origine des divergences. Dans l'étude de Jiménez-Colmenero et al. (2010), les auteurs ont mis en évidence la possible substitution de la matière grasse par du gel de konjac, qui n'a pas impacté les qualités sensorielles des saucisses de Frankfort.

Les fibres ont également été utilisées dans d'autres matrices telles que des confiseries (Hadnadev et al., 2014). La substitution de la matière grasse par des maltodextrines dans des confiseries n'a pas modifié le goût (Hadnadev et al., 2014). Le score hédonique de l'odeur a été significativement plus important dans les confiseries réduites en matière grasse mais, l'appréciation de la texture a diminué avec le niveau de réduction de la matière grasse. Ainsi, l'ajout de fibres semble être une possibilité pour réduire le niveau de gras d'un aliment mais il dépend du type de fibre et du produit étudié.

### 7.2.3. Température de service

Des auteurs ont suggéré que le transfert de température entre l'aliment et la cavité orale serait un élément important dans la perception du gras (Prinz et al., 2007, Weenen et al., 2003). La sensibilité thermique a été étudiée pour vérifier si les récepteurs thermiques oraux sont suffisamment rapides pour jouer un rôle dans la perception du gras (Prinz et al., 2007). Les résultats ont montré que la langue et les lèvres sont capables de détecter de très faibles variations de températures. Par ailleurs, l'élévation de la conductivité thermique de l'aliment pourrait intervenir dans la perception du gras (Prinz et al., 2007).

Des chercheurs ont étudié l'impact de la température de service sur la perception du gras mais les résultats sont contradictoires (Mela et al., 1994, Engelen et al., 2003, Fuentes et al., 2013).

Mela et al. (1994) n'ont observé aucun effet de la température des émulsions huile/eau sur la perception du gras. Au contraire, Engelen et al., (2003) ont montré une augmentation de l'intensité du « creamy mouthfeel » et du « fatty after feel » avec l'augmentation de la température de service des crèmes desserts.

En parallèle, différents auteurs ont mis en évidence l'impact de la température sur la perception des saveurs (Bartoshuk et al., 1982, Calvino 1986, Paixao et al., 2014, Kim et al., 2015). En 1998, Calvino a montré que l'intensité sucrée était plus élevée lors de la consommation de solutions chauffées comparé aux solutions froides. De façon similaire, les soupes à 70 et 80°C ont été jugées comme étant plus salées que les mêmes soupes à 40, 50 et 60°C (Kim et al., 2015). Par ailleurs, une étude conduite sur le vin rouge a montré qu'un vin rouge est plus amer, astringent et acide à 10°C et 16°C qu'à 22°C (Ross et al., 2012). Parallèlement, les descripteurs aromatiques ont été plus nombreux dans le vin servi à 22°C qu'à 10 et 16°C.

Ainsi, les différentes études montrent que l'intensité des saveurs salé et sucré et des arômes augmente avec la température, alors que l'intensité de l'astringence, de l'acide et de l'amer augmente quand la température diminue.

## 8. Objectifs et démarche expérimentale

Comme nous venons de le voir au travers de l'état de l'art, la capacité de l'homme à détecter et à discriminer différents taux de matière grasse dans les aliments de consommation courante est très peu décrite dans la littérature comparée à celle des saveurs fondamentales. Les études qui se sont penchées sur la question ont majoritairement étudié non pas des aliments de consommation courante mais des acides gras libres ou des aliments modèles. Cette absence peut se justifier par la complexité de la perception du gras dite multimodale et par la difficulté à obtenir une gamme d'un aliment à différents niveaux de matière grasse. Dans ce contexte, nous avons souhaité **étudier la capacité des sujets humains à détecter et discriminer la teneur en matière grasse dans des aliments de consommation courante, la variabilité interindividuelle de cette capacité et la ou les origine(s) de cette variabilité.**

Dans un premier temps, et en lien avec le projet QualigrasPhy dans lequel s'inscrit ce travail, une première approche a été **de tester différents moyens de compenser la réduction du niveau de gras dans un aliment sans qu'il y ait d'impact sur la perception sensorielle du gras.** Par analogie avec les travaux effectués sur les saveurs salé et sucré, nous avons émis l'hypothèse qu'il était possible de garder la même sensation de gras en ajoutant des arômes dans une matrice laitière allégée en



matière grasse. Dans une matrice solide carné, et toujours en nous basant sur la littérature, nous avons émis l'hypothèse que la perception du gras pourrait être maintenue dans un produit allégé en ajoutant des fibres.

Cependant, la perception de la matière grasse est multimodale. Elle fait donc intervenir le système olfactif, le système gustatif et les sensations tactiles en bouche. Aussi, la modification d'une seule dimension sensorielle pouvait ne pas donner les résultats escomptés. Pour envisager des solutions plus appropriées pour compenser la réduction de la teneur en matière grasse, nous nous sommes recentrés sur un premier objectif qui a donc été **de comprendre l'impact de la réduction de la teneur en matière grasse d'un produit alimentaire de consommation courante sur ses caractéristiques sensorielles**. En effet, si nous connaissons les différentes dimensions sensorielles impactées par la réduction de la matière grasse, il sera plus facile de proposer des solutions de compensation appropriées. Pour cela nous avons donc mis en place un profil sensoriel sur un produit formulé avec différentes quantités de matière grasse. Néanmoins, pour comprendre les raisons de ces modifications sensorielles, il nous a paru indispensable d'étudier également les modifications physico-chimiques et rhéologiques induites par cette diminution de teneur en matière grasse. En effet pour pouvoir compenser la diminution de la teneur en matière grasse, il va falloir agir sur l'aliment. Or la littérature montre bien que la modification d'une dimension de l'aliment, une caractéristique rhéologique par exemple, peut avoir un impact sur la perception de la texture, bien entendu mais également de la saveur ou encore de l'arôme. Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, ceci s'explique soit par des interactions cognitives (chez le sujet) soit par des interactions physico-chimiques (au sein de la matrice). Parce que la matière grasse d'un aliment est connue pour avoir un impact sur la texture des produits, nous nous sommes intéressés à l'impact de la réduction de la teneur en matière grasse sur certaines dimensions rhéologiques et tribologiques des produits. Par ailleurs, comme la littérature montre que la teneur en matière grasse affecte la composition aromatique et la libération des composés d'arôme, nous avons également étudié la composition en arôme de notre matrice à différente teneur en matière grasse ainsi que la libération des arômes *in vitro*.

La perception du gras étant multimodale et la sensibilité des différents systèmes sensoriels très variables d'un individu à l'autre, nous sommes en droit de penser que la sensibilité au gras présente également une grande variabilité interindividuelle. Nous pouvons même émettre l'hypothèse que la variabilité de la sensibilité au gras pourrait être plus importante que pour les autres modalités sensorielles si nous admettons que certains individus évalueraient le gras en se basant sur la texture, l'olfaction ou le goût, alors que d'autres utiliseraient toutes les modalités sensorielles ou la combinaison de deux d'entre elles. Dans ce contexte, notre deuxième objectif a été de **déterminer la**

**sensibilité au gras de différents sujets et la contribution des différents sens puis d'en étudier la variabilité interindividuelle.** Les sens du goût et du toucher étant difficiles à supprimer, nous avons concentré notre attention sur le rôle de l'odorat dans la sensation de gras. Pour ce faire, nous avons mesuré la sensibilité au gras de chaque sujet en étudiant la contribution de l'olfaction. Ensuite, nous avons comparé les caractéristiques physiologiques des sujets sensibles au gras et des sujets peu sensibles au gras pour essayer d'expliquer l'origine de la variabilité interindividuelle.

La variabilité interindividuelle de la perception du gras pourrait provenir de la variabilité interindividuelle des différents sens impliqués dans la perception du gras (gustation, olfaction, tactile) (Mattes 2009).

La variabilité gustative pourrait venir du nombre de papilles fongiformes. En effet, il a été montré que les sujets les plus sensibles au sucré et à l'amer possèdent plus de papilles que les sujets peu sensibles (Delwiche et al., 2001). D'autres auteurs ont observé une diminution du seuil de perception de la matière grasse dans le lait et le mélange lait/crème chez les sujets possédant plus de papilles fongiformes (Nachtsheim et Schlich 2013 et 2014). Par analogie avec ces travaux, le nombre de papilles fongiformes pourrait être au moins en partie à l'origine de la variabilité interindividuelle de la perception du gras. Ainsi, le comptage du nombre de papilles fongiformes permettra de déterminer si les sujets sensibles au gras possèdent plus de papilles fongiformes que les sujets peu sensibles au gras.

Le film résiduel présent dans la cavité buccale après consommation d'un produit alimentaire pourrait être à l'origine de la dimension tactile. Une quantité résiduelle plus importante pourrait rester en bouche après déglutition d'un produit épais par rapport à un produit fluide. Par ailleurs, cette quantité de produit restante en bouche après déglutition pourrait être variable en fonction de l'anatomie buccale de chaque individu. En effet, nous pouvons supposer que les sujets peu sensibles au gras possèdent une langue plus rugueuse que les sujets sensibles, ne leur permettant pas de se rincer la bouche entre deux échantillons et par conséquent de percevoir différents niveaux de gras. Une seconde hypothèse pourrait être une différence de flux salivaire. De grandes différences de flux salivaires ont été observées entre les individus (Neyraud et al., 2003, Pionnier et al., 2004b, Engelen et al., 2005, Tournier et al., 2014, Méjean et al., 2015). Ainsi, nous pouvons supposer que les sujets peu sensibles au gras produisent moins de salive que les sujets sensibles, ne leur permettant pas de se rincer la bouche entre deux échantillons. Pour répondre à ces hypothèses, la rugosité de la langue et le flux salivaire ont été mesurés.

Boesveldt et al. (2014) ont montré que l'Homme est capable de discriminer des laits à différentes teneurs en matière grasse en se basant uniquement sur l'odorat. Partant de ce résultat, nous

pouvons émettre l'hypothèse que les sujets sensibles au gras perçoivent mieux les arômes à connotation grasse que les sujets peu sensibles au gras. Le volume oral, en modulant la concentration des molécules volatiles présentent dans la cavité buccale (Mishellany-Dutour et al., 2012), pourrait être à l'origine de cette variabilité interindividuelle. Par ailleurs, un flux respiratoire supérieur contribuerait à l'apport plus important des molécules volatiles au niveau des voies aériennes supérieures et par conséquent de l'air expiré (Hanaoka et al., 2001, Pionnier et al., 2004a). Ainsi, nous pouvons supposer des différences dans la contribution des composés d'arôme au niveau de la muqueuse olfactive des différents groupes de sensibilité au gras. Ces différences pourraient provenir : d'une dilution des composés d'arôme dans la cavité orale des sujets peu sensibles ou du comportement respiratoire différent entre les deux groupes extrêmes de sensibilité au gras qui entrainerait une quantité de molécules aromatiques plus importante dans l'air exhalé des sujets peu sensibles au gras. Pour répondre à ces hypothèses, le volume oral, le flux respiratoire et la libération des arômes en bouche ont été mesurés.

L'état de l'art a montré que seules quelques études menées chez le rat, se sont intéressées au métabolisme des EMO sur la perception olfactive. Parce que la perception du gras semble avoir une dimension olfactive, nous avons émis l'hypothèse que les arômes libérés par les aliments lors de leur consommation pourraient être métabolisés par les enzymes de la muqueuse olfactive, et donner naissance à d'autres composés d'arôme qui pourraient contribuer à la sensation de gras ou à la moduler. Dans ce contexte notre quatrième objectif a donc été **d'approfondir les connaissances actuelles sur le métabolisme de la MO du rat puis d'étudier son existence chez l'Homme.**

A la suite de ce premier chapitre ayant décrit l'état de l'art, ce manuscrit s'organise de la façon suivante :

**Le chapitre 2** aborde la variabilité interindividuelle de la perception multimodale du gras. Après avoir testé différentes stratégies de compensation de la réduction du taux de matière grasse dans les aliments, ce chapitre a pour objectif de caractériser les produits de l'étude afin de connaître les modalités sensorielles impliquées dans la perception du gras. Le deuxième objectif de ce chapitre est de déterminer la sensibilité au gras des individus et d'étudier la variabilité interindividuelle de la sensibilité au gras en lien avec différents paramètres physiologiques.

**Le chapitre 3** évoque la contribution des événements péri-récepteurs qui pourraient au travers des EMXs intervenir dans la perception sensorielle globale. De la muqueuse olfactive du rat à celle de l'Homme, ce chapitre montre l'évolution des protocoles expérimentaux de plus en plus précis qui ont

abordé l'hypothèse de la potentielle contribution des métabolites produits dans la cavité nasale sur la perception olfactive.

Une partie conclusion et perspectives termine le document.

Les protocoles de cette étude ont été approuvés par le comité de protection de la personne (2014/07 – ID RCB : 2013-A01378-37 «QualigrasPhy: déterminants de la variabilité interindividuelle de la perception du gras chez l'homme». Promoteur : INRA, Investigateur-Coordonnateur : Dr Laurent BRONDEL).

***Chapitre 2 : Réduction du gras dans les aliments  
et variabilité interindividuelle de la perception  
multimodale du gras. Constat et recherche  
d'explications.***

Ce chapitre présente les expérimentations menées dans l'objectif de mieux comprendre l'impact d'une réduction de la teneur en en gras sur les caractéristiques sensorielles et instrumentales, de tester des stratégies permettant de réduire la teneur en matière grasse dans des matrices alimentaires sans affecter la perception du gras et enfin d'étudier la variabilité interindividuelle de cette perception.

Les matières grasses jouent un rôle essentiel dans la perception des caractéristiques sensorielles des aliments (texture, flaveur) et influencent fortement leur palatabilité (Bowen et al., 2003, Drewnowski, 1995). C'est pourquoi la réduction de la teneur en cet ingrédient-clé est à la fois complexe et risquée à réaliser.

Deux aliments modèles ont été choisis afin de tester différentes stratégies de compensation des effets de la réduction de la teneur en matière grasse. Le premier aliment modèle, une saucisse à base de viande, a permis de tester une stratégie consistant à ajouter des fibres dans l'objectif de limiter les pertes en eau lors de la cuisson, et par conséquent de limiter la modification des caractéristiques sensorielles liées à la teneur en eau (texture principalement). En effet, le problème majeur d'une réduction de matière grasse dans les produits carnés réside dans la réduction de l'humidité et de la tendreté du produit après cuisson. Par exemple, un steak haché à 16% de matière grasse perd 11% d'humidité lors de la cuisson, contre 5% pour un steak haché à 28% de matière grasse (Cross et al., 1980). Le second aliment modèle, un fromage blanc (FB), a permis de tester une stratégie consistant à ajouter une faible quantité d'arôme à connotation grasse afin de « mimer » le gras. En effet, d'après la littérature la perception globale du gras dans ce type d'aliment semble être influencée par l'intensité des arômes à connotation grasse (Boesveldt et al., 2014, Tepper et al., 1994). La molécule d'arôme ajoutée a été choisie de manière à pouvoir étudier, par ailleurs, les différences interindividuelles de libération des arômes au cours de la mastication, susceptibles d'expliquer en partie les différences de perception du gras.

Un autre angle d'attaque pour comprendre les conséquences d'une réduction du taux de matière grasse dans un aliment consiste à caractériser instrumentalement et sensoriellement les matrices. Une caractérisation rhéologique et aromatique des produits a donc été effectuée pour étudier l'impact d'une augmentation du taux de matière grasse ou de l'ajout de fibres. Partant du principe que la perception du gras est multimodale, la compensation de la réduction de la matière grasse doit tenir compte de plusieurs dimensions sensorielles. La méthode du profil qui permet d'obtenir les caractéristiques sensorielles des produits de l'étude a été la stratégie utilisée pour identifier les descripteurs impactés par la réduction de la teneur en matière grasse.

Mais alors, percevons-nous tous le gras de façon similaire ? Cette interrogation, née du constat de la perception multidimensionnelle du gras nous a conduit à nous intéresser à chaque individu et non à l'ensemble du groupe comme c'est le cas dans la majorité des études citées dans l'état de l'art. Dans le but d'étudier la variabilité interindividuelle de la perception du gras, nous avons déterminé les seuils de détection et différentiel du gras de chacun des sujets de l'étude. Des mesures de seuil de détection à l'acide oléique avaient permis de distinguer des individus hyper sensibles et d'autres hypo sensibles (Stewart et al., 2010, Stewart et al., 2011). Dans notre étude, nous avons décidé de travailler non pas sur des AG en solution ou des matrices modèles mais sur des produits de consommation courante.

Une fois la variabilité interindividuelle de la perception du gras établie, notre objectif a été de rechercher les raisons de cette variabilité. Le nombre de papilles fongiformes pourrait être à l'origine de cette variabilité interindividuelle. En effet, il a été montré que les sujets les plus sensibles au sucré et à l'amer possèdent plus de papilles que les sujets peu sensibles (Delwiche et al., 2001). Ce résultat pourrait également être applicable au gras.

Par ailleurs, Boesveldt et al. (2014) ont montré que l'Homme est capable de discriminer des laits à différentes teneurs en matière grasse en se basant uniquement sur l'odorat. Ce constat laisse supposer une importante contribution de l'olfaction dans la perception du gras. L'influence des paramètres physiologiques et anatomiques sur la libération des arômes d'une matrice ont parfois été évoqués pour expliquer les fortes différences interindividuelles en terme de libération des arômes (Pionnier et al., 2004b, Mestres et al., 2006, Gierczynski et al., 2008) qui pourraient impacter la perception du gras. Parmi ces paramètres, et comme cela a été évoqué dans l'état de l'art, le flux salivaire et le flux respiratoire pourraient directement impacter la libération et la perception des composés présents dans la matrice alimentaire (Boland et al., 2004, Genovese et al., 2009, van Ruth et al., 2000, Buettner et al., 2002, Haahr et al., 2004, Tréléa et al., 2008, Doyennette et al., 2014).

En plus de l'olfaction et de la gustation, le toucher intervient aussi dans la détection du gras (Mattes, 2009). Partant de ce constat, une de nos hypothèses serait que les sujets qui ont un tapissage en bouche plus important lors de la consommation d'un aliment, perçoivent moins bien les variations de matière grasse suite à une possible difficulté de rinçage de la cavité orale. Ce paramètre, peu étudié jusqu'à présent, nous a semblé important car il pourrait influencer la perception du goût, de la texture et des sensations résiduelles d'un aliment (Ahn et al., 2002, Madrigal-Galan et al., 2006, De Wijk et al., 2009, Camacho et al., 2015). Par ailleurs, le tapissage en bouche pourrait être directement relié au relief de la langue des sujets. Ainsi, une piste exploratoire a été de mesurer la rugosité de la langue de l'ensemble des participants. Aussi, pour mieux comprendre le rôle des

paramètres physiologiques et anatomiques des individus dans la sensibilité au gras, nous avons travaillé sur un panel conséquent constitué de 40 sujets.

Après avoir développé deux pistes pour compenser sensoriellement la réduction de la matière grasse, ce chapitre relate les étapes qui nous ont conduits à partir de la mesure de la variabilité interindividuelle de la sensibilité au gras dans un produit de consommation courante à émettre des hypothèses sur l'origine de cette variabilité interindividuelle de la perception du gras. Nous présenterons successivement les caractéristiques instrumentales et sensorielles des produits, puis la sensibilité à la matière grasse dans la matrice FB en modifiant certaines modalités sensorielles et enfin, les paramètres physiologiques mesurés chez les 40 sujets de l'étude pour essayer d'expliquer la variabilité de la perception du gras : flux salivaire, flux respiratoire, volume oral, nombre de papilles fongiformes, tapissage en bouche et lipides résiduels associés au tapissage et rugosité de la langue.

## 1. Les sujets

Le recrutement des sujets a été effectué à partir de la base de données Panelsens de l'INRA de Dijon. Les critères de sélection ont été les suivants : les sujets devaient (1) être disponibles pendant les 2 ans et demi de l'étude et (2) consommer des produits laitiers comme le fromage blanc. 40 sujets ont participé à l'ensemble des mesures de l'étude principale. Le groupe était composé de 18 femmes et 22 hommes âgées de 25 à 76 ans (âge moyen 55 ans) et ayant un IMC compris entre 18,1 et 36,7 (IMC moyen 24,2).

## 2. Les produits

Le fromage blanc (FB) a été utilisé comme support pour la majorité des expérimentations menées au cours de cette thèse. Ce produit présente l'avantage d'être relativement neutre, facile à aromatiser, disponible en permanence et à faible coût dans le commerce. Cependant, les données de la littérature présentées dans le premier chapitre de cette thèse ont mis en évidence la variabilité de la perception du gras en fonction de la matrice alimentaire. De plus, la sensation de gras varie avec la texture du produit. Ainsi, il nous a semblé judicieux de travailler sur une deuxième matrice de texture bien différente : la saucisse (matrice protéique de texture « solide »).

Les fromages blancs de la marque Pâturage, en version classique (7,8% de matière grasse) et allégée (0% de matière grasse) ont été choisis parce qu'ils sont particulièrement neutre en goût (Figure 16).





Figure 16 : Fromages blancs Pâturage, 0% et 7,8% de matière grasse.

A partir de ces matières premières, une gamme de fromage blanc à différente teneur en matière grasse a été formulée (Tableau 1). De la crème fraîche à 30% de matière grasse a été utilisée pour obtenir les échantillons à plus de 7,8% de matière grasse.

Tableau 1 : Formulation des fromages blancs

Teneur en matière grasse	Fraction massique FB à 0%	Fraction massique FB à 7,8%	Fraction massique crème à 30%	Temps de mélange au fouet
0%	1,000	0	0	1 min
1%	0,872	0,128	0	
2%	0,744	0,256	0	
3%	0,615	0,385	0	
4%	0,487	0,513	0	
5%	0,359	0,641	0	2 min
6%	0,231	0,769	0	
7%	0,103	0,897	0	
7,8%	0	1,000	0	
9%	0	0,946	0,054	
10%	0	0,901	0,099	
11%	0	0,856	0,144	

Quatre saucisses modèles de type saucisse de Strasbourg différant par la teneur en matière grasse et la composition en fibres/amidon ont été développées par l'UMR QUAPA (Qualité des Produits Animaux) de Clermont Ferrand (Tableau 2). Les fibres de Psyllium, fibres végétales, proches de celle du lupin et l'amidon de manioc permettent d'augmenter la viscosité d'une émulsion.

Tableau 2 : Caractéristiques (teneur en matière grasse (MG), ajout ou non de fibres) des saucisses

Mêlée 1	Mêlée 2	Mêlée 3	Mêlée 4
15% MG	15% MG	15% MG	27% MG
-	Fibres Psyllium (3%)	Amidon de Manioc (3%)	-

### 3. Réduction de la matière grasse dans les aliments

Dans le cadre du projet QualigrasPhy et par analogie avec les travaux antérieurs sur les réductions du sucre et du sel, une première approche menée dans ce travail de thèse a été de compenser les effets d'une réduction de la teneur en matière grasse par des agents de substitutions. D'après les données de la littérature, intégrer des fibres (konjac) dans des produits carnés transformés (saucisses de Frankfort), pourrait en plus d'améliorer les propriétés nutritionnelles (Thebaudin et al., 1997), permettre de réduire la teneur en matière grasse sans modifier la sensation de gras (Jiménez-Colmenero et al. 2010). Cependant la substitution de la matière grasse par des maltodextrines dans des confiseries a réduit l'appréciation de l'odeur et de la texture (Hahnadev et al., 2014). Une autre piste pour réduire la teneur en matière grasse serait l'ajout d'un arôme congruent. Rares sont les études qui ont compensé la réduction de la matière grasse par des arômes mais certains résultats ont tout de même été concluants (Yackinous et al., 2000). Dans cette étude, il a été possible d'augmenter la sensation de gras d'une purée par addition d'un arôme beurre. Les résultats de cette étude laissent penser qu'il serait envisageable de compenser la réduction du taux de matière grasse de nos fromages blanc par ajout d'un arôme congruent au gras.

#### 3.1. Réduction de la matière grasse dans les saucisses par ajout de fibres

L'objectif de cette partie était d'étudier l'effet de l'ajout de fibres P (Psyllium) et d'amidon de manioc dans des saucisses sur la sensation de gras perçue. La sensation de gras a été mesurée avec et sans pince-nez afin d'étudier la contribution de la composante olfactive dans la perception du gras.

##### 3.1.1. Matériels et Méthodes

###### a. Conditions expérimentales

Les séances ont été réalisées dans une salle d'analyse sensorielle de la plateforme Chemosens (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, Dijon). La température de la salle était contrôlée (21 +/- 2°C). Cette salle est composée de cabines individuelles standardisées et équipées d'ordinateurs. L'ensemble des tests ont été effectués en lumière rouge pour limiter la contribution de la vision. Les données ont été collectées via le logiciel Fizz (Biosystemes, Couternon, France).

### **b. Sujets**

Seuls 34 sujets parmi les 40 recrutés initialement ont été disponibles pour participer à cette étude avec une répartition de 20 femmes et de 14 hommes dont la moyenne d'âge était de 55 ans. Les sujets ne devaient pas consommer de produits alimentaires, de boissons, se brosser les dents ou fumer au moins 1h avant le début de la séance.

### **c. Produits**

Quatre saucisses ont été étudiées. Fabriqués par l'UMR QUAPA de Clermont-Ferrand, elles différaient soit par leur teneur en matière grasse, soit par la nature des composés (fibres ou amidon) ajoutés pour compenser les effets d'une réduction de la teneur en matière grasse.

- Saucisses à 15% de matière grasse sans fibres
- Saucisses à 15% de matière grasse avec fibres de Psyllium (P) (3%)
- Saucisses à 15% de matière grasse avec amidon de manioc (3%)
- Saucisses à 27% de matière grasse (saucisse de référence)

Les saucisses initialement conservées sous vide à 4°C ont été réchauffées durant 30 minutes dans un bain thermostaté à 70°C. Les extrémités arrondies de chaque saucisse ont été éliminées. Le reste des saucisses a été coupé en 4 morceaux d'environ 3 cm. Des coupelles en plastique codées ont été utilisées pour le service. Les quatre types de saucisses ont été servis simultanément aux sujets. La température moyenne des échantillons lors de la dégustation était de 59,2°C +/- 3,0°C (température à cœur du produit à l'arrivée dans les cabines).

### **d. Epreuve de classement**

L'épreuve consistait pour les dégustateurs à classer les échantillons de saucisses du moins gras au plus gras. Ce test de classement des saucisses a été effectué avec puis sans pince-nez par l'ensemble des sujets afin d'étudier l'effet potentiel de la composante olfactive dans la perception du gras. Les sujets recevaient les échantillons dans un ordre suivant un carré latin de Williams.

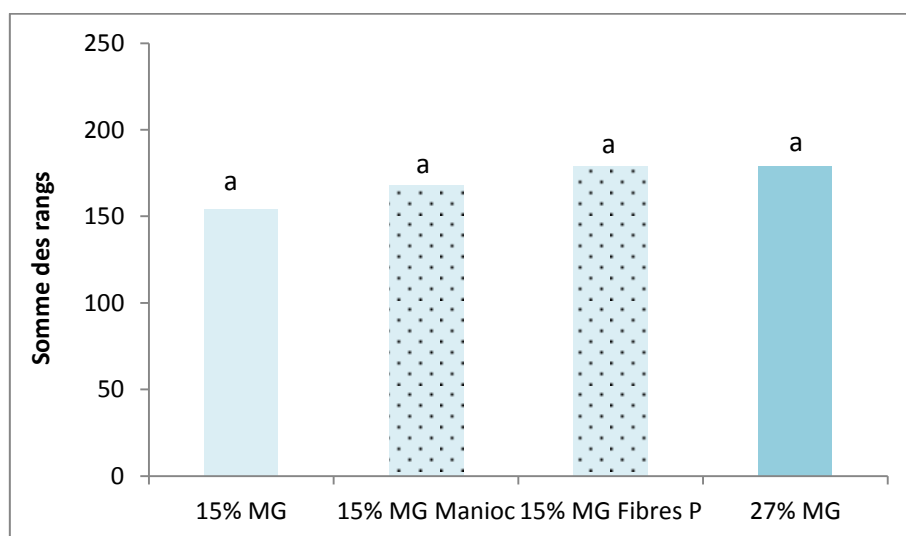
### **e. Analyse des données**

La somme des rangs a été calculée pour chaque produit dans chacune des conditions (avec et sans pince-nez). Les résultats ont été analysés par un test de Friedman. Il s'agit d'un test du  $\chi^2$  d'écart

entre la somme des rangs obtenus par produit et la somme des rangs moyens (Depledt, 1998). Il permet donc de déterminer si les produits sont perçus comme étant significativement différents ou au contraire comme étant identiques. Lorsque le  $\chi^2$  était significatif, les rangs étaient comparés 2 à 2 au moyen de la plus petite différence significative.

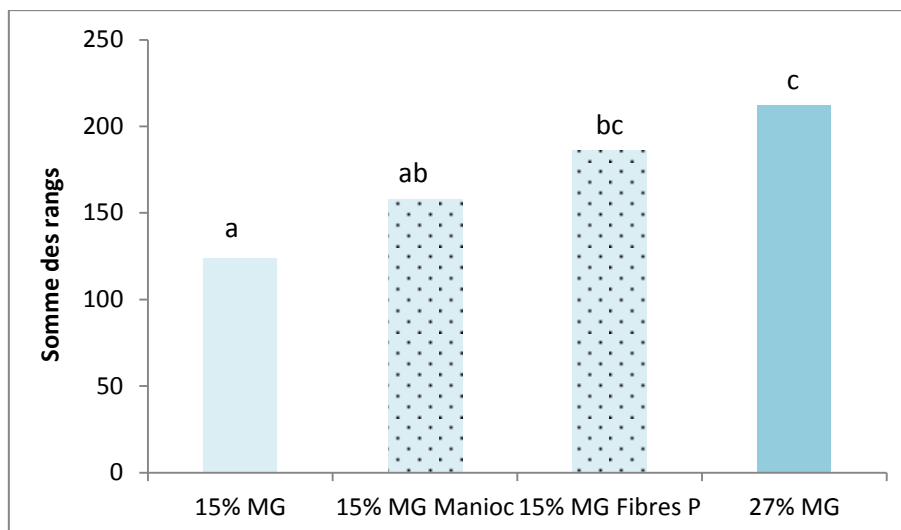
### 3.1.2. Résultats

Avec pince-nez, les différences entre les échantillons n'étaient pas suffisantes pour permettre aux sujets de classer les échantillons ( $p=0,29$ ) (Figure 17).



**Figure 17 : Test de classement selon l'intensité de la sensation de gras, avec pince-nez. Somme des rangs calculée pour chaque produit (34 sujets). MG = matière grasse, MG = matière grasse, ■ = saucisse de référence, ■ = ajout de fibres P ou de manioc. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (PPDS).**

Au contraire, le test de classement effectué sans pince-nez a révélé des différences significatives entre les saucisses ( $p<0,001$ ) (Figure 18). La matrice de référence à 27% de matière grasse a été perçue comme étant plus grasse que celles à 15% de matière grasse avec ou sans amidon de manioc. L'ajout d'amidon de manioc n'augmente donc pas significativement la sensation de gras. Par contre, les saucisses additionnées de fibres de Psyllium sont perçues significativement plus grasses que les saucisses à 15% de matière grasse et sans fibres et ne sont pas perçues significativement différentes des saucisses à 27% de matière grasse. L'ajout de fibres Psyllium a donc augmenté la sensation de gras perçue. Cette augmentation a été suffisante pour compenser une réduction de 12% de matière grasse (passage de 27% à 15% de matière grasse).



**Figure 18 : Test de classement selon l'intensité de la sensation de gras, sans pince-nez. Somme des rangs calculée pour chaque produit (34 sujets). MG = matière grasse, ■ = saucisse de référence, ■ = ajout de fibres P ou de manioc. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (PPDS).**

L'olfaction est indispensable pour différencier des saucisses à 15 et 27% de matière grasse. L'ajout de fibres P permet d'augmenter la sensation de gras perçue. En présence de ces fibres, une saucisse à 15% de matière grasse paraît aussi grasse qu'une saucisse à 27% de matière grasse. Ce résultat n'étant valable qu'en absence de pince-nez, nous supposons que le mécanisme permettant d'augmenter la sensation de gras est basé sur une modification des propriétés olfactives du produit.

### 3.2. Réduction de la matière grasse dans le fromage blanc par ajout d'un arôme

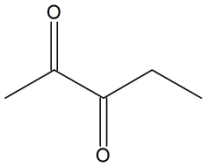
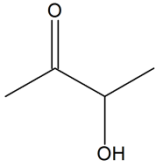
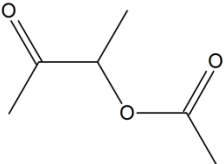
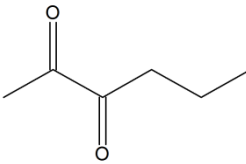
L'aromatisation a consisté à ajouter individuellement différentes molécules à connotation grasse dans des fromages blancs à faible teneur en matière grasse (0% et 3%) dans l'objectif d'augmenter la perception du gras. L'aromatisation du fromage blanc à 0% de matière grasse devait permettre de provoquer une sensation de gras dans une matrice qui n'en contenait pas. Toutefois, cet objectif pouvant peut-être paraître trop ambitieux a été complété par l'aromatisation du fromage blanc à 3% de matière grasse qui devait augmenter la perception du gras et non la créer. Pour cela, nous avons d'abord déterminé la concentration optimale de chaque composé à introduire dans la matrice.

### 3.2.1. Matériels et Méthodes

#### a. Choix des composés d'arômes

Dans le cadre du projet QualigrasPhy, vingt-cinq molécules volatiles à connotation grasse ont été sélectionnées à partir des données de la littérature. Le choix des molécules pour aromatiser le fromage blanc a été réalisé parmi ces vingt-cinq composés. Pour être retenue, la molécule devait impérativement être de qualité alimentaire, ce qui lui permettait d'être consommée par les dégustateurs. De plus, elle devait être volatile et détectable même à faible concentration au PTR-MS, contrainte indispensable pour la suite du projet. Enfin, des pré-tests ont permis d'évaluer la congruence des molécules avec la matrice alimentaire. Quatre molécules aromatiques répondant à l'ensemble de ces critères ont donc été retenues : la 2-3 pentanedione, l'acétoïne, la 2-acétoxy-3-butanone et la 2,3-hexanedione (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques des quatre composés utilisés pour l'aromatisation des fromages blancs.

Molécule	2,3-pentanedione	acétoïne	2-acétoxy-3-butanone	2,3-hexanedione
Structure				
Numéro CAS	600-14-6	513-86-0	4906-24-5	3848-24-6
Solubilité dans l'eau (25°C) (Base de données EPISUITE)	66,7g.L <sup>-1</sup>	1000g.L <sup>-1</sup>	59,2g.L <sup>-1</sup>	2,11.10 <sup>2</sup> g.L <sup>-1</sup>
Solvant utilisé	Eau	Eau	Eau	Eau
logP	-0.8	-0.43	0.68	-0.27
Kaw (estimé par EPISUITE)	1,07.10 <sup>-5</sup>	4,2.10 <sup>-4</sup>	4,5.10 <sup>-5</sup>	1,4.10 <sup>-5</sup>
Descripteurs aromatiques	Beurre, noisette, âcre	Crème, gras	Doux, crème, beurre, fruité	Beurre, fruité (fraise)
Fournisseur	Sigma-Aldrich			
Pureté	≥ 99%	≥ 96%	≥ 99%	≥ 93%

#### b. Préparation des fromages blancs

##### Préparation des solutions aromatiques

Les solutions de molécules aromatiques ont été préparées de façon à introduire 1 mL de solution pour 100 g de fromage blanc de manière à limiter les changements de texture du fromage blanc.

Nous avons donc préparé une solution à 1000 ppm pour obtenir un fromage blanc à 10 ppm. La préparation des solutions aromatiques a nécessité le passage par une solution mère à 50000 ppm (soit 50 g.kg<sup>-1</sup>) réalisée à partir de 2,5 g d'arôme complété à 50 g avec de l'eau d'Evian ou du propylène glycol. Ces préparations ont ensuite été placées sous agitation pendant 1h afin d'obtenir des solutions homogènes. Chaque molécule a été étudiée seule dans les deux matrices (0 et 3% de matière grasse) afin de trouver pour chacune, la concentration idéale.

### *Aromatisation des fromages blancs*

Les fromages blancs ont systématiquement été préparés 24 heures avant les séances de dégustation de sorte que les arômes aient le temps de diffuser dans la matrice. Le fromage blanc à 3% de matière grasse a été formulé à partir des deux produits de référence (0% et 7,8% de matière grasse). Toutes les matrices ont été battues au fouet durant 2 minutes. Par la suite, 1 mL de solution aromatique a été introduit dans les 100 g de produits puis mélangé à l'aide d'une cuillère durant 1 minute. Pour que la quantité de liquide soit identique dans chaque fromage blanc, 1 mL d'eau Evian a été ajouté aux 100 g de produit non aromatisés. Les concentrations utilisées (Tableau 4) ont été définies grâce à des pré-tests réalisés au sein du laboratoire.

**Tableau 4 : Concentrations testées pour aromatiser les fromages blancs.**

Molécule Matrice	2,3-pentanedione	acétoïne	2-acétoxy-3-butanone	2,3-hexanedione
<b>Fromage blanc 0% de matière grasse</b>	1 ppm 5 ppm 10 ppm 25 ppm 50 ppm	1 ppm 5 ppm 10 ppm 25 ppm 50 ppm	-	3 ppm 5 ppm 8 ppm 10 ppm
<b>Fromage blanc 3% de matière grasse</b>	5 ppm 8 ppm 10 ppm	100 ppm 150 ppm 200 ppm	50 ppm 75 ppm 100 ppm 150 ppm 300 ppm	3 ppm 5 ppm 8 ppm

Avant la séance, les fromages blancs étaient répartis dans des pots en plastique à usage unique fermés à l'aide d'un couvercle et placés dans une chambre froide à 4°C. Chaque pot contenait 20 g de fromage blanc.

### **c. Sujets**

L'ensemble des épreuves a été réalisé avec des sujets recrutés en interne dont l'effectif variait entre 15 et 18 selon les séances (Tableau 5).

Tableau 5 : Nombre de sujets par séance.

Molécule Matrice	2,3-pentanedione	acétoïne	2-acétoxy-3-butanone	2,3-hexanedione
Fromage blanc 0% de matière grasse	16 sujets	16 sujets	-	16 sujets
Fromage blanc 3% de matière grasse	15 sujets	18 sujets	16 sujets	18 sujets

#### d. Epreuve de classement

Au total, 7 épreuves de classements ont été organisées, incluant systématiquement les fromages blancs de référence à 0, 3 et 7,8% de matière grasse. Dans une séance, les sujets avaient devant eux l'ensemble des fromages blancs aromatisés avec une molécule donnée (2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, acétoïne ou 2-acétoxy-3-butanone) et les 3 de références. Chaque épreuve consistait pour les dégustateurs à classer les échantillons de fromage blanc du moins gras au plus gras.

Les séances ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles sur les saucisses mais uniquement sans pince-nez. Les fromages blancs ont été servis à 7°C et goûtés une première fois dans un ordre suivant un carré latin de Williams.

#### e. Analyse des données

La somme des rangs a été calculée pour chaque produit. Les résultats ont été analysés par un test de Friedman. Il s'agit d'un test du  $\chi^2$  d'écart entre la somme des rangs obtenus par produit et la somme des rangs moyens (Depledt, 1998). Il permet donc de déterminer si les produits sont perçus comme étant significativement différents ou au contraire comme étant identiques. Lorsque le  $\chi^2$  était significatif, les rangs étaient comparés 2 à 2 au moyen de la plus petite différence significative.

### 3.2.2. Résultats

Quel que soit la teneur en matière grasse du fromage blanc aromatisé (0 ou 3%), les fromages blancs sont bien classés selon leur teneur en matière grasse (Figure 19).



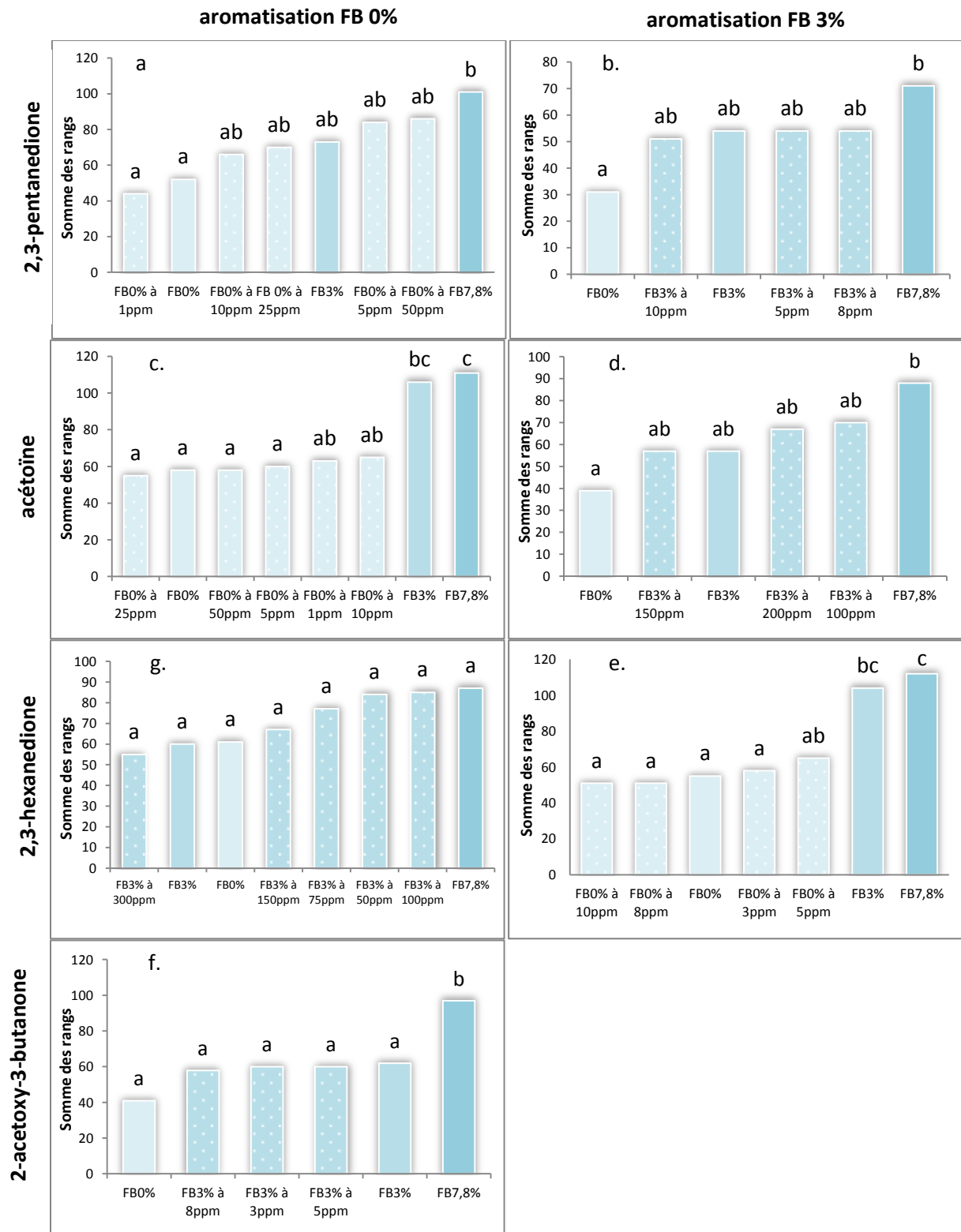


Figure 19 : Somme des rangs de chaque fromage blanc suite à une épreuve de classement sur la perception du gras par environ 16 sujets. ■ FB à 0% de MG, ■ FB à 3% de MG, ■ FB à 7,8% de MG. a. du FB 0% aromatisé avec de la 2,3-pentanedione, b. du FB 3% aromatisé avec de la 2,3-pentanedione, c. du FB 0% aromatisé avec de l'acétone, d. du FB 3% aromatisé avec de l'acétone, e. du FB 0% aromatisé avec de la 2,3-hexanedione, f. du FB 3% aromatisé avec de la 2,3-hexanedione, g. du FB 0% aromatisé avec du 2-acetoxy-3-butanone. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (PPDS).

En revanche, la perception du gras n'est significativement différente qu'entre le fromage blanc à 0 et celui à 7,8% de matière grasse, sauf dans le cas de la 2-acétoxy-3-butanone dans le fromage blanc à 0% de matière grasse ou aucune différence n'est significative. Néanmoins la tendance reste la même. Par ailleurs, quelle que soit la molécule aromatique utilisée et les concentrations testées, les composés d'arôme utilisés n'ont pas permis d'augmenter significativement la perception du gras (Figure 19).

Quel que soit la teneur en matière grasse du fromage blanc aromatisé (0 ou 3%), l'aromatisation à l'aide d'une seule molécule à connotation grasse n'a pas permis d'augmenter la perception du gras.

### 3.3. Discussion et conclusion

Les résultats des mesures effectuées sur les saucisses ont montré que le système olfactif est essentiel pour percevoir des différences de matière grasse. En effet, avec pince-nez, donc sans la composante olfactive, les différences perçues entre les saucisses n'étaient pas suffisantes pour permettre aux sujets d'établir un classement des produits selon l'intensité de la sensation de gras quelle que soit la teneur en matière grasse des saucisses (15 ou 27% de matière grasse) et la nature des éléments (fibre/amidon de manioc) ajoutés. Donc, soit les éventuelles différences de saveurs et/ou de texture entre les matrices étaient insuffisantes pour être perçues, soit elles étaient perçues mais n'influençaient pas la sensation de gras. Au contraire, lorsque les sujets disposaient de l'intégralité de leur sens (sans pince-nez), ils ont discriminé les différentes teneurs en matière grasse (15% et 27% de matière grasse), et ont perçu la saucisse contenant 15% de matière grasse et 3% de fibre Psyllium aussi grasse que celle à 27% de matière grasse. L'ajout de fibres Psyllium (3%) a donc permis la compensation perceptuelle d'une réduction de 12% de matière grasse. Comme cette compensation perceptuelle n'est constatée qu'en absence de pince-nez, nous pouvons supposer que la fibre de Psyllium apporte une composante olfactive qui pourrait évoquer l'univers gras ou qui, associée aux modifications de texture et/ou de saveurs éventuelles permet d'augmenter la sensation de gras.

Une autre hypothèse serait que la supplémentation en fibres modifie la façon dont les composés d'arôme sont libérés de la matrice alimentaire. En effet, le rôle premier et la principale raison de l'utilisation de fibres pour compenser une réduction de matière grasse dans la viande est leur capacité à retenir l'eau. La matière grasse joue un rôle important dans la libération des arômes en favorisant la rétention de certains et la libération d'autres. En diminuant la teneur en matière grasse,

même si on la remplace par autre chose, des fibres en l'occurrence, on peut imaginer que les molécules retenues ou libérées ne seront pas les mêmes. Si les molécules libérées ne sont pas les mêmes, alors l'intensité odorante et/ou la qualité odorante peut être modulée. Warner et Inglett (1997) ont mis en évidence une légère diminution de l'intensité aromatique des descripteurs « bœuf » et « gras » dans des steaks hachés réduits en matière grasse et supplémentés en fibres d'avoine. D'autres auteurs ont montré une diminution de l'intensité de la flaveur en présence de fibres d'avoine (Berry et al., 1996, Troutt et al., 1992, Pinero et al., 2008). Ces données de la littérature ne vont pas dans le sens d'un apport d'une composante olfactive par les fibres puisque l'intensité aromatique est diminuée. Cependant, ces travaux portent sur des fibres d'avoine et non des fibres de Psyllium. L'impact des fibres sur l'apport d'arômes ou la modification de leurs libérations pourrait être fibres-dépendant. Par ailleurs, certains de ces auteurs ont ajouté des quantités de fibres dans leurs produits nettement plus importantes que nous. Par exemple, Pinero et al. (2008) ont compensé la réduction de 4,3% de matière grasse dans des steaks hachés par 13,45% de fibres d'avoine. Par ailleurs, l'ajout de fibres modifie la texture du produit. La supplémentation en fibres d'avoine dans des steaks hachés réduits en matière grasse a permis d'augmenter la tendreté et la jutosité des produits (Warner et Inglett, 1997, Pinero, 2008). Cette modification de texture pourrait modifier la libération des arômes et/ou leur perception soit directement, soit par l'intermédiaire d'une interaction texture/flaveur. Ainsi, l'ajout de fibres spécifiques dans la matrice saucisse semble être efficace pour compenser une réduction de la matière grasse. Au départ, une des hypothèses était une éventuelle modification de la texture des produits qui, si elle est présente, n'a pas été perçue (avec pince-nez) ou pas été associée au gras. La caractérisation de la composition aromatique des matrices prend donc toute son importance et fera l'objet de la prochaine partie de ce chapitre.

Concernant la matrice laitière, les résultats des tests de classements ont montré que la sensation de gras n'est significativement différente qu'entre 0 et 8% de matière grasse. De plus, l'ajout d'une molécule odorante à connotation grasse dans un FB à 0 ou 3% de matière grasse n'a pas permis d'augmenter la sensation de gras perçue. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la sensation de gras dans le FB n'est pas induite principalement ou exclusivement par l'arôme, mais aussi par une dimension de texture et/ou de saveur qui ne peut pas être compensée par l'arôme seul. En effet, le fromage blanc à 7,8% de matière grasse du commerce pourrait avoir un effet tapissant en bouche plus important que le FB à 3% de matière grasse, lui-même plus important que le FB à 0% de matière grasse. Si tel est le cas, les sujets ont évalué la sensation de gras au moyen d'une sensation de texture et non d'une sensation olfactive.

Par ailleurs, les notes grasses induites par les composés d'arôme utilisés ne sont peut-être pas assez complexes (utilisation d'une seule molécule) ni assez congruentes avec la matrice pour compenser la diminution de la teneur en matière grasse. En effet, les arômes formulés par les aromaticiens contiennent plusieurs molécules odorantes. Par exemple, l'ajout d'un arôme « beurre » composé de plusieurs molécules dans une purée de pomme de terres et d'un arôme « crème oignon » également formulé avec plusieurs molécules dans des chips ont tous deux augmenté la sensation de gras perçue (Yackinous et Guinard, 2000). Au contraire, l'aromatisation d'un chocolat chaud par un arôme « chocolat blanc » ou d'une crème dessert par un arôme de « lait entier » n'a pas augmenté la sensation de gras, laissant supposer que la nature de l'arôme permettant d'augmenter la perception du gras dépend du produit (Yackinous et Guinard, 2000). D'après les auteurs, cette différence pourrait provenir d'interactions arôme/saveur avec une association du chocolat blanc et du lait entier avec la saveur sucrée et non avec l'univers gras.

Contrairement aux tests réalisés sur la matrice saucisse, les tests de classements réalisés sur la matrice fromage blanc n'ont été effectués que sans pince-nez puisque l'objectif était d'étudier l'effet de l'addition d'un composé d'arôme sur la perception du gras. Il aurait également été intéressant d'effectuer le classement avec pince-nez pour savoir si la discrimination entre les matrices non aromatisés était meilleur avec ou sans pince-nez et donc déterminer l'impact de l'olfaction dans la perception du gras dans des FB.

Pour comprendre l'impact d'une réduction du niveau de gras, les fromages blancs à différentes teneurs en matière grasse ont été caractérisés instrumentalement. Leur viscosité et leur caractère lubrifiant ont été mesurés afin de savoir si la perception du gras pourrait être liée à ces caractéristiques de texture. La composition aromatique des FB a également été déterminée pour connaître la nature et la quantité des composés d'arôme qui varient avec la teneur en matière grasse dans les FB. Etant donné que la composition d'une matrice ne peut pas à elle seule expliquer la perception, la libération *in vitro* de ces composés d'arôme a également été étudiée. Ces mesures permettent de comprendre les modifications induites par une augmentation de la teneur en matière grasse dans des fromages blancs. Pour voir si un arôme complexe permet d'augmenter la perception du gras, un arôme « crème » plus complexe, formulé par Firmenich a été utilisé dans la suite du projet. Enfin, pour bien comprendre les changements perceptifs induits par la modification de la quantité de matière grasse dans les fromages blancs, un profil sensoriel a été effectué.

## 4. Caractérisation instrumentale des matrices alimentaires

### 4.1. Caractéristiques de texture

#### 4.1.1. Matériels et Méthodes

##### a. Mesure de viscosité

Les mesures de viscosité des FB à 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11% ont été effectuées avec une contrainte de cisaillement imposée au rhéomètre (Rhéomat RM200, Lamy Rheology, Champagne au Mont d'Or, France), équipé d'un système de mesure DIN/ISO 3219 (MS-DIN 11). Pour se faire, 30 g de chaque échantillon ont été utilisés. Les mesures de viscosité de chaque matrice ont été effectuées à 7°C et 15°C par un balayage de vitesse croissante allant de 5 à 100 s<sup>-1</sup>. La température de 7°C correspond à la température de consommation d'un FB à la sortie du réfrigérateur. La température de 15°C, quant à elle, correspond à un fromage blanc déposé sur un plateau de cafétéria et consommé à la fin du repas. Le modèle d'Ostwald  $\tau = K\dot{\gamma}^n$  a été utilisé ( $\tau$  (tau) représente la contrainte de cisaillement et  $\dot{\gamma}$  le taux de cisaillement) pour modéliser les courbes obtenues. Cette courbe modélisée permet d'extraire le coefficient de consistance (K) et l'indice de comportement (n). C'est à partir de ces deux paramètres, qu'a été calculée la viscosité à 50s<sup>-1</sup> au moyen de la formule suivante:

$$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K\dot{\gamma}^{n-1}$$

La viscosité calculée pour une vitesse de 50 s<sup>-1</sup>, correspond à celle du cisaillement en bouche (Sherman, 1975). Pour chaque produit, les mesures ont été répétées trois fois.

##### b. Mesure de tribologie

Des mesures de tribologie des FB à 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8% ont été réalisées par l'UMR GMPA (Génie et microbiologie des procédés alimentaires) à Grignon via un nano tribomètre (CSM Instrument, Anton Paar). Ces mesures qui correspondent aux forces de frottement, consistent à produire un déplacement relatif entre deux corps sous une faible force apparent (une seule vitesse de mesure) afin de déterminer un coefficient de friction ( $\mu$ ), défini par l'équation suivante (Bellamy et al., 2009):

$$\mu = \frac{\text{Force de friction mesurée}}{\text{Force normale appliquée}}$$

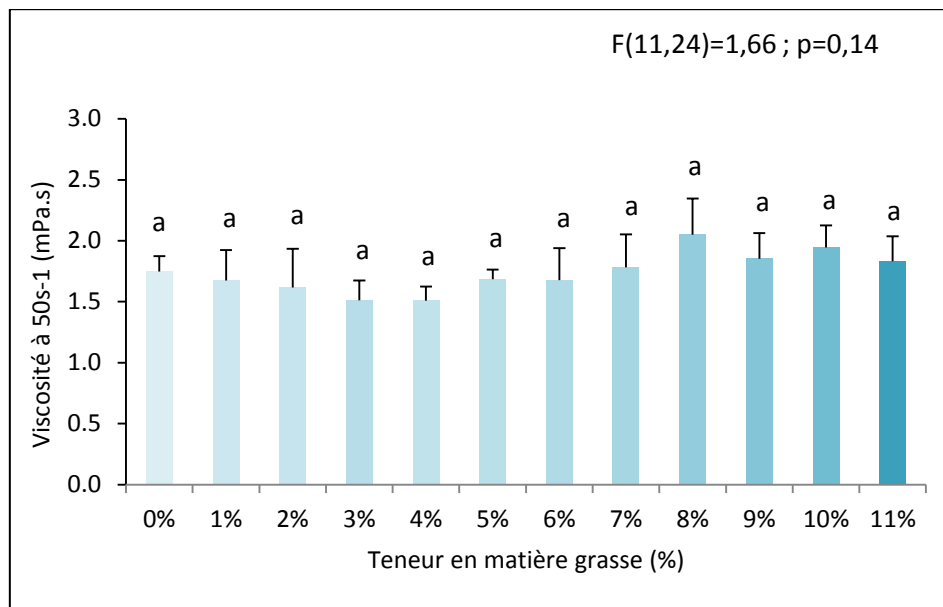
Pour mesurer ce coefficient, quelques  $\mu\text{L}$  d'échantillons ont été déposés sur une surface en polydiméthylsiloxane (PDMS), préalablement découpée et déposée sur une lame de microscope. L'échantillon a ensuite été mis en contact avec une bille en téflon effectuant des mouvements « d'aller/retour » pendant quelques secondes (Tableau 6). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon. La température des produits était de  $20^\circ\text{C}$ .

**Tableau 6 : Conditions de réalisation des mesures de tribologie**

Force de contact	Force normale	Vitesse maximale	Amplitude	Nombre de cycles
5 mN	30 mN	3 cm/sec	4 mm	15

#### 4.1.2. Résultats

A  $7^\circ\text{C}$ , la viscosité mesurée à  $50\text{ s}^{-1}$  n'est pas significativement différente entre les fromages blancs à différentes teneur en matière grasse (Figure 20). La viscosité moyenne à  $7^\circ\text{C}$  est de  $1,74\text{ mPa}\cdot\text{s}$ . En revanche, à  $15^\circ\text{C}$ , la viscosité augmente de façon significative avec le niveau de matière grasse des produits (Figure 20). Alors qu'elle est de  $1\text{ mPa}\cdot\text{s}$  pour des fromages blancs entre 0 et 2% de matière grasse, elle atteint  $2,4\text{ mPa}\cdot\text{s}$  pour 10 et 12% de matière grasse.



**Figure 20 : Mesures de la viscosité des fromages blancs de 0% à 11% de matière grasse à  $7^\circ\text{C}$ . Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).**

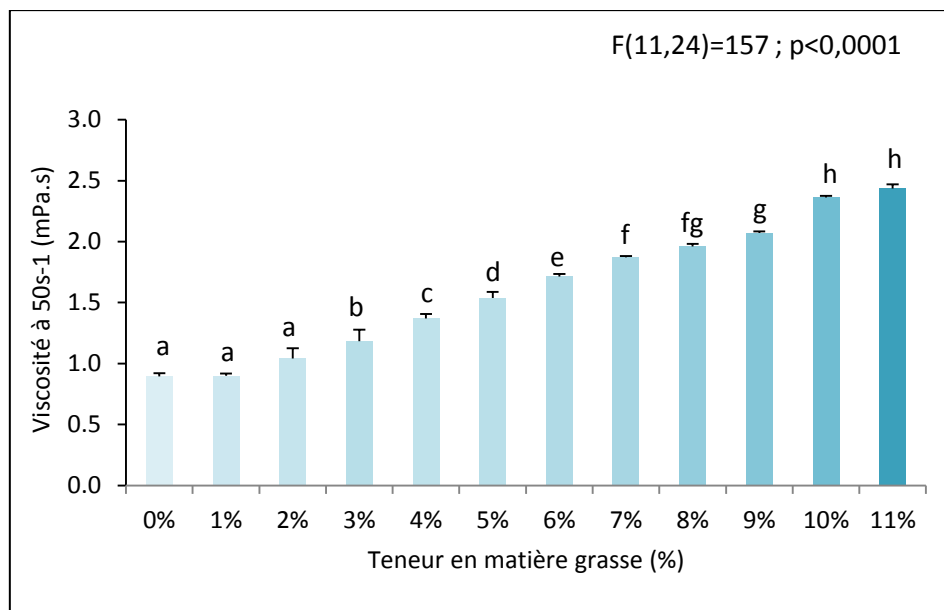


Figure 21 : Mesures de la viscosité des fromages blancs de 0% à 11% de matière grasse à 15°C. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

Concernant la tribologie des produits, une augmentation de la teneur en matière grasse dans la matrice fromage blanc entraîne une diminution des frottements (Figure 22). Cette diminution est particulièrement marquée entre les FB à 0 et 1% de matière grasse. Ensuite, elle est plus faible mais néanmoins significativement entre 1% et 2% de matière grasse puis la diminution du coefficient de friction ralenti encore puisqu'il faut ensuite atteindre 6% de matière grasse pour avoir un coefficient de friction significativement plus faible qu'à 2% de matière grasse.

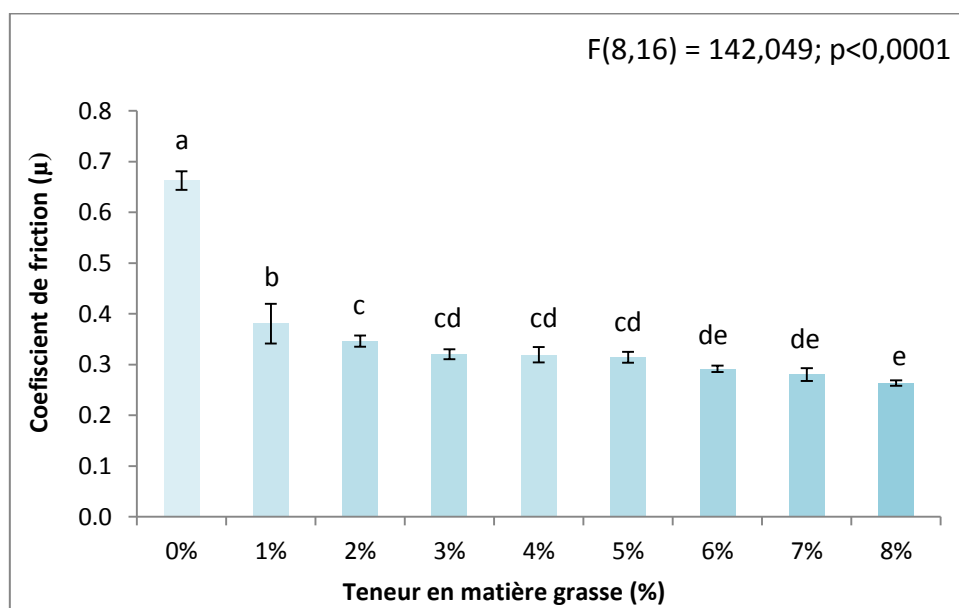


Figure 22 : Mesures de tribologie (coefficient de frottement  $\mu$ ) des fromages blancs de 0% à 8% de matière grasse. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

## 4.2. Composition aromatique

### 4.2.1. Matériels et Méthodes : Extraction des composés volatils de la matrice

Parmi les techniques les plus anciennes, la distillation par entraînement à la vapeur permet d'extraire rapidement les composés volatils d'une matrice. Cette méthode relativement simple présente l'inconvénient d'appliquer des températures élevées au cours de la distillation pouvant conduire à la formation d'artefacts (Engel et al., 1999). En effet, la distillation classique réalisée à pression atmosphérique peut nécessiter une température d'ébullition de 100°C provoquant, par les réactions de Maillard, des molécules indésirables. La méthode SAFE (Solvent Assisted Flavour Evaporation) qui consiste à distiller sous vide est alors une bonne alternative pour remédier à cette contrainte thermique (Engel et al., 1999). Pour se faire, un premier ballon contenant la matrice alimentaire est placé dans un bain thermostaté à 35°C. Sous l'action du vide, les composés volatils sont entraînés et récupérés dans un ballon plongeant dans un bain d'azote liquide (-196°C). Cette différence extrême de température sous vide force le passage des composés volatils dans le ballon de récupération, les séparant ainsi des composés non volatils (Figure 23).

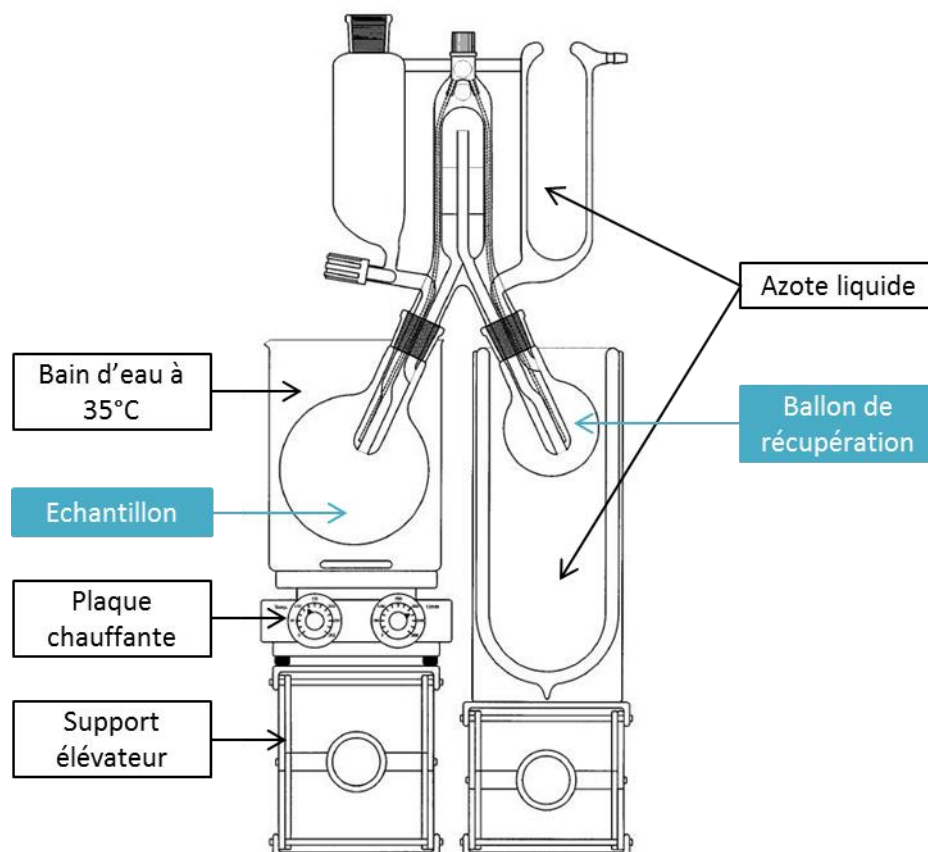


Figure 23 : Schéma du dispositif utilisé pour les extractions SAFE (Engel et al., 1999).



A 100 g de fromage blanc (à 0 ou 7,8% de matière grasse), ont été ajoutés 1 mL de solution étalon (propyl butanoate à 5,05 ng/ $\mu$ L) permettant (1) de quantifier et (2) de tester la répétabilité de la méthode d'extraction. Pour les saucisses, 50 mL d'eau ultra pure et 300  $\mu$ l de solution étalon (3-methylbutanol à 213 ng/ $\mu$ l) ont été ajoutés aux 30g de produit. Le mélange matrice (fromage blanc ou saucisse)/solvant (eau + étalon) est agité pendant 1 heure puis introduit dans le ballon « échantillon ». La distillation s'effectue sous vide à  $10^{-2}$  mbar pendant 1h30. Deux extractions ont été effectuées par matrice.

Le distillat aqueux obtenu a été extrait avec du dichlorométhane (2 x 20 mL et 1 x 10 mL pour le fromage blanc et 1 x 15 mL et 2 x 10 mL pour les saucisses). Chaque extraction est agitée pendant 15 minutes. La phase organique recueillie a ensuite été séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée. La concentration de l'extrait a été réalisée en utilisant le dispositif Kuderna-Danish plongé dans un bain thermostaté à 70°C. Les extraits ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (6890A Agilent Technologies, Massy, France).

Le chromatographe, équipé d'une colonne DB-WAX (Agilent Technologies, longueur = 30 m, diamètre interne = 0,32 mm et épaisseur du film = 0,5  $\mu$ m) a permis la séparation des composés volatils selon les conditions suivantes : température initiale à 40°C puis chauffage jusqu'à 240°C à raison de 4°C/min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (vitesse 44 cm/sec), avec un flux débit constant de 1,5 mL/min. La détection des composés s'est effectuée par couplage à la spectrométrie de masse (5973 Agilent Technologies, Massy, France). Le mode d'ionisation a été réalisé par impact électronique (70 eV). Les températures de la source ionique et de la ligne de transfert ont été fixées respectivement à 230°C et 250°C. L'identification des molécules est faite d'une part, par comparaison des spectres de masse obtenus expérimentalement avec ceux de la littérature (bibliothèques de spectres : WILEY 138, NIST, INRAMASS), et d'autre part, en prenant en compte les indices de rétention linéaires calculés (par injection d'une solution d'hydrocarbures linéaires, C8 à C30). Les IRL (indice de rétention linéaire) obtenus sont comparés à ceux des banques de données. Les données quantitatives ont été obtenues par intégration des surfaces des pics en utilisant le logiciel MSDChemstation (Agilent Technologies). Les résultats représentent le rapport de surface par rapport à l'étalon.

#### 4.2.2. Résultats fromage blanc

La grande majorité des composés d'arôme (18/22) sont retrouvés dans les deux matrices (Tableau 7). Par contre, l'intensité des composés est significativement plus importante dans le FB à 7,8% pour 4 composés d'arôme : la 2-heptanone, l'acétoïne, la 2-hydroxy-3-pentanone ou l'hexanol et l'acide butyrique. Or ces molécules sont respectivement décrites dans les bases de données comme

fromage avec une note beurre, fromage/beurre, truffe/noisette, vert/huile, fromage/laitier/crème. L'augmentation de la teneur en matière grasse dans cette matrice a donc pour conséquence d'augmenter la concentration de certains composés d'arôme. La quantité de 2,3-pentanedione, molécule à connotation grasse sélectionnée dans le cadre du projet QualigrasPhy, n'est pas significativement différente entre les deux matrices. Enfin, il aurait été intéressant d'effectuer la quantification des composés d'arôme sur les fromages blancs à 11% de matière grasse afin de déterminer les composés aromatiques apportés par l'ajout de la crème.

**Tableau 7 : Abondance des différents composés contenus dans un fromage blanc dépourvu de matière grasse et un fromage blanc avec 7,8% de matière grasse, obtenu par extraction SAFE et CPG-MS. Les résultats représentent la moyenne des deux répétitions. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).**

indice rét.	molécule	FB 0%MG		FB 7,8%MG	
1058	2,3-pentanedione	0,319	a	0,313	a
1187	2-heptanone	0	a	1,41	b
1290	acétoin	49,11	a	64,71	b
1346	3-hydroxy 2-pentanone	1,48	a	2,11	a
1362	2-hydroxy-3-pentanone (et hexanol)	0,74	a	1,37	b
1506	2,5-hexanedione	0,086	a	0,087	a
1532	dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone	0,67	a	0	a
1634	butyric acid	2,14	a	6,29	b
1851	hexanic acid	17,95	a	38,11	a
1899	dimethylsulfone	0,91	a	3,29	a
1969	heptanoic acid	0,78	a	1,72	a
2067	octanoic acid	17,21	a	27,78	a
2137	hexadecanal	0,75	a	trace	b
2187	nonanoic acid	1,84	a	1,67	a
2196	decalactone	0	a	3,51	a
2284	decanoic acid	8,48	a	20,08	a
2352	9-decenoic acid	1,17	a	1,34	a
2398	tetracosane	1,02	a	trace	a
2429	gamma-dodecalactone	0	a	1,71	a
2504	dodecanoic acid	2,66	a	6,59	a
2596	hexacosane	2,12	a	1,49	a
2696	heptacosane	2,24	a	0,99	a

#### 4.2.3. Résultats saucisses

Les résultats des extractions SAFEs menés sur les 4 matrices de l'étude n'ont pas mis en évidence de grandes variations de composition (Tableau 8). Seuls l'alpha-pinene et le 1-octen-3-ol sont significativement plus élevés dans la saucisse à 15% de matière grasse avec fibres de Psyllium que dans les autres produits. Ces deux composés sont décrits dans les bases de données comme ayant respectivement des notes d'herbe et de champignon/huile/vert. Certains composés sont présents en

quantité significativement plus abondante dans la saucisse de référence à 27% de matière grasse : le nonanal, le camphre, le linalool, le 4-terpineol, le borneol, le 2-methoxyphenol, le methyleugenol, l'eugenol et le myristicin.

Il est possible que les matrices les plus grasses limitent la perte de certains composés d'arôme au cours de la cuisson. Par ailleurs, la majorité des composés d'arôme identifiés semblent liés aux épices utilisées lors de la fabrication des saucisses. En effet, les saucisses ont été toutes épicées de la même manière. Les différences pouvant exister entre les matrices (hors ces épices) pourraient donc être masquées.

**Tableau 8 : Abondance des différents ions contenus dans des saucisses à 15 et 27% de matière grasse avec ou sans fibres, obtenu par extraction SAFE et CPG-MS. Les résultats représentent la moyenne des deux répétitions. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).**

indice rét.	molécule	saucisse 15%MG		saucisse 15%MG Psyllium		saucisse 15%MG manioc		saucisse 27%MG	
1017	alpha-pinene	0,10	a	0,16	b	0,08	a	0,10	a
1078	hexanal	0,12	a	0,03	b	trace	b	0,04	b
1102	béta-pinene	0,14	a	0,19	a	0,13	a	0,16	a
1121	2,4,5-trimethyl-3-oxazoline	trace	a	0,07	b	0,07	b	0,05	b
1145	étalon 1 (butanol) + terpène	0,37	a	0,37	a	0,31	a	0,29	a
1194	limonène	0,18	a	0,20	a	0,14	a	0,14	a
1205	eucalyptol	0,28	ab	0,35	a	0,29	ab	0,26	b
1243	gamma-terpiene	0,11	a	0,10	a	0,07	a	0,14	a
1251	styrene	0,02	a	0,02	a	0,14	a	trace	a
1266	p-cymene	0,16	a	0,13	a	0,10	a	0,14	a
1278	acetoine	0,10	a	0,06	a	0,13	a	0,10	a
1280	terpinolene	0,06	a	0,05	a	0,02	a	0,06	a
1391	nonanal	0,02	a	0,03	a	0,03	a	0,04	b
1451	1-octen-3-ol	0,03	a	0,04	b	0,02	a	0,03	a
1465	trans hydrate de sabinene	0,48	a	0,49	a	0,51	a	0,50	a
1491	alpha-copaene	0,08	a	0,11	a	0,08	a	0,11	a
1502	inconnu	0,00	a	0,13	b	0,08	ab	0,02	b
1503	inconnu	0,00	a	0,10	b	0,05	ab	0,03	b
1509	camphor	0,16	a	0,17	a	0,16	a	0,40	b
1545	linalool	2,32	a	2,49	a	2,48	a	5,77	b
1563	cis-p-2-menthen-1-ol	0,03	a	0,03	a	0,03	a	0,04	a
1594	béta-caryophyllene	0,79	a	0,83	a	0,80	a	0,66	a
1601	4-terpineol	0,44	a	0,47	a	0,49	a	0,60	b
1608	2,4,5-trimethyl-2-(1-hydroxyethyl)-3-oxazoline	0,00	a	0,04	a	0,13	a	trace	a
1623	2,4,5-trimethyl-2-(1-hydroxyethyl)-3-oxazoline	0,00	a	0,02	a	0,04	a	0,00	a
1666	alpha-humulene	0,07	a	0,08	a	0,08	a	0,07	a
1695	alpha-terpineol	0,25	a	0,28	a	0,29	a	0,27	a

1700	borneol	0,04	a	0,04	a	0,04	a	0,07	b
1718	zingiberene	0,19	a	0,22	a	0,22	a	0,10	a
1725	beta-bisabolene	0,10	a	0,09	a	0,10	a	0,09	a
1746	alpha-farnesene	0,06	a	0,06	a	0,06	a	0,06	a
1767	beta-sesquiphellandrene	0,09	a	0,10	a	0,11	a	0,07	a
1770	alpha-curcumene	0,15	a	0,16	a	0,15	a	0,07	a
1813	inconnu	trace	a	0,07	b	0,06	b	0,02	a
1844	p-cymen-8-ol	0,03	a	0,06	a	0,06	a	0,07	a
1851	2-methoxyphenol	trace	a	trace	a	trace	a	0,19	b
1867	safrole	0,53	a	1,17	a	1,10	a	0,58	a
1907	2,6--di-tert-butyl-4-methylphenol	0,03	a	0,04	a	0,04	a	0,04	a
1948	2-methoxy-crésol	trace	a	0,07	b	0,08	b	0,02	a
1979	beta-caryophyllene oxide	0,04	a	0,00	a	0,00	a	0,02	a
1996	inconnu	0,02	a	0,03	a	0,02	a	0,07	a
2007	methyleugenol	0,10	a	0,12	a	0,14	a	0,21	b
2040	inconnu	trace	a	0,03	a	0,05	a	trace	a
2045	inconnu	0,00	a	trace	a	0,03	a	0,00	a
2158	eugenol	0,04	a	0,05	b	0,04	ab	0,06	c
2221	elemicin	0,06	b	0,03	a	0,09	c	0,09	c
2255	myristicin	0,67	a	0,98	b	1,19	ab	1,30	c

### 4.3. Libération des composés d'arôme *in vitro*

#### 4.3.1. Matériels et Méthodes

L'espèce de tête a été suivi au moyen du PTR-MS. 100 g de fromage blanc à différentes teneurs en matière grasse (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,8 et 11%) ont été introduits dans des flacons de 500mL. Les flacons ont été laissés à température ambiante durant 12h pour que les composés d'arôme puissent atteindre l'équilibre entre la phase solide et la phase gazeuse. Les paramètres du PTR-MS utilisés dans cette partie ont été les suivants : temps d'enregistrement = 85 secondes, débit = 65 mL/min, vitesse de scan 500 msec, tension du drift 486 V, température de la ligne de transfert 80°C, pression du drift tube = 2,11 mbar, température du drift tube 80°C, E/N=121 Td (1 Td=10<sup>-17</sup> cm<sup>2</sup> V). Les mesures ont été réalisées à température ambiante.

#### 4.3.2. Résultats

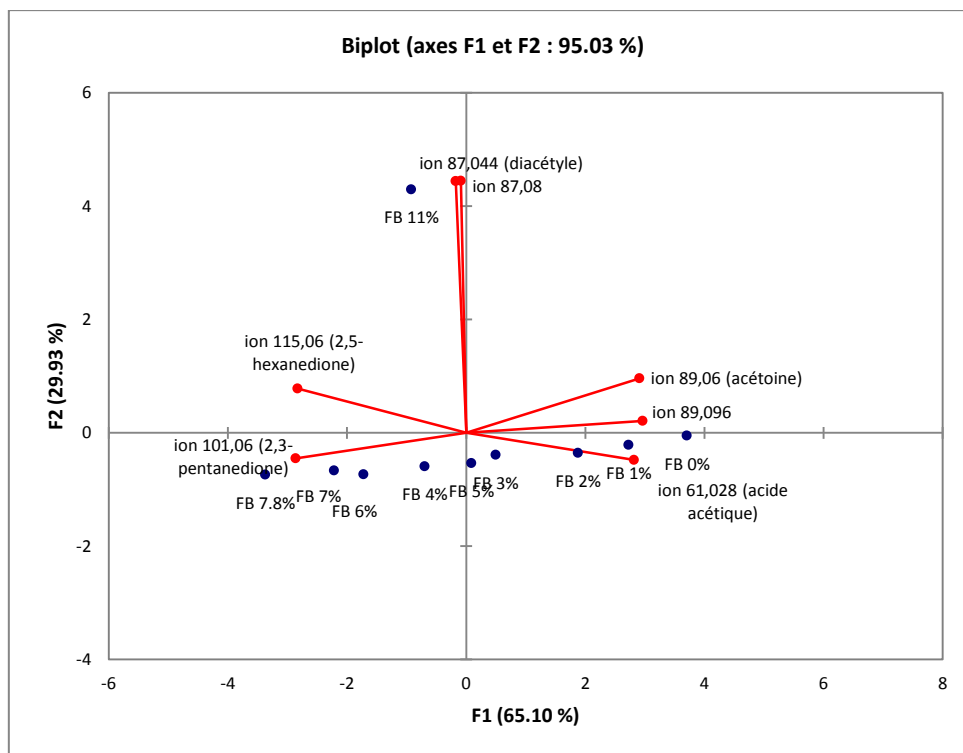
Par cette méthode il a été possible de suivre 7 ions. D'après les spectres obtenus en CPG-MS (à partir des SAFEs), ces ions pourraient correspondre à l'acide butyrique, le diacétyle, l'acétoïne, la 2,3-pentanedione et la 2,5-hexanedione. L'augmentation de la teneur en matière grasse réduit la libération des ions 61,028 (acide acétique), 87,044 (diacétyle), 87,08 (non identifié), 89,06 (acétoïne) et 89,096 (non identifié) et augmente légèrement la libération des ions 101,06 (2,3-pentanedione) et

115,06 (2,5-hexanedione) (Tableau 9). Le passage de 7,8% à 11% de matière grasse obtenu par un ajout de crème a augmenté les quantités de libération des ions 87,044 (diacétyle) et 87,08. La quantité de diacétyle libéré par le fromage blanc à 11% de matière grasse est 10 fois supérieure à celle du fromage blanc à 0% de matière grasse et provient certainement de la crème ajoutée.

**Tableau 9 : Données en intensité (nCPS) avec soustraction du brut de fond de l'aire sous la courbe sur 85 secondes des molécules présentes dans des fromages blancs à 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,8 et 11% de matière grasse.**

Teneur en MG	ion 61,028 (acide acétique)	ion 87,044 (diacétyle)	ion 87,08 (non identifié)	ion 89,06 (acétoïne)	ion 89,096 (non identifié)	ion 101,06 (2,3-pentanedione)	ion 115,06 (2,5-hexanedione)
0%	453	496	68	118	16	6	2
1%	469	429	67	110	13	6	2
2%	428	372	62	96	11	6	2
3%	434	323	61	94	9	7	3
4%	399	261	54	79	8	8	3
5%	419	271	54	80	8	7	3
6%	336	180	52	65	6	8	3
7%	338	131	48	64	5	8	3
7,8%	321	100	47	53	4	8	4
11%	359	4860	252	89	8	7	3

Le biplot de l'ACP (Analyse en Composantes Principale) de l'ensemble des FB pour l'ensemble des ions mesurés au PTR-MS (Figure 24) classe les FB selon leurs teneurs en matière grasse sur l'axe 1. Si les fromages blancs formulés à partir des deux fromages blancs à 0 et 7,8% se répartissent bien le long de l'axe 1, le fromage blanc avec addition de crème (11%) est très bien discriminé sur l'axe 2. Les composés d'arôme apportés par la crème sont majoritairement le diacétyle et l'ion 87,08. Par ailleurs, sur l'axe 1, le fromage blanc à 11% n'est finalement pas différent, en termes de libération des FB à 4 et 5%. Par conséquent, il aurait été intéressant de connaître la composition aromatique de la matrice 11% de matière grasse pour savoir si cette différence de libération venait d'une différence de composition.



**Figure 24 : Projection de la quantité d'arôme libérée des fromages blancs à différentes teneurs en MG (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.8 et 11%) sur le plan 1-2 de l'ACP (individus, points bleus). Les points rouges (variables) représentent les composés aromatiques étudiés.**

L'ajout de crème dans le fromage blanc entraîne donc une libération caractéristique de diacétyle contrairement au fromage blanc à 7,8% caractérisé par la libération plus importante de 2,3-pentanedione et par le 2,5-hexanedione. La 2,5-hexanedione est décrite comme ayant une note de « sweet aromatic ». La 2,3-pentanedione décrite comme « beurre » est donc bien liée aux produits gras. Cela conforte la pertinence du choix des molécules du projet QualigrasPhy. Le diacétyle aurait également pu être choisi mais il n'a pas pu être utilisé pour des raisons réglementaires. Enfin, les fromages blancs à faible teneur en matière grasse sont caractérisés par l'acétoïne, l'acide acétique et l'ion 89,096.

#### 4.4. Discussion et conclusion

Nous avons vu que les sujets sont capables de discriminer les saucisses à 15 et 27% de matière grasse uniquement sans pince-nez et que l'ajout de la fibre de Psyllium a permis de compenser la réduction de 12% de matière grasse. Nous avons conclu de ces observations que la dimension olfactive était indispensable à la perception du gras dans ces saucisses. Nous avons alors émis l'hypothèse que la réduction de la teneur en matière grasse et l'addition de fibre de Psyllium modifiait soit la composition en composés d'arôme des matrices soit leur libération. La modification de leur

libération pouvait s'exercer soit par des interactions physico-chimiques entre les composés d'arômes et les autres constituants des saucisses (matière grasse ou fibres) soit par une modification de leur diffusion par modification de la texture.

Pour vérifier l'hypothèse, nous avons extraits les composés d'arômes des différentes saucisses par SAFE puis analysés la composition de ces extraits par CPG-MS. Nos résultats montrent très peu de différences de composition aromatique entre les différentes saucisses. Les différences perceptives de niveaux de gras ne viendraient donc pas d'une différence de composition aromatique des matrices. Néanmoins, ces résultats sont à relativiser pour deux raisons. D'une part, les extractions de composés d'arôme ont été effectuées sur saucisses non préalablement chauffées, alors que les saucisses avaient été chauffées lors des tests sensoriels. Or, il est tout à fait possible que des composés d'arôme aient été perdus lors de ce chauffage (bien que les saucisses soient des produits cuits) et que cette perte ait été inégale en fonction de la composition de la matrice. Il aurait donc été plus pertinent de faire l'extraction dans les mêmes conditions que les tests d'analyse sensorielle. D'autre part, la plupart des composés d'arôme extraits sont des arômes apportés par les épices ajoutés dans la formulation des saucisses. Il est donc possible que les différences de composition aromatique dues à la matière grasse d'une part et à la présence des fibres de Psyllium d'autre part soient plus faibles en quantité et donc non détectées par les méthodes analytiques utilisées tout en étant suffisante pour modifier la nature et/ou l'intensité de l'arôme perçu.

Partant du principe que la composition aromatique des matrices est similaire et n'explique donc pas la perception, reste l'hypothèse de la différence de libération des composés d'arôme entre la saucisse à 15% et celle à 27% de matière grasse d'une part et avec fibre de Psyllium d'autre part. Pour vérifier cette hypothèse, nous aurions souhaité étudier la libération *in vitro* et *in vivo* par PTR-MS. Il aurait également été intéressant de réaliser un profil sensoriel de ces trois saucisses afin de déterminer les modifications induites par l'addition de matière grasse d'une part et de fibres de Psyllium d'autre part. Ne disposant pas de suffisamment d'échantillon pour faire ces analyses, l'étude de ces différentes saucisses n'a pas été poursuivie.

Concernant les fromages blancs, les tests sensoriels réalisés sans pince-nez ont montré que le produit à 7,8% de matière grasse a été perçu comme étant plus gras que celui à 0% de matière grasse. Par ailleurs, l'ajout d'une seule molécule d'arôme à connotation grasse n'a pas été suffisant pour augmenter la sensation de gras. Il est alors envisageable que la perception du gras n'ait pas été induite exclusivement par l'arôme, mais aussi par une composante de texture et/ou de saveur.

La composante de texture a été étudiée au travers de tests de viscosité et de tribologie. Les résultats des mesures de viscosité ont mis en évidence l'importance de la température du produit puisque à 15°C les fromages blancs sont d'autant plus visqueux que la teneur en matière grasse augmente, alors qu'à 7°C la viscosité est indépendante de la teneur en matière grasse. Selon Engelen et al. (2003), une augmentation de la température entraîne une diminution de la viscosité. Cette différence pourrait provenir de la structure de l'émulsion probablement différente en fonction du niveau de gras des fromages blancs et qui réagirait différemment à la température.

A 7°C, température de consommation des produits lors des tests de classement, les sujets ont perçu les fromages blancs à 7,8% de matière grasse plus gras que les fromages blancs à 0% alors que la viscosité mesurée n'est pas significativement différente. Ce résultat suggère qu'à 7°C, la différence de gras perçue n'a pas été induite par une différence de viscosité (sauf si les sujets sont plus sensibles que le viscosimètre utilisé), mais par d'autres différences de texture comme la friction, la sensation de « collant », ou par des sensations somesthésiques, olfactives et/ou gustatives. Nos résultats montrent une diminution importante du coefficient de frottement avec l'augmentation de la teneur en matière grasse. De façon surprenante, la chute brutale du coefficient de frottement entre les produits à 0% et 1% de matière grasse n'a pas impacté la perception sensorielle du gras puisque les sujets n'ont pas été capables de discriminer les fromages blancs à 0 et 3% de matière grasse. Ce résultat suggère que la perception du gras nécessite une importante diminution des frottements en bouche. Cette diminution des frottements pourrait donc expliquer au moins en partie les différences de perception du gras. Cependant, ces mesures ont été effectuées uniquement à 20°C. Il aurait donc été pertinent de mesurer ces coefficients de frictions à 7°C et 15°C pour pouvoir tirer des conclusions plus précises sur le rôle des changements de coefficients de friction dans la perception du gras.

A 15°C, la viscosité mesurée augmente significativement avec l'augmentation du taux de matière grasse. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sonne et al. (2014), qui montrent que les yaourts les plus gras sont plus visqueux mais avec un coefficient de frottement plus faible. Il est donc envisageable que la mise en bouche du produit entraîne une rapide augmentation de la température du produit et par conséquent une modification de sa viscosité.

Enfin, toujours dans le domaine de la texture, il a été montré que la viscosité plus importante des produits plus gras induisait un tapissage en bouche plus important (Guichard et al., 2010) et que la perception de la matière grasse de crèmes desserts augmentait lorsque le tapissage en bouche augmentait (De Wijk et al., 2006). Selon Guichard et al. (2010), un produit plus gras serait plus visqueux induisant un tapissage en bouche plus important. L'étude de De Wijk et al. (2006) a mis en



évidence l'élévation de la perception de la matière grasse de crèmes desserts lorsque le tapissage en bouche augmentait. Aussi, pour conclure sur la texture, nous pouvons supposer que le tapissage en bouche est un facteur important de la perception du gras.

Nous avons aussi émis l'hypothèse que les composés d'arôme ne sont pas libérés de façon similaire entre les fromages blancs à différentes teneurs en matière grasse, entraînant des différences de perception sensorielle. Cette hypothèse est soutenue par nos résultats de libération *in vitro* au PTR-MS qui ont montré une diminution de libération de la majorité des arômes suivis avec l'augmentation du taux de matière grasse et ce, malgré une composition aromatique similaire en qualité mais avec des quantités plus importante dans le fromage blanc à 7,8%. La majorité des composés d'arôme ont donc tendance à être retenus dans la matrice avec l'augmentation de la teneur en matière grasse. Cependant, le fromage blanc à 7,8% de matière grasse libère davantage de 2,3-pentanedione et de 2,5-hexanedione que le FB à 0% malgré une composition similaire. D'après la littérature, l'hydrophobicité des composés (représenté par le log P) pourrait être à l'origine des différences de libération. Un log P positif correspond à une molécule lipophile contrairement à un log P négatif qui correspond à une molécule hydrophile. Les log P de l'acide acétique, du diacétyle et de l'acétoïne sont négatifs tout comme le log P de la 2,3-pentanedione. Ainsi, ce paramètre ne permet pas à lui seul d'expliquer les différences de libération en fonction du taux de matière grasse. Tout comme l'hydrophobicité, la nature des molécules ne permet pas d'expliquer les différences de libération. En effet, la 2,3-pentanedione et la 2,5-hexanedione libérées majoritairement dans le FB à 7,8%, le diacétyle libéré majoritairement dans le FB à 11% et l'acétoïne libérée majoritairement dans le fromage blanc à 0% contiennent tous une fonction cétone. Etant donné que les produits plus gras sont plus visqueux à haute température, nous supposons que l'augmentation de la viscosité est responsable du maintien des molécules dans la matrice. En effet, le lien entre l'augmentation de la teneur en matière grasse, l'augmentation de la viscosité et la diminution de la libération des composés d'arôme a déjà été montrée (Guichard et al., 2010). De plus selon Engelen et al. (2003), les sujets perçoivent mieux le gras à haute température suite à l'augmentation de la libération des composés d'arôme dans la cavité nasale. En effet, le passage de 25 à 50°C modifie le coefficient de partage des composés organiques volatils entre le produit (phase solide) et la phase gazeuse (Ventanas et al., 2010) pouvant conduire à une concentration de molécules odorantes plus importante au niveau de la muqueuse olfactive (Engelen et al., 2003).

L'augmentation de la teneur en matière grasse dans les fromages blancs induit donc une augmentation de la viscosité (au moins à 15°C) et une diminution du coefficient de friction. Ces changements de texture, alliés au changement de composition expliqueraient les différences de libération des composés. Enfin, le tapissage en bouche des produits les plus gras pourrait également

intervenir dans la sensation de gras. La caractérisation sensorielle des produits qui fait l'objet de la partie qui suit, devrait apporter des informations sur les dimensions sensorielles impliquées dans la perception de la matière grasse dans la matrice fromage blanc.

## 5. Caractérisation sensorielle des produits et tapissage en bouche

L'enjeu de cette étape a été de décrire les caractéristiques sensorielles des fromages blancs par la méthode la plus complète de toutes les méthodes d'analyse sensorielle descriptive : le profil sensoriel. L'objectif était d'identifier les perceptions influencées par (1) la variation de la teneur en matière grasse et (2) l'ajout d'un arôme à connotation grasse, de façon à pouvoir compenser les changements induits par la réduction de la matière grasse. Une attention particulière a été portée sur la température de service qui modifie la viscosité du produit, comme nous l'avons vu précédemment et qui pourrait influencer la perception du gras (Engelen et al., 2003).

### 5.1. Profil sensoriel (article 1)

#### **Résumé de la publication**

Avec la demande croissante de produits réduits en gras, il est important d'identifier les caractéristiques sensorielles influencées par la réduction de la teneur en matière grasse dans un produit de consommation courante.

Dans ce contexte, ce travail étudie l'impact de la teneur en matière grasse et de la température de service sur les caractéristiques sensorielles de fromages blancs.

Pour ce faire, un profil sensoriel a été réalisé afin de caractériser cinq FB à différentes teneur en matière grasse (0, 1, 3, 8 et 11% de matière grasse) et deux fromages blancs à 1% de matière grasse aromatisés à 0,07 et 0,13% d'un arôme « crème ». Pour tenir compte des diverses situations de consommation soit en sortie de réfrigérateur, soit en situation de consommation cafétéria, le profil sensoriel a été effectué à 7 et 15°C (respectivement).

La réduction de la teneur en matière grasse dans la matrice fromage blanc a impacté l'olfaction, la gustation et les sensations trigéminales en bouche. En termes de saveur, la diminution du niveau de gras entraîne une augmentation de l'amertume. En termes d'odeur, cette réduction a diminué l'intensité perçue du descripteur « crème ». Enfin, les produits peu gras sont perçus comme étant plus astringents et laissant un « film de gras » moins important. Le profil sensoriel a montré une très

forte corrélation entre les descripteurs « film de gras » et « gras » et la température de service a impacté uniquement l'épaisseur perçue.

NOTE

## Sensory properties linked to fat content and tasting temperature in cottage cheese

Christophe Martin<sup>1</sup> · Rachel Schoumacker<sup>1</sup> · Doris Bourjade<sup>1</sup> ·  
Thierry Thomas-Danguin<sup>1</sup> · Elisabeth Guichard<sup>1</sup> ·  
Jean-Luc Le Quéré<sup>1</sup> · Hélène Laboure<sup>1,2</sup>

Received: 7 April 2016 / Revised: 22 July 2016 / Accepted: 31 July 2016  
© INRA and Springer-Verlag France 2016

**Abstract** There is a growing interest in developing low-fat products in response to increased consumer demand. However, fat reduction often leads to low sensory acceptability by consumers. The identification of the sensory characteristics impacted by the reduction of fat is a first step to choose the most appropriate strategy to offset the adverse effects of a fat reduction. This work examined the impact of fat content and tasting temperature on the sensory characteristics of cottage cheese. A conventional sensory profile was conducted to characterize seven cottage cheeses at two tasting temperatures (7 and 15 °C). Five products differed based on their fat content (0, 1, 3, 8, and 11%), while the last two contained 1% fat and were flavored by the addition of 0.07 and 0.13% cream flavor. Differences among the cottage cheeses varying in fat content were based on a range of differences related to aroma (mainly a cream aroma), taste (mainly bitterness), trigeminal sensation (astringency), and texture (greasy film). The tasting temperature did not impact taste, aroma, or astringency. However, thickness was strongly modified by tasting temperature, regardless of the fat content of the different cottage cheeses. Moreover, this study suggests that fattiness is difficult to define and that this descriptor could be advantageously replaced by greasy film which was shown to be highly reliable in discriminating between various fat contents in cottage cheese.

**Keywords** Fat content · Sensory profile · Dairy product · Cottage cheese

---

Martin Christophe and Schoumacker Rachel contributed equally to this work.

✉ Christophe Martin  
christophe.martin@dijon.inra.fr

<sup>1</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation CNRS, INRA, University Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

<sup>2</sup> AgroSup Dijon, 21000 Dijon, France

Published online: 07 September 2016

## 1 Introduction

Health concerns related to fat overconsumption have led the food industry to design products with reduced-fat contents. However, developing low-fat food without altering their sensory properties is often challenging because fat contributes to the overall quality of the products and, thus, influences their acceptability. A classical strategy for increasing acceptability of low-fat foods is to rebalance the sensory characteristics impacted by fat reduction to keep the global sensory profile of the reduced-fat foods unchanged. To successfully employ this strategy of compensation, one needs to fully understand how fat is perceived in the studied products or, more precisely, to have a perfect knowledge of the sensory characteristics impacted by the reduction of fat. Fat perception is considered multimodal and involves in-mouth tactile sensations and olfactory, taste, and somatosensory cues (Mattes 2009). Indeed, sensory discrimination of samples varying in fat content is likely based on differences in the perception of several descriptors that rely on different sensory modalities, among which textural cues are thought to be predominant. Nevertheless, Le Calvé et al. (2015) recently showed that the most efficient sensory dimensions involved in the ability to discriminate among samples varying in fat content depend on the type of food product. For instance, in white sauces, taste and texture were found to be the most effective modalities for fat level sensory discrimination below 15% or above 30% fat content, whereas olfactory cues prevail to discriminate fat content variation in between 15 and 30%. In milk (0, 2.7, and 3.8% fat) and stirred yoghurt (0.5 and 1.75% fat), taste and texture perceptions did not favor the discrimination between fat levels in plain products, whereas visual and olfactory cues did. Some authors have examined the effect of the tasting temperature of the food on fat perception. Here again, the results differed according to the products. However, for dairy products, it seems that differences between samples varying in fat content are more noticeable at higher tasting temperatures, and a recent study showed that detection and differential thresholds for fat in cottage cheeses were lower at 15 °C than at 7 °C (Engelen et al. 2003, Mela 1988, Schoumacker et al. 2016).

This work aimed to provide a full description of the sensory characteristics of cottage cheeses varying in fat content. The main objective was to identify the characteristics linked to the perception of fat content, with the idea that these characteristics could be modulated to compensate for the effects of fat reduction in reduced-fat cottage cheeses. A secondary objective was to study the extent to which tasting temperature modified the sensory profiles of the different cottage cheeses, especially for sensory characteristics related to fat content. This last objective was motivated by the fact that in everyday life, cottage cheese can be consumed at very different temperatures depending on the context, namely, straight from the refrigerator or several tens of minutes after removal from the refrigerator, as in a cafeteria.

Moreover, the identification of the main sensory characteristics linked to fat content and their modification in relation to tasting temperature will provide better insights on the multimodal aspects of fat perception in dairy products.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Experimental conditions

All sessions took place in an air-conditioned ( $21 \pm 2$  °C) sensory testing room of the ChemoSens platform (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, Dijon) using standardized booths equipped with computers. All tests were conducted under white light in the room and booths. Data acquisition was performed using the FIZZ software (Biosystemes, Couternon, France).

### 2.2 Panelists

Thirty-two subjects with previous experience in sensory descriptive analyses (participation in at least one study involving sensory profile) were invited to participate in two selection sessions. From this group, the 16 best panelists were selected based on the results achieved for several tests intended to assess the following abilities : (i) olfactory capabilities (ETOC, European test of olfactory capabilities, Thomas-Danguin et al. 2003), (ii) the ability to identify the five basic tastes and to classify sapid and aroma solutions according to their perceived intensity, (iii) the ability to focus one's attention while performing a complex task (Bourdon T.I.B. test, Swets & Zeitlinger BV, Calisse, The Netherlands), and (iv) the ability to produce appropriate terms to describe the sensations perceived while tasting the three samples of plain dairy products (cottage cheese, yoghurt, Petit-Suisse cheese). The selected panel was composed of ten women and six men, ages 42 to 66 years (mean age, 55 years). These panelists signed an informed consent form and were compensated for their participation. They came to the laboratory over 3 months, twice a week at lunchtime for a 1.5-h session, and they were asked to not eat or drink anything except water, not smoke, and not brush their teeth for 1 h prior to the session.

### 2.3 Products

Seven cottage cheeses were characterized at two tasting temperatures (7 and 15 °C). Five differed in their fat content (0, 1, 3, 8, and 11%, noted as F0, F1, F3, F8, and F11, respectively), while the last two contained 1% fat and 0.07 and 0.13% cream flavor formulated by Firmenich SA (Genève, Suisse) and were noted as F1+ and F1++, respectively. This flavor was formulated with seven aroma compounds in medium chain triglycerides (MCT) solvent. The F0 and F8 samples were commercial cottage cheeses (Paturage® Intermarché, France). Mixtures of these two commercial products were used to obtain the F1 and F3 samples. Double cream containing 30% fat (Paturage®, Intermarché, France) was added to F8 to obtain the F11 sample. The two flavored cottage cheeses (F1+ and F1++) were added to the set of samples tested to examine the influence of the added cream flavor on fat perception. The flavoring was made at least 24 h before the assessment (the time required for equilibration). In order to obtain a good distribution of the added flavor into the cottage cheese, the mixture was manually whipped during 1 min. Although not flavored, all of the other products were also whipped during this same 1-min period. A few hours before the evaluation,

all products were whisked for 30 s and placed in coded disposable plastic cups with lids (50 g of cottage cheese per cup). Samples were then stored for at least 1.5 h in cold rooms at the target tasting temperature (7 or 15 °C). The actual sample temperatures were systematically recorded: for the low and high temperatures, the samples were served at 6.8 °C (+/-0.1) and 14.9 °C (+/-0.1), respectively. Viscosity measurements were performed with a rotating shear rate imposed rheometer (Rheomat RM200, Lamy Rheology, Champagne au Mont d'Or, France) equipped with a coaxial cylinder (MS-DIN 11). The measurements were done using a shear rate of 10 s<sup>-1</sup>. Titratable acidity was determined according to the method described in ISO/TS 11869 (2012). The results were expressed in Dornic degrees (°D), and the amount of lactic acid was calculated using the following relationship: 1 °D = 0.1 g lactic acid.

## 2.4 Sensory profile

Flavor, texture, trigeminal sensations, and after swallowing sensations were described and evaluated using a conventional sensory profile (ISO 6564: 1985). Sixteen sessions were devoted to the development of a vocabulary to describe the sensory characteristics and to the training of panelists. The quantitative descriptive analysis began with the development of a common list of descriptors that comprehensively and accurately described the sensory characteristics of the cottage cheeses. The selection of the attributes included in the final list was based on a consensus procedure. Panelists were trained in the quantification of the selected descriptors using visual analog scales. They make a mark on a line to indicate the intensity of each characteristic (0 to 10 scores, real number with one decimal). Late in the training sequence, a series of trial evaluations were performed to evaluate panelist performance and to determine the end of the training. The usual performance criteria were considered: discriminatory power (ability of the panelists to differentiate between the products based on their attributes), agreement within the group (how an individual agrees, on average, with the panel as a whole), and repeatability (ability to provide the same attribute scores to the same product). The methods used to monitor the performance of a quantitative sensory panel are described in ISO 11132 (2012). The sixteen training sessions yielded a final list of 14 attributes that exhibited significant differences among the products: perceived temperature, thickness, remaining quantity in mouth, fattiness, greasy film (after feeling), firm, butter, cream, persistence of aroma, sour, bitter, umami, astringency, and the persistence of taste. The definition of each descriptor is provided in Table 1. The definitions of the texture attributes were largely based on the ISO 5492: 2008 standard. Aroma descriptors were illustrated with fresh food products (e.g., fresh butter for butter aroma). Sapid compounds in aqueous solutions were used to illustrate taste characteristics (e.g., quinine for a bitter taste). An exception was made for the fattiness attribute, which should reflect a global perception of fat content. Even if this descriptor was used efficiently by the panel, it was not possible to describe clearly the assessment protocol for this sensation during the training period. However, the panelists agreed with the proposed definition: property relative to the perception of the quantity of fat in the product.

After the training phase, six measurement sessions were held. Samples of the same cottage cheese that were evaluated at 7 and 15 °C were considered as two different

Table 1 Definition of the 14 sensory attributes

Descriptor	Definition
Perceived temperature	Perceived temperature
Thickness	Property relative to resistance to flow. Thickness was evaluated with a preset amount of product (equivalent to a spoon). Intensity of thickness was evaluated by compressing the cottage cheese between tongue and palate and by evaluating the strength required to allow the product to flow on sides of the tongue
Fattness	Property relative to the perception of the quantity of fat in the product
Greasy film (after feel)	Property relative to lubricity. The intensity of the greasy film was evaluated after swallowing product by rubbing the tongue against the palate (greasy feeling in mouth)
Remaining quantity in mouth	Remaining quantity in mouth was evaluated with a preset amount of product (equivalent to a spoon). Residual amount of product in mouth after swallowing
Farm	Aroma evoking raw milk, cow, and farm/barn
Butter	Aroma evoking butter. Reference sample: butter at room temperature
Cream	Aroma evoking cream. Reference sample: double cream at room temperature
Persistence of the aroma	The time during which aroma (global sensation) is perceptible, after swallowing
Sourness	Acid taste. Reference sample: aqueous solution of citric acid (0.75 g.L <sup>-1</sup> )
Bitterness	Bitter taste. Reference sample: aqueous solution of quinine chlorhydrate (15 mg.L <sup>-1</sup> )
Umami	Taste produced by dilute aqueous solutions of a certain kind of amino acid or nucleotide such as monosodium glutamate. Reference sample: aqueous solution of monosodium glutamate (0.4 g.L <sup>-1</sup> )
Astringency	Complex sensation accompanied by shrinking, drawing, or puckering of the mucosal surface in the mouth, produced by substances such as sloe tannins
Persistence of taste	The time during which taste (global sensation) is perceptible, after swallowing

products to create the experimental design, which therefore contained 14 products. All of the products were evaluated in triplicate. For each replicate, the products were randomly divided into two blocks (seven products evaluated per session), and the samples were presented in a randomized order.

## 2.5 Statistical analysis

All of the data (zero to ten scores) were exported into the SAS® software (SAS Institute, Cary, NC, USA) for analysis.

Performance tests were conducted using the CAP (Control of Assessors' Performance) method, which produces a summary table that assesses the performance of the group and of each panelist (Schlich 1997).

For each descriptor, analyses of variance (ANOVA) were performed using the GLM procedure, according to the following model: intensity = panelist + product + temperature + panelist\*product + panelist\*temperature + product\*temperature + error (random panelist factor). Note that the product factor considered independently from the temperature factor in the ANOVA model is mostly driven by fat level because, except for the three 1% fat cottage cheeses (F1, F1+, and F1++), fat content was different for all products. This aspect was considered during the interpretation of the ANOVA



results. When the product effect was significant, multiple comparisons of the means were performed using the Student–Newman–Keuls (SNK) method ( $\alpha = 0.05$ ). Student's *t* tests for two independent samples were performed ( $\alpha = 0.05$ ) in a few cases, for example, to compare the intensity of a descriptor for flavored and non-flavored products. The multidimensional representation selected to present the main sensory characteristics of the cottage cheeses was a Biplot (the superimposition of observation components and variable loadings multiplied by a constant) generated from the principal component analysis (PCA) performed on the covariance matrix (Gabriel 1971). A multiple linear regression analysis (upward stepwise model) was performed to find out how well the variability of fat content could be predicted by the intensity of one or several of the sensory characteristics evaluated during the sensory profile analysis.

### 3 Results and discussion

The performance of the panelists during the measurement phase was evaluated. The results showed that one of the 16 panelists was not as efficient as the others (poor discriminatory power, lack of repeatability); consequently, the results from this panelist were not considered in subsequent analyses. The effect of the panelist factor was significant for all descriptors, indicating inter-individual differences, which is almost always the case for sensory profile data. These inter-individual differences are fully taken into account through the panelist factor, and results for the other factors remain interpretable.

The results of the ANOVA (Table 2) show that 11 out of the 14 descriptors were influenced by the fat content (or by the added flavor) but not by the tasting temperature. Perceptions of cream aroma, greasy film, and fattiness increased with increasing fat content, and in general, significant differences between the five levels of fat could be observed (Table 3). Conversely, bitterness and astringency decreased with increasing fat content. For these five descriptors, the relationship with fat content was easily modeled using linear regressions, with a very good adjustment quality for the models (cream aroma =  $0.4 \cdot \text{fat content} + 2.4$ ,  $R^2 = 0.97$ ; greasy film =  $0.3 \cdot \text{fat content} + 3.5$ ,  $R^2 = 0.96$ ; fattiness =  $0.3 \cdot \text{fat content} + 4.0$ ,  $R^2 = 0.96$ ; astringency =  $-0.1 \cdot \text{fat content} + 2.4$ ,  $R^2 = 0.87$ ; bitterness =  $-0.2 \cdot \text{fat content} + 2.9$ ,  $R^2 = 0.81$ ). The persistence of aroma increased with increasing fat content, but for this descriptor, the correlation was better without the flavored samples included in the analysis (persistence of aroma =  $0.3 \cdot \text{fat content} + 3.1$ ,  $R^2 = 0.99$ ). It is interesting to note the almost perfect linear relationship between the descriptor greasy film and fattiness ( $y = 1.1x + 0.1$ ;  $R^2 = 0.99$ ). This indicates that subjects roughly assigned the same score for both descriptors. This result suggests that the greasy film descriptor represents an important part of perceiving fattiness (multidimensional perception) or is a good predictor of fat content in cottage cheeses. The significant product effect observed for the descriptor farm aroma and umami taste was mainly related to the flavored samples. Indeed, samples with the added cream flavor had a more intense farm aroma and umami taste than the other samples (mean value 3.2 versus 1.9,  $t = 3.6$ ,  $P < 0.001$ ). Moreover, the intensities for the descriptor cream aroma and fattiness were almost the same for the flavored samples (F1+ and F1++) and for the corresponding unflavored sample (F1), meaning that the added cream flavor did not directly influence the perceived cream aroma intensity but

Table 2 ANOVA results for product and temperature factors and for the product\*temperature interaction (*F* and *P* values)

Descriptor	Source	Product	Temperature	Product*temperature
Perceived temperature	<i>F</i>	0.8	111.7	1.1
	<i>P</i> value	0.5677	<0.001	0.344
Thickness	<i>F</i>	1.0	50.6	0.7
	<i>P</i> value	0.401	<0.001	0.673
Remaining quantity in mouth	<i>F</i>	0.8	24.1	0.7
	<i>P</i> value	0.563	<0.001	0.615
Fattiness	<i>F</i>	17.4	0.0	0.7
	<i>P</i> value	<0.001	0.852	0.683
Greasy film	<i>F</i>	18.1	0.1	1.2
	<i>P</i> value	<0.001	0.722	0.312
Firm	<i>F</i>	4.0	0.6	2.0
	<i>P</i> value	0.001	0.443	0.073
Butter	<i>F</i>	3.0	0.2	0.4
	<i>P</i> value	0.011	0.692	0.846
Cream	<i>F</i>	23.0	0.2	0.7
	<i>P</i> value	<0.001	0.688	0.671
Persistence of aroma	<i>F</i>	10.5	0.4	1.2
	<i>P</i> value	<0.001	0.541	0.328
Sour	<i>F</i>	3.4	0.7	0.8
	<i>P</i> value	0.004	0.417	0.557
Bitter	<i>F</i>	9.9	1.4	0.3
	<i>P</i> value	<0.001	0.255	0.910
Umami	<i>F</i>	4.8	0.4	0.8
	<i>P</i> value	<0.001	0.526	0.568
Astringency	<i>F</i>	13.0	2.9	1.0
	<i>P</i> value	<0.001	0.108	0.445
Persistence of taste	<i>F</i>	4.3	0.0	0.9
	<i>P</i> value	0.001	0.994	0.480

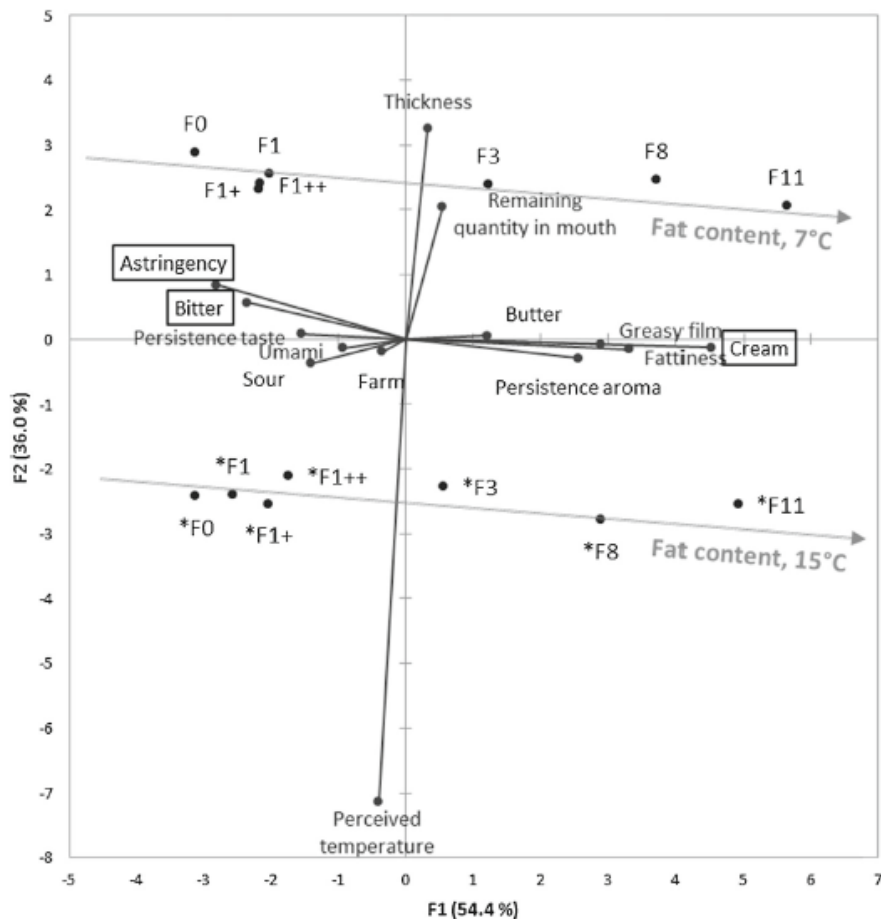
rather enhanced the firm and umami notes. The added cream flavor used was specially designed for this study. It was expected that perceptions of fattiness could be enhanced by such a cream-related aroma, but this effect could not be verified in this study. One reason for this could be that the aroma composition was a rather simple mixture that was not fully appropriate for evoking a typical cream aroma in cottage cheese. Moreover, it should be noted that the profiling technique used here required that the panelists follow a strict analytical approach, which was shown to thoroughly alter cross-modal interactions due to top-down attentional effects (Prescott and Murphy 2009), but also the perception of low-complexity odor mixtures (Le Berre et al. 2008). All of the other descriptors (butter, sourness, and persistence of taste) were significantly influenced by fat content, but differences between the samples could be

**Table 3** Multiple comparisons of means performed on the 14 products (seven cottage cheeses, each tested at two temperatures) and the 14 descriptors using the Student–Newman–Keuls (SNK) method ( $\alpha = 0.05$ )

Products	*F0	F0	*F1	F1	*F1+	F1+	*F1++	F1++	*F3	F3	*F8	F8	*F11	F11
Fat content (%)	0	0	1	1	1	1	1	1	3	3	8	8	11	11
Tasting temperature (°C)	15	7	15	7	15	7	15	7	15	7	15	7	15	7
Cream flavor (%)	–	–	–	–	0.07	0.07	0.13	0.13	–	–	–	–	–	–
Perceived temperature	5.6 <sup>a</sup> (2.1)	1.1 <sup>b</sup> (0.9)	5.4 <sup>a</sup> (1.7)	1.1 <sup>b</sup> (0.9)	5.5 <sup>a</sup> (1.6)	1.3 <sup>b</sup> (1.4)	5.3 <sup>a</sup> (1.6)	1.2 <sup>b</sup> (0.9)	5.1 <sup>a</sup> (1.6)	1.0 <sup>b</sup> (0.8)	5.6 <sup>a</sup> (1.8)	0.8 <sup>b</sup> (0.9)	5.3 <sup>a</sup> (1.6)	1.3 <sup>b</sup> (1.3)
Thickness	4.6 <sup>b</sup> (1.8)	6.8 <sup>a</sup> (1.5)	4.3 <sup>b</sup> (1.9)	6.2 <sup>a</sup> (1.6)	4.1 <sup>b</sup> (1.9)	6.1 <sup>a</sup> (1.5)	4.6 <sup>b</sup> (2.0)	6.1 <sup>a</sup> (1.8)	4.3 <sup>b</sup> (1.9)	6.3 <sup>a</sup> (1.3)	4.4 <sup>b</sup> (1.6)	6.4 <sup>a</sup> (2.0)	4.6 <sup>b</sup> (2.3)	6.7 <sup>a</sup> (1.6)
Remaining quantity in mouth	3.9 <sup>d</sup> (2.3)	5.4 <sup>abc</sup> (2.1)	3.9 <sup>d</sup> (1.9)	5.4 <sup>abc</sup> (2.1)	4.0 <sup>d</sup> (2.4)	5.5 <sup>ab</sup> (2)	4.5 <sup>abcd</sup> (2.6)	5.2 <sup>abc</sup> (2.1)	4.3 <sup>cd</sup> (2)	5.4 <sup>abc</sup> (2.5)	4.4 <sup>abcd</sup> (2.6)	5.7 <sup>a</sup> (2.4)	4.6 <sup>abcd</sup> (2.5)	5.7 <sup>a</sup> (2.4)
Fatness	3.8 <sup>d</sup> (2.2)	3.7 <sup>d</sup> (2.5)	4.0 <sup>d</sup> (2.1)	4.2 <sup>d</sup> (2.3)	4.3 <sup>d</sup> (2.4)	4.2 <sup>d</sup> (2.5)	4.4 <sup>d</sup> (2.3)	4.2 <sup>d</sup> (2.3)	5.2 <sup>c</sup> (1.9)	5.6 <sup>c</sup> (1.5)	6.3 <sup>b</sup> (1.8)	6.5 <sup>b</sup> (1.8)	7.1 <sup>a</sup> (1.9)	7.3 <sup>a</sup> (1.8)
Greasy film	3.3 <sup>d</sup> (2.2)	3.3 <sup>d</sup> (2.3)	3.3 <sup>d</sup> (2.2)	3.8 <sup>cd</sup> (2.3)	3.8 <sup>cd</sup> (2.5)	3.8 <sup>cd</sup> (2.5)	4 <sup>cd</sup> (2.4)	3.5 <sup>d</sup> (2.2)	4.5 <sup>c</sup> (1.8)	4.6 <sup>c</sup> (2.1)	5.6 <sup>b</sup> (1.9)	5.8 <sup>b</sup> (2.3)	6.2 <sup>ab</sup> (2.0)	6.5 <sup>a</sup> (2.1)
Firm	2.3 <sup>bc</sup> (2.1)	1.6 <sup>c</sup> (1.4)	1.6 <sup>c</sup> (1.6)	2.0 <sup>c</sup> (2.2)	3.1 <sup>ab</sup> (2.5)	3 <sup>ab</sup> (2.9)	3.4 <sup>c</sup> (2.8)	3.1 <sup>ab</sup> (2.7)	1.7 <sup>c</sup> (2.0)	1.7 <sup>c</sup> (2.0)	2.3 <sup>bc</sup> (2.3)	1.9 <sup>c</sup> (2.3)	2.1 <sup>c</sup> (2.1)	2.4 <sup>bc</sup> (2.5)
Butter	2.2 <sup>bc</sup> (1.9)	2 <sup>c</sup> (1.8)	2.2 <sup>bc</sup> (1.7)	2.7 <sup>abc</sup> (2.4)	2.8 <sup>abc</sup> (1.7)	2.9 <sup>abc</sup> (2.3)	3.1 <sup>abc</sup> (1.9)	2.8 <sup>abc</sup> (2.6)	2.1 <sup>bc</sup> (1.5)	2.4 <sup>bc</sup> (1.8)	3.2 <sup>abc</sup> (2.1)	3.3 <sup>ab</sup> (2.6)	3.8 <sup>a</sup> (2.1)	3.9 <sup>a</sup> (2.5)
Cream	2.3 <sup>d</sup> (2.2)	2.5 <sup>d</sup> (2.0)	2.5 <sup>d</sup> (2.1)	2.5 <sup>d</sup> (2.3)	2.9 <sup>d</sup> (2.3)	2.5 <sup>d</sup> (2.4)	2.9 <sup>d</sup> (2.7)	2.9 <sup>d</sup> (2.3)	4.2 <sup>c</sup> (2.6)	4.3 <sup>c</sup> (2.3)	5.5 <sup>b</sup> (2.3)	5.9 <sup>b</sup> (2.5)	6.8 <sup>a</sup> (2.3)	7.1 <sup>a</sup> (2.2)
Persistence of aroma	3.1 <sup>d</sup> (2.0)	3.1 <sup>d</sup> (1.8)	3.1 <sup>d</sup> (2.1)	3.3 <sup>d</sup> (2.2)	4.6 <sup>bc</sup> (1.9)	4.2 <sup>c</sup> (2.2)	5.3 <sup>b</sup> (2.0)	4.6 <sup>bc</sup> (2.2)	4.1 <sup>c</sup> (2.0)	4.2 <sup>c</sup> (2.0)	5.3 <sup>b</sup> (2.0)	5.4 <sup>b</sup> (2.4)	6.5 <sup>a</sup> (2.1)	6.5 <sup>a</sup> (2.3)
Sour	4.1 <sup>ab</sup> (2.0)	4.0 <sup>ab</sup> (2.6)	4.4 <sup>a</sup> (2.5)	3.6 <sup>abcd</sup> (2.7)	4.1 <sup>ab</sup> (1.9)	3.6 <sup>abcd</sup> (2.3)	3.9 <sup>abc</sup> (2.4)	3.5 <sup>abcd</sup> (2.6)	3.1 <sup>bcd</sup> (1.9)	2.9 <sup>d</sup> (1.9)	2.9 <sup>cd</sup> (2.4)	2.8 <sup>d</sup> (2.1)	2.6 <sup>d</sup> (2.1)	2.8 <sup>d</sup> (2.4)
Bitter	3.0 <sup>a</sup> (1.9)	3.3 <sup>a</sup> (2.6)	2.1 <sup>bc</sup> (1.6)	2.6 <sup>ab</sup> (2.4)	2.6 <sup>ab</sup> (1.8)	3.0 <sup>a</sup> (2.4)	3.0 <sup>a</sup> (2.1)	3.1 <sup>a</sup> (2.9)	1.6 <sup>cd</sup> (1.4)	1.5 <sup>cd</sup> (1.7)	0.8 <sup>d</sup> (0.9)	1.1 <sup>d</sup> (1.0)	0.7 <sup>d</sup> (1.0)	0.9 <sup>d</sup> (1.3)
Umami	2.2 <sup>bcd</sup> (1.6)	2.5 <sup>abcd</sup> (1.9)	1.7 <sup>d</sup> (1.4)	1.9 <sup>cd</sup> (1.5)	2.8 <sup>abc</sup> (2.3)	2.8 <sup>abc</sup> (2.1)	3.4 <sup>c</sup> (2.1)	3.0 <sup>ab</sup> (2.2)	1.9 <sup>cd</sup> (1.8)	1.5 <sup>d</sup> (1.4)	1.6 <sup>d</sup> (1.7)	1.5 <sup>d</sup> (1.3)	2.1 <sup>bcd</sup> (1.8)	1.6 <sup>d</sup> (1.6)
Astringent	3.2 <sup>ab</sup> (2.2)	4 <sup>ab</sup> (3.0)	3.0 <sup>b</sup> (2.7)	3.7 <sup>ab</sup> (2.4)	3.5 <sup>ab</sup> (2.4)	3.8 <sup>ab</sup> (2.6)	3.4 <sup>ab</sup> (2.7)	4.1 <sup>a</sup> (2.7)	1.8 <sup>cd</sup> (1.9)	2.1 <sup>c</sup> (1.9)	1.6 <sup>cd</sup> (1.9)	1.7 <sup>cd</sup> (1.5)	1.0 <sup>d</sup> (1.0)	1.0 <sup>d</sup> (1.0)
Persistence of taste	4.2 <sup>ab</sup> (2.1)	4.8 <sup>a</sup> (2.5)	4.3 <sup>ab</sup> (2.3)	4.2 <sup>ab</sup> (2.2)	4.9 <sup>a</sup> (2.3)	4.9 <sup>a</sup> (2.3)	5.0 <sup>a</sup> (2.4)	5.1 <sup>a</sup> (2.5)	3.2 <sup>b</sup> (2.0)	3.4 <sup>b</sup> (2.1)	3.7 <sup>b</sup> (2.3)	3.4 <sup>b</sup> (2.4)	3.6 <sup>b</sup> (2.3)	3.1 <sup>b</sup> (2.6)

Values with different letters within a row are significantly different at the 5% level (Student–Newman–Keuls test). The products marked (\*) were evaluated at 15 °C. For information: standard deviations in parentheses

clearly identified only when comparing the high-fat and low-fat samples. Samples with a fat content of 8% and above were more intense in butter aroma than the unflavored samples containing 3% or less fat. The intensity scores of the flavored samples fell between the scores of these two groups, meaning that the added cream flavor contributed to the butter note. For the sourness and persistence of taste descriptors, there was a gap between samples with a fat content of 1% or less and samples with 3% or more: the high-fat samples were perceived as less sour. This finding is consistent with the lactic acid content of the samples (12.8, 12.6, 11.9, 10.5, and 9.9 g of lactic acid per liter, respectively, for F0, F1, F3, F8, and F11) and with the fact that titratable acidity partly explains sour taste intensity (Da Conceicao Neta et al. 2007). This lower sourness may explain the lower persistence of taste. It should be noted that the thickness of the different cottage cheese samples was not influenced by fat content; therefore, for this type of product, thickness did not appear to be involved in the discrimination among samples varying in fat content.



The products marked (\*) were evaluated at 15°C. The words in the boxes are the main descriptors associated with fat content (multiple linear regression).

Figure 1 Biplot representation from the PCA performed on the covariance matrix. The 14 products (seven cottage cheeses, each tested at two temperatures) and the 14 descriptors

The results of the PCA (Fig. 1) highlight that cream aroma, astringency, and bitterness contribute to the first axis, along which the cottage cheese samples are distributed according to their fat content. These findings are also supported by the results of a multiple linear regression, which shows that these three descriptors were the ones primarily associated with fat content. Cream aroma was positively related to fat content, whereas astringency and bitterness were negatively related to fat content (fat content =  $2.5 + 0.7 \cdot \text{cream} - 0.4 \cdot \text{bitter} - 0.3 \cdot \text{astringent}$ ;  $R^2 = 0.45$ ; ANOVA of the model,  $p < 0.0001$ ). Regardless of the added flavor, the results show that the perceived cream aroma (naturally occurring in commercial cottage cheeses, not due to the added flavor) is part of the main set of descriptors associated with fat content, thus, strongly suggesting the actual contribution of olfactory cues to overall perceptions of fat. Bitterness and astringency are also some of the main descriptors associated with fat content. A masking effect might partly explain the decrease in the intensity of these two descriptors with an increase in fat content (Metclaf and Vickers 2002). It would therefore be interesting to investigate the possibility of an enhancement of the cream aroma combined with a reduction of bitterness and astringency as a way to maintain the perception of fat while reducing fat content. Nevertheless, this is not an easy task because effective strategies for decreasing the perception of bitterness and astringency in food products are limited (Keast 2008).

The comparison of the sensory profiles obtained at the two tasting temperatures (7 and 15 °C) provides valuable information about how this type of dairy product can be perceived in different contexts (straight from the refrigerator or several tens of minutes after being removed, as in a cafeteria). Only three out of 14 descriptors varied significantly with tasting temperature. As expected, there was a highly significant difference between the perceived temperature of the samples evaluated at 7 and 15 °C. This 8 °C difference led to a difference of more than four points on the scale (5.4/10 on average for samples served at 15 °C versus 1.1/10 on average for samples served at 7 °C,  $t = 22.4$ ,  $P < 0.0001$ ). The samples evaluated at 7 °C were perceived to be thicker and as leaving a larger residual quantity of product in the mouth after swallowing. This can be explained by the higher viscosity of cottage cheese at the lower temperature. These three descriptors strongly contribute to the second axis of the PCA performed on the full set of results (Fig. 1) and, therefore, to the separation between the samples evaluated at 7 and 15 °C (marked on Fig. 1 by \*). Given the significant variation of the tasting temperatures, one might have expected differences in terms of aroma due to effects on the volatility of some chemical compounds. An additional predicted effect could be that with the temperature-induced decrease in thickness, these compounds would be more readily released from the matrix (Gierczynski et al. 2011). Moreover, the lower viscosity paired with a higher temperature might facilitate the taste compounds entering the saliva and hence reaching the taste buds (Engelen et al. 2003). However, the results of this work showed that this was not the case for cottage cheese because the perception of olfactory descriptors (cream, butter, and farm aromas) was not different between the two temperatures. The persistence of aroma was also unaffected by the tasting temperature. Similarly, the intensity of sour, bitter, and umami taste, and even astringency, did not vary significantly between the two tasting temperatures (Table 2). However, Engelen et al. (2003) showed that after a mouth rinse with water at 10, 35, and 55 °C, the oral temperature gradually changed back to baseline (35 °C) after approximately 2 min. It can therefore be assumed that, once in the mouth, cottage cheese warmed rapidly to reach the temperature of the mouth. This could have reduced the expected temperature effect, especially

as taste and aroma descriptors were systematically evaluated at the end of the sample evaluation, namely, after the texture attributes. In contrast, perceived thickness, which was evaluated first, was strongly influenced by tasting temperature. On average, the viscosity values (Pa.s) at 7 °C were 37% higher than the viscosity values obtained at 15 °C.

## 4 Conclusion

The primary outcome of this study is a full description of the sensory characteristics related to fat content in cottage cheese. The results show that the perceived differences among cottage cheeses varying in fat content were based on a range of differences related to aroma (mainly cream aroma), taste (mainly bitterness), trigeminal sensation (astringency), and texture (greasy film). The secondary outcome relates to the modulation of the sensory characteristics of cottage cheese as a function of tasting temperatures. The results show that the tasting temperature did not impact taste, aroma, or astringency. However, thickness was strongly modified by the tasting temperature, regardless of the fat content of cottage cheeses. These results could be useful in better understanding fat perception in real, semi-solid food products and in pursuing the goal of formulating reduced-fat semi-solid dairy products.

**Acknowledgments** The authors thank Betty Hoffarth for her technical assistance during the sessions with the subjects. Firmenich S.A. is thanked for providing the cream flavor. This work was supported by grants from the Regional Council of Burgundy, the FEDER (European Regional Development Fund), and the Camot Institute Qualiment®. RS thanks the Giract Organization PhD Flavor Research Programme for a first-year Bursary Award.

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Statements of compliance with ethical requirements** The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee ("Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Bourgogne"), ID RCB 2013-A01378-37.

## References

- Da Conceicao Neta ER, Johanningsmeier SD, McFeeters RF (2007) The chemistry and physiology of sour taste—a review. *J Food Sci* 72:33–38
- Engelen L, de Wijk RA, Prinz JF, Janssen AM, Weenen H, Bosman F (2003) The effect of oral and product temperature on the perception of flavor and texture attributes of semi-solids. *Appetite* 41:273–281
- Gabriel KR (1971) The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* 58:453–467
- Gierczynski I, Guichard E, Laboure H (2011) Aroma perception in dairy products: the roles of texture, aroma release and consumer physiology. A review. *Flavour Fragr J* 26:141–152
- ISO (International Organization for Standardization) (1985) ISO 6564 sensory analysis, methodology, flavour profile methods. ISO, Geneva.

- ISO (International Organization for Standardization) (2008) ISO 5492 sensory analysis, vocabulary. ISO, Geneva.
- ISO (International Organization for Standardization) (2012) ISO 11132 sensory analysis, guidelines for monitoring the performance of a quantitative sensory panel. ISO, Geneva.
- ISO/TS 11869 (IDF/RM 150) (2012) Fermented milks—determination of titratable acidity—potentiometric method. ISO, Geneva.
- Keast RSJ (2008) Modification of the bitterness of caffeine. *Food Qual Prefer* 19:465–472
- Le Berre E, Thomas-Danguin T, Béno N, Coureaud G, Etiévant P, Prescott J (2008) Perceptual processing strategy and exposure influence the perception of odor mixtures. *Chem Senses* 33:193–199
- Le Calvé B, Saint-Léger C, Babas R, Gelin J-L, Parker A, Emi P, Cayeux I (2015) Fat perception: how sensitive are we? *J Texture Stud* 46:200–211
- Mattes RD (2009) Is there a fatty acid taste? *Annu Rev Nutr* 29:305–327
- Mela DJ (1988) Sensory assessment of fat content in fluid dairy products. *Appetite* 10:37–44
- Metclaf KL, Vickers ZM (2002) Taste intensities of oil-in-water emulsions with varying fat content. *J Sens Stud* 17:379–390
- Prescott J, Murphy S (2009) Inhibition of evaluative and perceptual odour-taste learning by attention to the stimulus elements. *Q J Exp Psychol* 62:2133–2140
- Schlich P (1997) CAP : une méthode et un outil de contrôle rapide et synthétique des performances des sujets en évaluation sensorielle descriptive. Paper presented at Versailles, 3–5 december 1997.
- Schoumacker R, Martin C, Thomas-Danguin T, Guichard E, Le Quéré J-L, Labouré H (2016) Fat perception in cottage cheese: the contribution of aroma and tasting temperature. *Food Qual Prefer*, in press doi: 10.1016/j.foodqual.2016.04.00. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329316300751>).
- Thomas-Danguin T, Rouby C, Sicard G, Vigouroux M, Farget V, Johansson A, et al. (2003) Development of the ETOC: a European test of olfactory capabilities. *Rhinology* 41:142–151

Le profil sensoriel effectué nous a apporté deux informations essentielles concernant les conséquences d'une réduction de la matière grasse dans un fromage blanc : tous les sens sont affectés par cette diminution de gras, ce qui confirme les résultats de la littérature, et les descripteurs « film de gras » et « gras » sont très corrélés ce qui nous permet de supposer que les sujets évaluent le caractère gras du fromage blanc par la quantification du film gras que la consommation du produit laisserait en bouche. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la quantité de produit résiduel en bouche après consommation de fromage blanc à différentes teneurs en matière grasse.

## 5.2. Quantification du film de gras

Les mesures de viscosité et de tribologie ont mis en évidence des différences entre les produits. En effet, l'augmentation du taux de matière grasse a induit une augmentation de la viscosité des produits à 15°C et une diminution des frottements. Partant de ce constat, nous pouvons supposer que les fromages blancs les plus gras sont davantage retenus dans la bouche après déglutition, laissant un film résiduel en bouche plus important. Si tel est le cas, les sujets pourraient évaluer le gras en fonction du tapissage en bouche. Par ailleurs, une quantité de lipides résiduels plus importante pourrait être perçue par les papilles gustatives. Ainsi, l'objectif de cette partie a été de mesurer la quantité résiduelle de produit et de lipides après déglutition afin d'estimer le tapissage en bouche lié à chacun des produits.

### 5.2.1. Matériels et Méthodes

#### a. Tapissage en bouche et lipides résiduels

Le tapissage en bouche, défini comme la quantité de produit restant dans la cavité buccale après déglutition, se distingue de la matière grasse adhérente représentée par les lipides résiduels. Le tapissage en bouche et les lipides résiduels associés ont été évalués après consommation de fromages blancs à 0%, 3,2% et 7,8% de matière grasse servis à 7°C. Ces mesures ont été répétées trois fois pour chaque sujet et chaque produit.

Pour déterminer la quantité d'aliment résiduel en bouche, les sujets devaient consommer 20g de produit de la façon la plus naturelle possible. Après la dernière déglutition, ils se rinçaient la bouche avec 10 mL d'eau à 50°C avant de cracher l'eau de rinçage dans un flacon préalablement pesé. A 50°C l'eau permet un meilleur rinçage des lipides dans la bouche qu'à température ambiante. Cette



opération de rinçage a été répétée une seconde fois et l'ensemble des eaux de rinçage a été récupérée dans le même flacon. Les échantillons ont été congelés puis lyophilisés. La lyophilisation consiste à éliminer progressivement l'eau du produit préalablement congelé par sublimation c'est-à-dire passage de l'état solide à l'état gazeux sans passer par la phase liquide. La lyophilisation se fait sous vide. La différence de masse entre le flacon contenant le produit lyophilisé et le flacon vide détermine la quantité de matière sèche restant en bouche que nous avons considérée comme une mesure du tapissage en bouche.

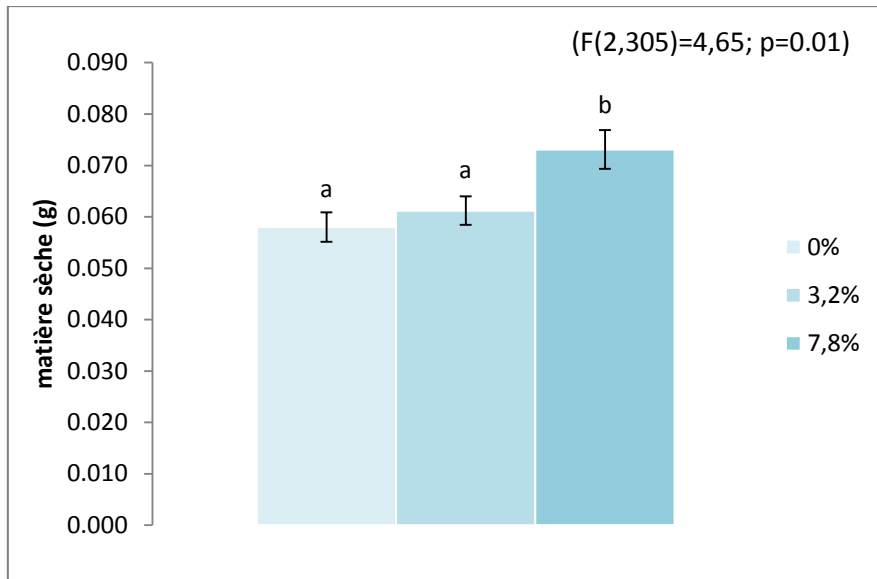
L'extraction des lipides a été effectuée sur ce lyophilisat au moyen de 5 mL d'un mélange chloroforme méthanol (2 :1) en suivant la méthode de Folch (Folch et al., 1957). La centrifugation du mélange conduit à la formation de deux phases : la phase supérieure contenant le méthanol et les protéines, et la phase inférieure avec le chloroforme et les lipides. C'est donc la phase inférieure qui a été récupérée dans un pilulier en verre (préalablement pesé) et le chloroforme évaporé sous azote. La différence entre la masse du pilulier après évaporation du chloroforme et celle du même pilulier vide, permet de déterminer la masse de lipide restant en bouche après consommation de 20 g de fromage blanc.

#### **b. Sujets**

Les 40 sujets recrutés initialement ont participé à cette étude (Partie 1, chapitre 2).

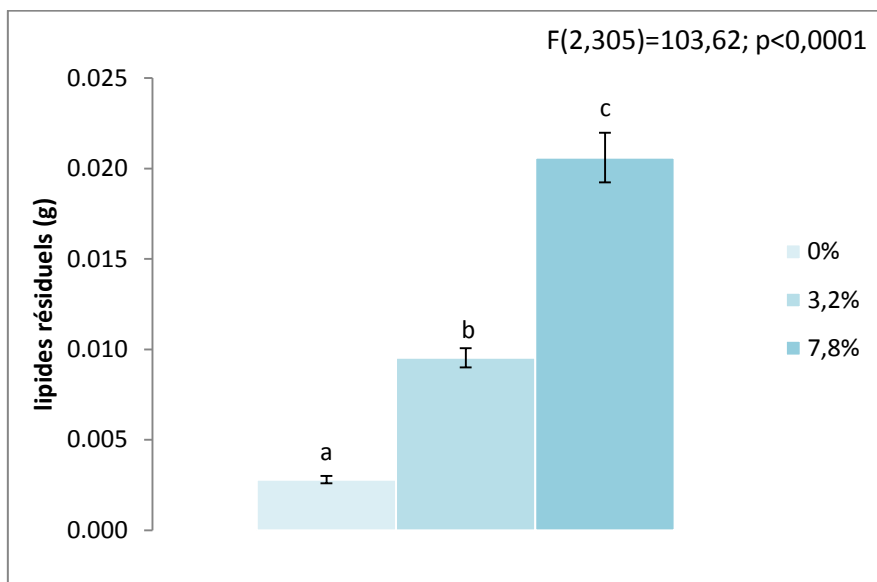
#### **5.2.2. Résultats et discussions**

Les résultats montrent que le tapissage est significativement plus important pour le fromage blanc à 7,8% de matière grasse que pour les deux autres produits (Figure 25).



**Figure 25 : Tapissage dans la cavité buccale après ingestion de 20g de fromage blanc à 0%, 3,2% et 7,8% de matière grasse ± SEM. ANOVA Matière sèche = % matière grasse + répétition complétée par un test de comparaison des moyennes SNK. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).**

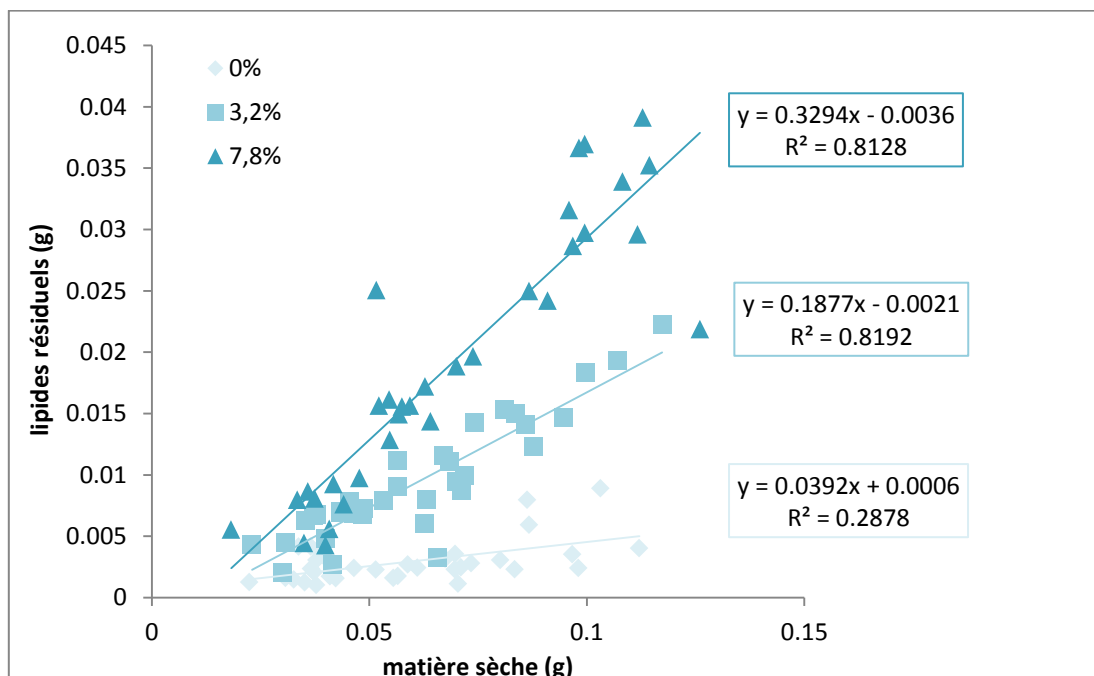
La quantité de lipides dans cette matière sèche résiduelle est d'autant plus grande que la teneur en matière grasse du produit est élevée (Figure 26). Les trois produits sont significativement différents les uns des autres.



**Figure 26 : Lipides résiduels associés au tapissage dans la cavité buccale après ingestion de 20g de fromage blanc à 0%, 3,2% et 7,8% de matière grasse ± SEM. ANOVA Lipides résiduels = % matière grasse + répétition complétée par un test de comparaison des moyennes SNK. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).**

La part de lipides dans le tapissage global augmente avec l'augmentation de la teneur en matière grasse du fromage blanc. En effet, le tapissage global des FB à 0%, 3,2% et 7,8% est constitué respectivement de 5%, 16% et 28% de lipides. Pour le fromage blanc à 0% de matière grasse, la matière sèche restante dans la cavité buccale des sujets est composée d'une infime part de lipides, et ce, malgré un niveau de matière sèche similaire au FB à 3,2% de matière grasse (Figures 25). Ainsi, la composition de la matière sèche restante dans la cavité buccale est fonction du produit consommé. Plus le produit consommé contient de la matière grasse, plus la quantité restante en bouche est importante et plus la teneur en lipides de cette quantité résiduelle est importante.

En regardant les résultats au niveau de chacun des sujets (Figure 27), nous observons pour les fromages blancs à 3,2% et 7,8% de matière grasse une relation linéaire entre la quantité de matière sèche restante en bouche et la quantité de lipides. Donc plus les sujets ont un tapissage en bouche important et plus la quantité de lipides résiduels est élevée. La pente est d'autant plus importante que la quantité de matière grasse dans le FB consommé est élevée donc plus le FB contient de matière grasse et plus la part de lipides dans le tapissage est importante. Pour le fromage blanc à 0% de matière grasse, la pente est presque nulle. Les sujets tapissant davantage n'ont donc pas plus de lipides résiduels que les autres ce qui est normal puisque la matrice ne contient pas (ou peu) de lipides.



**Figure 27 : Corrélations entre la matière sèche et les lipides résiduels en bouche pour  $\blacklozenge$  le FB à 0% de MG,  $\blacksquare$  le FB à 3,2% de MG et  $\blacktriangle$  le FB à 7,8% de MG. Chaque point représente un sujet consommant l'un ou l'autre des FB.**

Malgré une méthodologie de mesure du tapissage différente, ces résultats sont en accord avec ceux de Poette, 2012 (thèse) qui a mis en évidence, une épaisseur du tapissage plus importante lors de la consommation de produits à 53% de matière grasse que pour les produits allégés.

Nous avons vu au travers du profil sensoriel l'augmentation du descripteur « film de gras » avec l'augmentation du taux de matière grasse. Nous avons alors émis l'hypothèse que les sujets évaluent le caractère gras des fromages blancs d'après le film de gras laissé en bouche après consommation du produit. Le test de comparaison de moyenne effectué sur les notes attribuées par les juges experts du profil sensoriel au descripteur « film de gras » a révélé une augmentation significative entre les FB à 0% et 3% de matière grasse. Etant donné que le tapissage global dans la cavité buccale est identique entre ces produits (Figure 25), nous pouvons conclure que ce descripteur film de gras correspond bien à la quantité de lipides résiduels et non à la quantité de produit restant en bouche.

Partant du principe que les sujets prennent en considération le film de gras issu du tapissage dans l'évaluation sensorielle du gras, nous souhaitons rechercher l'origine des variations de tapissage en bouche. Les mesures de tribologie ont montré une chute brutale du coefficient de friction uniquement entre les fromages blancs à 0% et 1% de matière grasse. La quantité de matière sèche restante en bouche n'a pas été significativement différente entre les produits à 0% et 3% de matière grasse. Ainsi, ce paramètre de tribologie pourrait expliquer la quantité de lipides résiduels restants en bouche après déglutition en fonction du taux de matière grasse mais il n'explique pas la matière sèche. Les mesures de viscosité à 7°C n'ont pas été différentes entre les produits (Figure 20). Cependant, si la température du produit augmente dès la mise en bouche, les résultats de viscosité à 15°C sont à prendre en considération. En effet, à 15°C, la viscosité augmente avec la teneur en matière grasse (Figure 21) et cette différence devient significative dès le FB à 3% de matière grasse. Ainsi, la diminution du frottement en bouche et l'augmentation de la viscosité des produits au cours de la consommation de fromages blancs plus gras peuvent expliquer l'augmentation du tapissage dans la cavité buccale.

Les résultats du profil sensoriel ont montré que l'épaisseur perçue a été systématiquement plus élevée pour les produits servis à 7°C que pour ceux servis à 15°C. L'évaluation de l'épaisseur a été réalisée de la façon suivante : « L'épaisseur est évaluée dès la mise en bouche, en consommant une cuillère pleine de produit, et en écrasant le produit avec la langue sur le palais. Ceci permet d'évaluer la force de pression nécessaire pour écraser le produit : plus la pression à exercer sera importante, plus la note sera haute ». Ce résultat laisse supposer qu'au moment de la mise en bouche, les produits servis à 7°C sont plus épais que ceux servis à 15°C. Il est donc probable que les sujets

associent les produits « froids » à des produits plus épais que les produits plus tempérés. Un autre élément qui aurait été intéressant d'étudier est la tribologie à 7°C. D'après la définition de l'épaisseur, les sujets pourraient l'évaluer en se basant en partie sur les frottements.

Concernant les notes aromatiques, les résultats du profil sensoriel ont mis en évidence l'augmentation de l'intensité de la note « crème » avec l'augmentation du taux de matière grasse. Nous avons donc émis l'hypothèse que le fromage blanc à 7,8% de matière grasse contient d'avantage et/ou libère plus les composés d'arôme en lien avec ce descripteur. Les résultats de composition des fromages blancs à 0% et 7,8% de matière grasse ont montré que les produits gras sont composés d'une quantité plus importante de molécules appartenant à l'univers gras. Par ailleurs, nous avons observé *in vitro* avec cette matrice grasse une plus importante libération d'une molécule représentative de l'univers gras : la 2,3-pentanedione mais une libération moins importante de deux autres molécules de l'univers gras : le diacétyl et l'acétoïne. Cependant nous avons montré au travers de l'état de l'art, que la libération *in vitro* n'est pas toujours représentative de la libération *in vivo*. Pour vérifier cette hypothèse, et plus particulièrement l'implication du process en bouche, il aurait été intéressant de comparer la libération *in vivo* des deux matrices.

### 5.3. Conclusion

Le profil sensoriel a permis d'obtenir une description complète des caractéristiques sensorielles liées à la teneur en matière grasse dans la matrice fromage blanc. Les résultats de cette étude ont confirmé le caractère multimodal de la perception du gras (Mattes, 2009) qui fait intervenir l'olfaction (principalement l'arôme crème qui augmente avec la teneur en matière grasse), la gustation (surtout l'amertume qui diminue avec l'augmentation de la teneur en matière grasse), les sensations trigéminales (astringence qui diminue avec l'augmentation de la teneur en matière grasse) et la texture (film de gras qui augmente avec la teneur en matière grasse). La perception du « film de gras », très fortement corrélé au descripteur « gras », peut s'expliquer par l'augmentation des lipides résiduels dans la cavité buccale avec l'élévation de la teneur en matière grasse du FB.

Par ailleurs, le profil a également permis de mettre en évidence le rôle de la température de service sur les caractéristiques sensorielles des produits. Les résultats ont montré que la température de service n'a pas d'incidence sur les saveurs, les arômes et l'astringence. Par contre, la perception de l'épaisseur et de la quantité restant en bouche diminuent quand la température augmente.

L'ajout de l'arôme « crème » formulé par Firmenich n'a pas influencé la perception de l'arôme crème mais il a augmenté l'intensité des descripteurs « fermier » et « umami ». L'arôme formulé aurait donc plutôt une note fermier et umami qu'une note crème. Ceci peut venir des contraintes que nous avons imposées à l'aromaticien. En effet, il lui a été demandé de formuler un arôme « crème » simple contenant le moins de molécules possibles et si possible les molécules d'intérêts du projet. Il semble que ces contraintes n'aient pas permis de formuler un arôme évoquant le gras dans les FB. Par contre, nous avons vu que dans le fromage blanc, l'augmentation de la teneur en matière grasse augmentait la perception de l'arôme crème. Ce descripteur a probablement été associé à la composition plus importante des arômes à connotation grasse dans la matrice à 7,8% de matière grasse.

Maintenant que nous avons confirmé que la diminution de la teneur en matière grasse dans les fromages blancs affecte tous les sens, nous allons chercher à savoir si ces différences sensorielles sont utilisées par les consommateurs avec la même sensibilité pour discriminer la sensation de gras induite par la consommation de fromages blancs à différentes teneurs en matière grasse.

## 6. Percevons-nous tous le gras de façon similaire ? (article 2)

La plupart des études qui s'intéressent à la perception du gras montrent des résultats moyennés sur l'ensemble du panel. Cependant, une grande variabilité interindividuelle a été observée (Stewart, 2010) bien que son origine soit mal connue (Running, 2013). Par ailleurs, la perception du gras fait intervenir plusieurs modalités sensorielles (Mattes, 2009). Dans ce contexte, une des hypothèses serait que certains individus évalueraient le gras en se basant sur une des dimensions sensorielles (la texture, l'olfaction ou le goût), alors que d'autres en utiliseraient plusieurs. Ainsi, certains pourraient détecter facilement la matière grasse dans les aliments alors que d'autres éprouveraient des difficultés à effectuer cette tâche.

L'objectif principal de cette partie a été de déterminer le seuil de détection et le seuil différentiel de perception de la matière grasse dans la matrice fromage blanc pour évaluer la variabilité interindividuelle. Habituellement, les seuils de sensibilités au gras sont effectués sur seulement quelques sujets. Dans notre étude, nous avons décidé de travailler sur un nombre plus important de sujets (40 personnes) de manière à augmenter la fiabilité des résultats. Un deuxième objectif a été d'étudier la contribution de l'olfaction et de la température de service sur ces seuils de perception. Comme lors du profil sensoriel, les températures (7 et 15°C) ont été sélectionnées dans le but de reproduire les conditions réelles de consommation. En effet, le fromage blanc peut être consommé à

la sortie du réfrigérateur (7°C) ou dans les conditions de la cafétéria dans lesquelles le fromage blanc reste un certain temps à température ambiante avant consommation. Il est alors consommé aux environs de 15°C.

**Résumé de la publication :**

Pour formuler de nouveaux produits alimentaires répondant aux impératifs du PNNS il est important de connaître les changements possibles à apporter dans les produits sans modification de la perception des consommateurs. Dans ce contexte, les aliments à teneur réduite en matière grasse doivent posséder les mêmes qualités organoleptiques que les produits plus gras.

Afin d'approfondir les connaissances sur la perception du gras dans une matrice laitière, cette étude a pour objectif d'étudier l'impact de la température de service et de l'olfaction sur les capacités à détecter et à discriminer différents niveaux de matière grasse dans le fromage blanc.

Pour cela, les seuils de détection et différentiel de 40 sujets ont été évalués sous 4 conditions : avec et sans pince-nez et à 7 et 15°C. Les seuils ont été déterminés en réalisant une série de tests 2-AFC (Two Alternative Forced Choice). Les seuils individuels ont été calculés via la méthode BET (Best Estimate Threshold).

Les résultats montrent des seuils plus bas (donc une meilleure sensibilité au gras) sans pince-nez et à 15°C, confirmant ainsi le rôle de l'olfaction et de la température sur la perception du gras. Une classification hiérarchique ascendante réalisée sur l'ensemble des seuils a permis de proposer une répartition des sujets en trois groupes: 9 sujets peu sensibles (S-), 24 sujets moyennement sensibles (S0) et 7 sujets sensibles au gras (S+). En s'intéressant à chaque groupe de sensibilité, nous avons montré que les sujets peu sensibles au gras ne percevaient pas le gras et ce, quelle que soit la condition étudiée (température de service à 7°C ou 15°C, avec ou sans pince-nez). Au contraire, les sujets sensibles au gras ont été sensibles dans toutes les conditions. Ce sont donc les sujets moyennement sensibles au gras qui ont été moins performants quand les produits étaient servis à 7°C et quand ils portaient un pince-nez.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Quality and Preference

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodqual](http://www.elsevier.com/locate/foodqual)

## Fat perception in cottage cheese: The contribution of aroma and tasting temperature

R. Schoumacker<sup>a,1</sup>, C. Martin<sup>a,1</sup>, T. Thomas-Danguin<sup>a</sup>, E. Guichard<sup>a</sup>, J.L. Le Quééré<sup>a</sup>, H. Labouré<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

<sup>b</sup> AgroSupDijon, 21000 Dijon, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 September 2015

Received in revised form 1 April 2016

Accepted 6 April 2016

Available online xxxxx

#### Keywords:

Fat perception

Detection threshold

Discrimination threshold

Aroma

Temperature

Cottage cheese

### ABSTRACT

The aim of this work was to examine the influence of aroma and tasting temperature, on the detection of and difference sensitivity for fat content in cottage cheese. The detection (DetT) and difference (DiffT) thresholds were determined in 4 different conditions defined by a combination of two factors, each involving two variables: a nose clip (with or without) and the tasting temperature (7 °C or 15 °C). Forty non-trained panelists participated in this study. Thresholds were determined using two-alternative forced-choice (2-AFC) tests in ascending concentration series. Individual thresholds were calculated using the Best Estimate Threshold (BET) method.

An increase in tasting temperature induced a decrease in the DetT and DiffT, while the use of a nose clip led to an increase in both thresholds. A hierarchical cluster analysis evidenced three homogeneous subsets of subjects with contrasting sensitivity profiles: subsets 1 (n = 7) and 2 (n = 9) were characterized by high and low DetT and DiffT values, respectively, for all conditions, while a larger third subset (n = 24) included subjects with medium thresholds values that varied from one condition to another. Unlike the other subsets, subset 3 was significantly influenced by the change in tasting temperature, whereas only subset 1 showed no sensitivity improvement when aromas were perceptible.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In food product design, it is important to know to what extent product composition can be modified without being noticed by consumers. This is of critical importance in the formulation of reduced-fat products with sensory properties that match those of their full-fat counterparts. Indeed, it is still a major challenge for the food industry to design low-fat foods that are liked and therefore, can contribute to the reduced consumption of saturated fat and the associated risk of chronic diseases, such as obesity, metabolic syndrome and diabetes. In this respect, knowledges on the detection and difference thresholds for fat can provide a useful decision basis for food manufacturers. Mela and Christensen (1987) in a study using a dry, cornmeal-based snack food, showed that substantial differences in fat content (approximately 15% w/w) were necessary for subjects to discriminate between two samples. In contrast, when subjects had to discriminate between the fat content of skim and whole milk, the difference threshold ranged from

1.4% to 2.1% (Schiffman, Graham, Sattely-Miller, & Warwick, 1998). These results support the idea that discrimination thresholds for fat content are highly dependent on the food product and thus hardly predictable.

Dietary fat is a multimodal stimulus, which involves in-mouth tactile sensations, olfactory, taste and somatosensory cues (Mattes, 2009). Among the sensory modalities usable to discriminate samples varying in fat content, textural cues seem to be predominant (Drewnowski, 1993; Mattes, 2009). Indeed, the impact of fat on the perceived thickness of dairy products (Mela, 1988) and on other textural sensations, such as viscosity within the oral cavity, has been demonstrated. Nevertheless, Le Calve et al. (2015) revisited these findings in assessing the sensory modalities entailed in the discrimination between products varying in fat content. They showed that texture but also taste, olfaction and vision were involved in fat perception but that the most efficient sensory dimension was dependent on the food product, which confirmed the multimodal perception of fat in food, but also challenged the dominance of textural cues.

Aromas have sometimes been reported to influence fat perception, albeit to various extents. The addition of various flavoring agents was found to impact fat-related sensory attributes (fattiness and creaminess) in vanilla custards (de Wijk, Rasing, & Wilkinson,

\* Corresponding author at: AgroSupDijon, 21000 Dijon, France.

E-mail address: [hele.nelabour@agrosupdijon.fr](mailto:hele.nelabour@agrosupdijon.fr) (H. Labouré).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the work.



2003). In another study, low-fat stirred yogurts flavored with coconut and butter notes were perceived as thicker than products flavored with green-apple and almond notes (Saint-Eve, Paçi Kora, & Martin, 2004). Moreover, the addition of fat-related flavor was found to enhance the perception of fat-related attributes in various foodstuffs (Syarifuddin, Septier, Salles, & Thomas-Danguin, 2016). Interestingly, aromas have also been reported to modulate fat level discrimination, depending on the product type (Le Calve et al., 2015). Nevertheless, it has not been clearly established whether aroma positively contributes to the detection of fat in food or to the discrimination of varying fat content in real food systems.

Since fat perception is mediated in part by food matrix structural properties and therefore texture variations, one can expect that temperature could impact fat perception. However, to the best of our knowledge, the effect of food temperature on fat perception thresholds has never been studied yet. Some studies have focused on serving temperature and its impact on fat perception, but their results are inconsistent. Mela, Langley, and Martin (1994) showed no effect of solution temperature on the perceived fat content of oil-in-water emulsions, whereas Engelen et al. (2003) showed an enhanced creamy mouthfeel and a greater fattiness after-feel at higher custard dessert temperatures.

The present study investigated the influence of product-related factors (aroma and tasting temperature) that might affect fat content perception, in terms of detection or discrimination, in a real food product, i.e. cottage cheese. Firstly, we examined the role of aroma (with vs. without a nose clip during tasting) on the detection (DetT) and difference (DiffT) thresholds for fat in cottage cheese. Secondly, we assessed the influence of tasting temperature on these thresholds. Two temperatures (7 °C and 15 °C) were selected to mimic real consumption situations. Indeed, cottage cheese can be consumed just out of the refrigerator (at approximately 7 °C) or in cafeteria conditions, wherein cottage cheese sits for several minutes at room temperature before consumption and thus warms to approximately 15 °C.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Forty subjects (18 women and 22 men) aged 25–76 years (average 55 years) with BMIs between 18.1 and 36.7 (average 24.2) participated in this study. The protocol was approved by the local ethical committee (Comité de Protection des Personnes Est I, Bourgogne). Panelists signed an informed consent form before participation and received compensation for their participation.

### 2.2. Products

Commercial cottage cheeses containing 0% and 7.8% fat (Paturage, Intermarché, France) were used to prepare cottage cheese mixtures containing the following percentages of fat: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 7.8. Commercial cottage cheese containing 7.8% fat and double cream containing 30% fat (Paturage, Intermarché, France) were used to formulate samples containing 9%, 10% and 11% fat. To reduce viscosity differences across samples, the cottage cheese samples were whisked for 1 min (0–3% fat) or 2 min (4–11% fat). Viscosity measurements were conducted and showed that viscosity did not differ among products at 7 °C, but they significantly increased with increasing fat content at 15 °C (Fig. 1). Samples were prepared at least 3 h before tasting and stored at 4 °C or 14 °C respectively for serving temperature at 7 °C or 15 °C. All samples were served in coded disposable plastic cups with lids (containing 20 g of cottage cheese per cup). Temperature was

checked for each sample-set in each session. A tolerance of  $\pm 1$  °C was accepted.

### 2.3. Experimental conditions

All sessions took place in an air-conditioned ( $21 \pm 2$  °C) sensory testing room of the Chemosens platform (INRA Dijon) using standardized, individual, white, partitioned booths equipped with computers. All tests were conducted under artificial red light to hide possible appearance differences among samples. Data acquisition was performed using FIZZ software (Biosystemes, Couternon, France). Subjects came to the laboratory once per week at 12 a. m., 3 p.m. or 5 p.m. and were asked to not eat or drink anything except water, not smoke, and not brush their teeth for one hour prior to tasting.

### 2.4. Procedure

The detection (DetT) and difference (DiffT) thresholds were determined in 4 different conditions defined by combinations of two factors, each involving two variables: a nose clip (presence or absence) and the serving temperature (7 °C or 15 °C). These 8 measurements were achieved in separate sessions. Subjects completed one or two series of eight tests (two replicates) in each session. A 10-min break was imposed between the two series.

Thresholds were determined using a modified forced-choice ascending concentration series method of limits, as described in ASTM E 679-04 (2004). The modification consisted of using two-alternative forced choice (2-AFC) instead of 3-AFC, with the advantage of limiting subjects' saturation despite a lower statistical power.

For each threshold determination, 8 two-sample sets were successively presented to the subjects. Each two-sample set consisted of one reference sample (0% and 3% fat for DetT and DiffT, respectively) and one test sample containing between 1% and 8% more fat than the reference sample. For each pair of samples, subjects were asked to indicate which of the two samples contained more fat (forced choice). Following a 2-min break and having cleansed their mouth with water and crackers, the subjects were presented with another two-sample set (ascending fat concentration).

Individual's thresholds were calculated using the Best Estimate Threshold (BET) method (ASTM, 2004) and expressed as a percentage (fat content difference between the reference and test samples). For each panelist, the results were coded as 0 for an incorrect choice and 1 for a correct choice. The best-estimated threshold for each subject is the arithmetic mean of the concentration at which the last miss (0) occurred. The group threshold was obtained as the arithmetic mean of the individual thresholds. The arithmetic mean was chosen rather than geometric mean to remain consistent with the arithmetic progression of fat content in the test samples.

### 2.5. Statistical analysis

Data analyses were performed using XLSTAT (Version 2015.3.01.19349, Addinsoft, Paris, France). For all data analyses, the effects were considered significant when  $p < 0.05$ .

Analyses of variance (ANOVA) were carried out with a general linear model (GLM). Post hoc pairwise multiple comparisons were performed using Student-Newman-Keuls tests.

A hierarchical cluster analysis (HCA) was performed, and Ward's method was applied in order to gather subjects having similar DetT and DiffT for each condition into the same group.

A biplot representation of the principal component analysis (PCA) of the covariance matrix was performed on the DetT and DiffT for each condition to investigate interactions among the 8

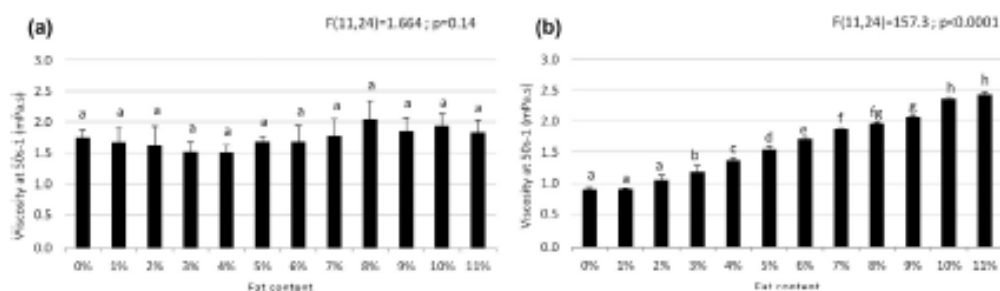


Fig. 1. Cottage cheeses viscosity measurements at  $50 \text{ s}^{-1}$  for samples ranging from 0% to 11% fat at a)  $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and b)  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (means  $\pm$  SEM). Viscosity measurements were performed with a rotating shear rate imposed rheometer (rheomat RM200, Lamy Rheology, Champagne au Mont d'Or, France) equipped with a DIN/ISO 3219 (M5-DIN 11) measuring system. ANOVA (viscosity  $\times$  fat content  $\times$  error) was performed at each temperature. Means indicated by different letters are significantly different.

variables (2 thresholds, 4 conditions) and to illustrate clustering among the subjects.

### 3. Results

#### 3.1. Detection threshold (DetT)

The ANOVA (DetT = subject + replicate + temperature + nose clip + temperature  $\times$  nose clip + error) for the DetT yielded no significant effect of the replicate factor ( $p = 0.103$ ). Consequently, the mean of the replicates was used for the following analyses. The subject factor was highly significant ( $p < 0.001$ ), indicating strong inter-individual variability. The temperature and nose clip factors were also significant ( $F(1,43) = 15.97$ ;  $p < 0.001$  and  $F(1,43) = 7.23$ ;  $p = 0.008$ , respectively), without any significant interaction between them ( $p = 0.94$ ). An increase in temperature induced a decrease in the DetT (approximately  $-19\%$ ), while the use of a nose clip induced an increase in the DetT values (approximately  $+13\%$ ). The temperature effect was larger than the nose clip effect.

#### 3.2. Difference threshold (DiffT)

The ANOVA (DiffT = subject + replicate + temperature + nose clip + temperature  $\times$  nose clip + error) of the DiffT yielded no significant effect of the replicate factor ( $p = 0.111$ ). As for DetT, the effect of the subject factor was highly significant ( $p < 0.001$ ). The ANOVA results indicated significant effects of the temperature and nose clip factors ( $F(1,43) = 11.41$ ;  $p = 0.001$  and  $F(1,43) = 5.86$ ;  $p = 0.016$ , respectively), without any significant interaction ( $p = 0.55$ ). An increase in temperature induced a decrease in the DiffT (approximately  $-16\%$ ), while the use of a nose clip induced an increase in the DiffT values (approximately  $+12\%$ ). As for detection thresholds, the temperature effect was larger than the nose clip effect.

#### 3.3. Comparison of temperature and aroma effects on the fat thresholds

For both detection and difference thresholds, the temperature factor had a larger effect on the thresholds than did the nose clip factor, but it is interesting to note that the threshold without a nose clip at  $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and the threshold with a nose clip at  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  are not significantly different (Fig. 2). This means that the aroma perception at  $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  counterbalanced the effect of temperature.

#### 3.4. Inter-individual variability

ANOVA conducted on DetT and DiffT values revealed considerable inter-individual variability. The result of the HCA of the

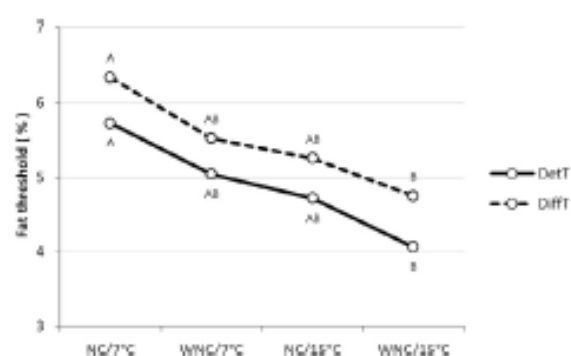


Fig. 2. Difference (DiffT) and detection (DetT) mean thresholds of the panel ( $n = 40$ ) for each condition tested. Thresholds: fat content difference between test and reference samples of 0% and 3% for DetT and DiffT, respectively. NC = nose clip, WNC = without nose clip.  $^{\ast}$   $p$  value  $< 0.05$ ;  $^{\ast\ast}$   $p$  value  $< 0.001$ . Means indicated by different letters are significantly different.

complete set of variables (8 threshold values for each subject) allowed a three-cluster division to be proposed. The biplot representation of the principal component analysis (PCA) shows that vectors of variables are relatively close to each other, meaning that they are positively correlated (Fig. 3). This assumption was confirmed by the correlation matrix (Pearson's  $r$ ), which indicates that 25 of 28 two-by-two correlations between thresholds were significant. The 40 subjects are mainly spread along the x-axis, with the most sensitive subjects (low threshold) on the left side of the graph ( $S+$ ,  $n = 7$ ), the least sensitive subjects (high threshold,  $S-$ ,  $n = 9$ ) on the right side of the graph, and the subjects with intermediate sensitivity ( $S0$ ,  $n = 24$ ) in the center of the graph.

No significant difference was found among these three clusters in terms of age ( $F(2,39) = 0.36$ ;  $p > 0.05$ ) or body mass index (BMI:  $F(2,39) = 0.013$ ;  $p > 0.05$ ). Due to the small cluster sizes, difference between clusters by sex could not be tested.

Figs. 4 and 5 show the DetT and DiffT, respectively, for the three clusters, with and without nose clips and for both tested temperatures. The results of ANOVA by cluster conducted for each threshold (threshold = subject + temperature + nose clip + temperature  $\times$  nose clip + error) showed that the least sensitive subjects ( $S-$ ) had high DetT and DiffT, regardless of the experimental conditions (no significant effect of the temperature or nose clip factors). Similarly, the DetT and DiffT of the most sensitive subjects ( $S+$ ) was not influenced by the tasting temperature, while the use of the nose clip had little effect ( $p = 0.043$ ). Conversely, the results of the ANOVA for the  $S0$  cluster (intermediate sensitivity) showed that the effects of the two experimental factors were significant.

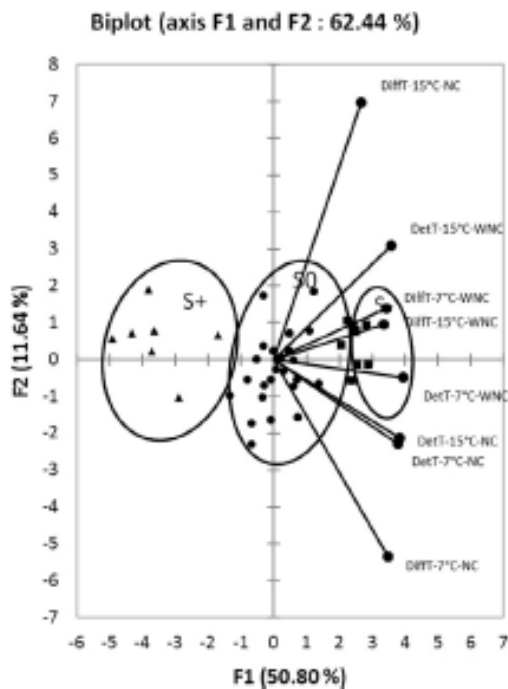


Fig. 3. Biplot representation of the principal component analysis (PCA) of the 40 subjects' thresholds for all experimental conditions. Subset S+ (black triangles): high-sensitivity group ( $n=7$ ), subset S0 (black circles): medium-sensitivity group ( $n=24$ ) and subset S- (black squares): low-sensitivity group ( $n=9$ ). DetT = absolute threshold, DiffT = difference threshold, NC = nose clip, WNC = without nose clip.

For this cluster, regardless of the type of threshold, an increase in temperature induced a decrease in the DetT (approximately  $-25\%$ ), while the use of the nose clip had the opposite effect (approximately  $+16\%$ ).

#### 4 Discussion

Few studies have investigated the impact of tasting temperature on fat perception. Mela et al. (1994) found no effect of temperature on the perceived fat content of oil-in-water emulsions. On the contrary, Engelen et al. (2003) showed a significant influence

of temperature ( $10^\circ\text{C}$ ,  $22^\circ\text{C}$ ,  $35^\circ\text{C}$ ) on the ratings of several attributes in custard dessert. Sensory characteristics such as odors and flavors, as well as melting mouth feel and fat after feel, were rated as more intense at higher product temperatures. In the same study, these authors showed that a higher product temperature resulted in higher oily/fat flavor and lower thick mouth feel intensity ratings for mayonnaise. These results suggest that the perception of fat is more salient at higher temperatures. This hypothesis is supported by our results because we observed lower DetT and DiffT at  $15^\circ\text{C}$  than at  $7^\circ\text{C}$ .

Engelen et al. (2003) indicated that this better perception of fat at higher temperatures could be due to retronasal olfactory cues that may be promoted by a higher aroma release. Indeed, an increase in food temperature (from  $25^\circ\text{C}$  to  $50^\circ\text{C}$ ) has been shown to affect the partition coefficient of volatile compounds between the product and air phases (Tromelin, Andriot, Kopjar, & Guichard, 2010), so a higher concentration of odorants can reach the olfactory mucosa when food is served warmer (Engelen et al., 2003). Such an effect is also observable at lower temperatures. For instance, Fuentes (Fuentes, Ventanas, Morcuende, & Ventanas, 2013) showed an increase in overall flavor perception when the serving temperature of dry-cured ham increased from  $7^\circ\text{C}$  to  $16^\circ\text{C}$  and from  $16^\circ\text{C}$  to  $20^\circ\text{C}$ . In our study, selected temperatures were  $7^\circ\text{C}$  and  $15^\circ\text{C}$ ; thus, we could expect more salient olfactory cues at the higher temperature, leading to higher sensitivity for fat (lower thresholds) at  $15^\circ\text{C}$  without a nose clip (i.e., the aroma is perceivable). However, this is not the case. Indeed, we found no significant interactions between the temperature and nose clip factors, which indicates that the influence of temperature was similar regardless of whether the aroma was perceived (i.e., with vs. without a nose clip). Thus, in our study, the enhanced perception of aroma could not explain higher sensitivity for fat at the higher temperature. We cannot exclude the possibility that the difference in the temperatures tested in our study was not great enough to significantly increase aroma perception even if aroma release was increased. Additional measurements (flavor release monitoring and odor intensity ratings) are needed to definitively rule out this hypothesis.

An alternative explanation would be related to the modification of texture, especially of viscosity, between low and high temperatures. At  $7^\circ\text{C}$ , viscosity measured at  $50\text{ s}^{-1}$  was not significantly different across products (Fig. 1), suggesting that product discrimination was not performed on the basis of perceived viscosity, but it was more likely performed on the basis of other textural cues, such as friction or stickiness and/or somesthetic or taste sensations. In contrast, at  $15^\circ\text{C}$ , viscosity was significantly different across products, so perceived viscosity, along with other

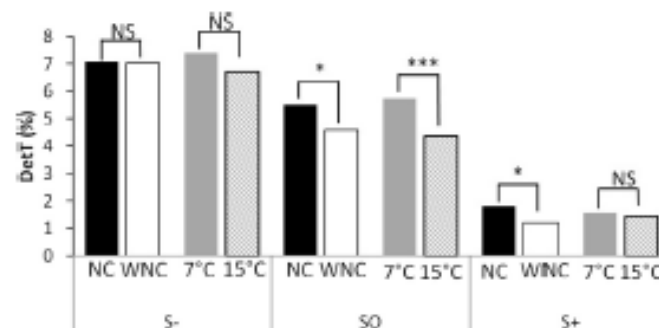


Fig. 4. Detection mean thresholds (ref 0% fat) for the three classes of subjects by experimental condition:  $7^\circ\text{C}$  with nose clip (NC),  $7^\circ\text{C}$  without NC (WNC),  $15^\circ\text{C}$  with NC and  $15^\circ\text{C}$  without NC. Thresholds: fat content difference between test and reference (0%) samples. Subset S-: low-sensitivity group ( $n=9$ ), subset S+: high-sensitivity group ( $n=7$ ) and subset S0: medium-sensitivity group ( $n=24$ ). \*  $p$  value  $<0.05$ ; \*\*  $p$  value  $<0.01$ ; \*\*\*  $p$  value  $<0.001$ .

Please cite this article in press as: Schoumacker, R., et al. Fat perception in cottage cheese: The contribution of aroma and tasting temperature. Food Quality and Preference (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.04.003>

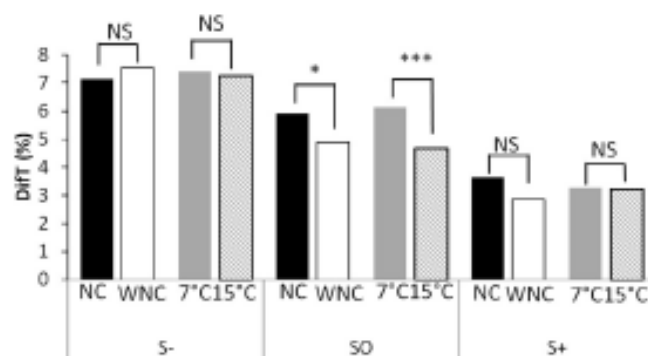


Fig. 5. Difference mean thresholds (ref 3X fat) for the three classes of subjects by experimental condition: 7 °C with nose clip (NC), 7 °C without NC (WNC), 15 °C with NC and 15 °C without NC. Thresholds: Fat content difference between test and reference (3X) samples. Subset S-: low-sensitivity group (n = 9), subset S+: high-sensitivity group (n = 7) and subset SO: medium-sensitivity group (n = 24); \* p value <0.05; \*\* p value <0.01; \*\*\* p value <0.001.

sensations, could have been used by subjects to determine the fat content of the samples. Whether perceived viscosity is a reliable texture cue for semi-liquid food is still debated. Some studies have reported, for instance, that perceived creaminess in butter fat-in-water emulsions is strongly influenced by viscosity (Akhtar, Stenzel, Murray, & Dickinson, 2005), whereas others have found that texture perceptions cannot be used to differentiate fat content in milk and yogurt (Le Calve et al., 2015). In our study, viscosity differences among cottage cheese of varying fat content at 15 °C were very low (1.5 mPa.s); it is thus more likely that other textural characteristics of the cottage cheese associated with friction, and measurable by tribological test methods, are responsible for sensory discrimination, as demonstrated by Le Calve et al. (2015).

In the present study, the use of a nose clip allowed for the investigation of the role of aroma in fat detection and fat level discrimination. Our results showed a decrease in the thresholds, that is, a higher sensitivity for fat, without a nose clip. These findings are in line with previous observations that the use of nose clips reduced perceptions of fattiness, especially of fat-related attribute intensity in solid products (Yackinous & Guinard, 2000) and custard desserts (Weenen, Jellema, & de Wijk, 2005). Similarly, other studies supported the contribution of aroma to dietary fat perception and demonstrated that added aroma compounds could increase the perceived intensity of fat-related attributes, such as creaminess and residual mouthfeel (Saint-Eve et al., 2004). This effect of aroma on fat perception is likely the result of multisensory integration, which can occur when the aroma is congruent with, or similar to, fat perception (Syarifuddin et al., 2016). Overall, these results confirm the contribution of different senses to fat content detection (Bult, de Wijk, & Hummel, 2007).

For both DetT and DIFT, the influence of the temperature factor was found to be larger than the influence of the nose clip factor, at least for the temperature and fat content ranges tested. This may be because an increase of temperature can induce two types of modifications (an increase of the partition coefficient and a decrease in the viscosity of the matrix which may in turn increase the aroma release rate (Lubbers & Buttler, 2010)), while wearing a nose clip suppresses only aroma perception. Therefore, it can be concluded that the more fat-related sensory dimensions are modified, the easier the discrimination of fat content. Nevertheless, we also observed that thresholds at 7 °C without a nose clip and thresholds with a nose clip at 15 °C were not significantly different (Fig. 2). This result suggests that retro nasal olfactory and textural cues were equally useful in these two conditions.

In spite of the rather low number of participants in our study (n = 40), we took the opportunity to look for differences between

subjects. On the basis of the detection and difference thresholds estimated for each subject in the various experimental conditions, we defined 3 groups with varying sensitivity for fat (most sensitive: S+, intermediate sensitive: SO, and least sensitive: S-). The medium-sensitivity group (SO) used olfactory cues for fat content discrimination, but they also used other sensations whose differences increase with temperature. Viscosity is once such cue, but we cannot exclude that other textural cues, such as friction, stickiness and/or somesthetic or taste sensation, could interact. S+ subjects also used aroma but to a lesser extent than did SO subjects. However, sensations whose differences increased with temperature did not seem useful for the S+ group. Finally, S- subjects did not discriminate between samples at all, even between those with the largest difference in fat content. The aroma contribution did not improve their discrimination abilities. It would nevertheless be interesting to assess the discrimination abilities of this group for larger differences in fat content to better characterize their fat perception. Moreover, it might be relevant to evaluate their sensitivity toward fat-related aromas, because one could expect that these subjects have a lower sensibility toward such odorants and/or a different kinetics of aroma release than other groups, which may alter the perceived aroma quality.

Besides, several characteristics of the individual such as physiological, demographic or psychographic traits could account for the observed inter-individual variability in fat perception. Several studies supported hypotheses relating BMI to fat sensitivity and categorized subjects as hypo- or hypersensitive to fat (Engelen et al., 2003; Stewart et al., 2010) but not others (Tucker, Laguna, Quinn, & Mattes, 2013). Aging has also been shown to decrease fat perception because of decreased gustatory sensitivity (Pingel, Ostwald, Pau, Hummel, & Just, 2010). Oral physiological characteristics have especially been shown to influence fat perception (Nachtsheim & Schlich, 2013). Indeed, saliva flow, saliva composition and lipase and lysozyme activity, but also the number of fungiform papilla should be studied as potential physiological drivers of sensitivity to fat. These physiological parameters deserve to be further studied to better understand the mechanisms of fat perception and of inter-individual differences in perceptual sensitivity for dietary fat.

#### Acknowledgments

The authors thank Fabienne Bouillot, Manon Gordot, Pauline Lapertot and Margot Pavé for their technical assistance during the sessions with subjects. This work was supported by grants from the Regional Council of Burgundy (France), the FEDER

(European Regional Development Fund) and the Carnot Institute Qualimnet®. RS thanks the Giract Organization PhD Flavour Research Programme for a 1st year Bursary Award.

## References

- Albtax, M., Stenzel, J., Murray, B. S., & Dickinson, E. (2005). Factors affecting the perception of creaminess of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 521–526.
- ASTM (2004). *Standard Practice for Determination of Odor and Taste Thresholds by a Forced-choice Ascending Concentration Series Method of Limits. E 679-04*. West Conshohocken: ASTM.
- Bull, J. H. F., de Wijk, R. A., & Hummel, T. (2007). Investigations on multimodal sensory integration: Texture, taste, and orthonasal and retronasal olfactory stimuli in concert. *Neuroscience Letters*, 411(1), 6–10.
- de Wijk, R. A., Rasing, F., & Wilkinson, C. L. (2003). Texture of semi-solids: Sensory flavor–texture interactions for custard desserts. *Journal of Texture Studies*, 34(2), 131–146.
- Drewnowski, A. (1993). Individual differences in sensory preferences for fat in model sweet dairy products. *Acta Psychologica*, 84(1), 103–110.
- Engelen, L., de Wijk, R. A., Prinz, J. F., Janssen, A. M., Wrenen, H., & Bosman, F. (2003). The effect of oral and product temperature on the perception of flavor and texture attributes of semi-solids. *Appetite*, 41(3), 273–281.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2013). Effect of intramuscular fat content and serving temperature on temporal sensory perception of sliced and vacuum package dry-cured ham. *Meat Science*, 93(3), 621–629.
- Le Calve, B., Saint-Leger, C., Babas, R., Gelin, J. L., Parlet, A., Erni, P., et al. (2015). Fat perception: How sensitive are we? *Journal of Texture Studies*, 46(3), 200–211.
- Lubbers, S., & Buntler, E. (2010). Effects of texture and temperature on the kinetic of aroma release from model dairy custards. *Food Chemistry*, 123(2), 345–350.
- Mattes, R. D. (2009). Is there a fatty acid taste? *Annual Review of Nutrition*, 29, 305–327.
- Mela, (1988). Sensory assessment of fat content in fluid dairy-products. *Appetite*, 10(1), 37–44.
- Mela, D. J., & Christensen, C. M. (1987). Sensory assessment of oiliness in a low moisture food. *Journal of Sensory Studies*, 2(4), 273–281.
- Mela Langley & Martin (1994). No effect of oral or sample temperature on sensory assessment of fat content. *Physiology & Behavior*, 56(4), 655–658.
- Nachshelm, R., & Schlich, E. (2013). The influence of 6-n-propylthiostein bitterness, fungiform papilla count and saliva flow on the perception of pressure and fat. *Food Quality and Preference*, 29(2), 137–145.
- Pingel, J., Ostwald, J., Pau, H. W., Hummel, T., & Just, T. (2010). Normative data for a solution-based taste test. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 267(12), 1911–1917.
- Saint-Bre, A., Paçi Kora, E., & Martin, N. (2004). Impact of the olfactory quality and chemical complexity of the flavouring agent on the texture of low fat stirred yogurts assessed by three different sensory methodologies. *Food Quality and Preference*, 15(7–8), 655–668.
- Schiffman, S. S., Graham, B. G., Sazely-Miller, E. A., & Warwick, Z. S. (1998). Orosemy perception of dietary fat. *Current Directions in Psychological Science*, 7(5), 137–143.
- Stewart, J. E., Freinle-Bisset, C., Gidding, M., Delahunty, C., Clifton, P. M., & Keast, R. S. J. (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104(1), 146–152.
- Syarifuddin, A., Septier, C., Salles, C., & Thomas-Danguin, T. (2016). Reducing salt and fat while maintaining taste: An approach on a model food system. *Food Quality and Preference*, 48, Part A, 59–69.
- Tromelin, A., Andrieu, I., Kogej, M., & Guichard, E. (2010). Thermodynamic and structure property study of liquid–vapor equilibrium for aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4372–4387.
- Tucker, R., Laguna, L., Quinn, R., & Mattes, R. D. (2013). The effect of short, daily oral exposure on non-esterified fatty acid sensitivity. *Chemical Senses*, 38(2), 78–85.
- Wrenen, H., Jellema, R. H., & de Wijk, R. A. (2005). Sensory sub-attributes of creamy mouthfeel in commercial mayonnaises, custard desserts and sauces. *Food Quality and Preference*, 16(2), 163–170.
- Yackinos, C., & Guichard, J.-X. (2000). Flavor manipulation can enhance the impression of fat in some food. *Journal of Food Science*, 65(5), 909–914.

Il est important de noter que l'effet pince-nez et l'effet température ne sont pas visibles chez les sujets S+ et S-, probablement à cause de la méthode de mesure des seuils qui n'est pas adaptée pour ces sujets. En effet, les sujets peu sensibles n'ont pas été sensibles au gras et ce, même à 11% de matière grasse. Pour ces sujets, il aurait donc été pertinent d'ajouter des produits encore plus gras pour définir avec précision leurs seuils de perception du gras. Inversement, les sujets sensibles ont été très sensibles au gras (dès 1% de matière grasse) et ce, quelle que soit la condition étudiée. Ainsi, il aurait été judicieux d'effectuer des mesures de seuils en-dessous de 1% de matière grasse pour étudier l'effet pince-nez et température de service chez ces sujets sensibles au gras.

### 6.1. Résultats complémentaires

L'indice de masse corporelle (IMC), l'âge et le genre peuvent modifier les perceptions sensorielles du gras (Schiffman et al., 1998, Pingel et al., 2010, Stewart et al., 2010, Stewart et al., 2011, Heinze et al., 2015). Ces éléments ont donc été comparés entre nos différents groupes de sensibilité au gras. Dans notre cas, l'IMC n'a pas été trouvé significativement différent entre les groupes de sensibilité au gras (IMC:  $F(2,39) = 0,013$ ;  $p > 0,05$ ). Ces résultats, en accord avec ceux de Tucker et al. (2013), peuvent s'expliquer par le fait qu'il y avait peu de variabilité de l'IMC entre les individus, car ce facteur n'a pas été pris en compte dans les critères de recrutement des sujets. Pour la même raison, le facteur âge n'est pas non plus significativement différent entre les groupes ( $F(2,39) = 0,36$ ;  $p > 0,05$ ). Certains auteurs se sont intéressés au facteur âge en effectuant leur recrutement en fonction de ce paramètre. Par exemple, Pingel et al. (2010) ont identifié une baisse de la sensibilité gustative avec l'âge sur un panel composé de 944 sujets entre 5 et 90 ans. En utilisant des émulsions d'huiles, Schiffman et al. (1998) ont obtenu des seuils de détections du gras plus faible chez les sujets jeunes (moyenne d'âge = 23,7 ans) que chez les sujets âgés (moyenne d'âge = 87,3 ans). Cependant, la majorité des auteurs ont travaillé sur des solutions ou des matrices modèles et pas sur un aliment de consommation courant. Concernant le facteur genre, certains auteurs ont indiqué une plus grande sensibilité chez les femmes (Kamphuis et al., 2001) alors que d'autres n'ont observé aucune différences entre les hommes et les femmes (Stewart et al., 2010, Tucker et al., 2013, Poette et al., 2014). Dans notre étude, une tendance a été mise en évidence avec une majorité de femmes dans le groupe sensible (7/9) et une majorité d'hommes dans le groupe peu sensible (5/7). Cependant, les effectifs de ces deux groupes sont un peu faibles pour conclure sur un effet genre.

## 6.2. Conclusion

Cette étude confirme, sur le groupe, l'effet de l'olfaction et de la température de service sur la perception du gras. Néanmoins, ces résultats globaux cachent de grandes disparités entre les individus. Ainsi, si certains sont globalement sensibles au gras d'autres le sont beaucoup moins. Certains sont sensibles à la composante olfactive, d'autres non. Certains sont sensibles à l'effet de la température de service et pas les autres. Etant donné que dans notre étude, cette grande variabilité interindividuelle de sensibilité au gras et à ces différentes composantes ne dépend ni de l'âge ni de l'IMC nous supposons l'intervention d'autres caractéristiques interindividuelles que nous allons étudier maintenant.

## 7. Recherche des paramètres physiologiques pouvant expliquer la variabilité interindividuelle de sensibilité au gras

Etant donné que dans notre étude l'âge, l'IMC et le genre n'expliquent pas la variabilité interindividuelle de la perception du gras dans des fromages blancs, nous avons cherché à comprendre quelle(s) pouvait être l'origine(s) de ces différences. Nous nous sommes penchés sur les paramètres physiologiques qui pourraient expliquer cette différence de sensibilité en nous focalisant plus particulièrement sur nos sujets sensibles (S+) et nos sujets peu sensibles (S-).

Le profil sensoriel effectué ainsi que l'utilisation du pince-nez dans la mesure des seuils de détection et de discrimination, nous ont permis de confirmer le rôle de la composante olfactive dans la perception du gras dans les fromages blancs. Cette contribution de l'olfaction pourrait s'expliquer au moins en partie par la composition aromatique des produits. Outre cette composition, la contribution de l'olfaction pourrait aussi s'expliquer par la libération des composés d'arôme. Les études visant à suivre la libération des arômes au cours de la consommation ont mis en évidence une importante variabilité interindividuelle tant sur la libération que sur la perception des arômes (Pionnier et al., 2004a). Il est donc envisageable que la libération des arômes soit différente entre les sujets sensibles et les sujets peu sensibles au gras. Selon Pionnier et al. (2014a), le comportement masticatoire serait à l'origine des différences de libération aromatique entre les individus. Cependant, le fromage blanc utilisé dans notre étude étant une matrice fluide le processus de mastication est peu ou pas impliqué. Ce sont les joues et la langue qui positionnent l'aliment dans la bouche. L'aliment est alors comprimé entre langue et palais, plutôt que mastiqué. Ensuite, la langue rassemble le produit et fait parvenir le bol vers l'arrière de la cavité buccale pour être dégluti. Pour cette raison, nous n'avons effectué aucune mesure de l'activité masticatoire. Néanmoins, la

libération des composés aromatiques pourrait différer entre les deux groupes en fonction du flux salivaire et/ou du comportement respiratoire des sujets. En effet, la salivation participe largement à la destruction de l'aliment et favorise la libération des composés d'arôme en bouche (Overbosch et al., 1991). Le flux salivaire des sujets pourrait donc moduler la sensibilité au gras en influençant l'accès des composés sapides aux récepteurs du goût et/ou en favorisant la libération des composés d'arôme. Par ailleurs, le flux respiratoire semble influencer le transfert des composés d'arômes de la cavité buccale vers la cavité nasale (Linthorpe et al., 2002). Pour vérifier ces hypothèses, nous avons effectué des mesures du flux salivaire et du flux respiratoire. Un autre paramètre qui pourrait être à l'origine de cette variabilité interindividuelle est le volume oral en modulant la concentration des molécules volatiles présentes dans la cavité buccale (Mishellany-Dutour et al., 2012). Ce paramètre a été mesuré.

La littérature suggère également la contribution de la gustation dans la perception du gras. Ainsi, d'autres paramètres physiologiques pourraient être à l'origine de la variabilité interindividuelle de la perception du gras. D'après la littérature, les sujets possédant beaucoup de papilles fongiformes seraient plus sensibles aux saveurs sucrée et amère (Delwiche et al., 2001, Segovia et al., 2002). De plus, les sujets sensibles à la 6-n-propylthiouracil (molécule amère), qui possèdent un nombre important de ces papilles, seraient également plus aptes à différencier différents niveaux de matière grasse (Tepper, 1997). Ainsi, le nombre important de papilles fongiformes pourrait être à l'origine d'une meilleure sensibilité au gras. Le comptage des papilles fongiformes a donc été effectué sur nos sujets de l'étude.

Enfin, parce que nous avons montré que la quantité de gras résiduel est importante dans la perception du gras, nous supposons que la rugosité de la langue pourrait aussi être liée à la perception du gras en modulant la quantité de produit retenue dans la cavité buccale. En effet, une rugosité importante nécessiterait un tapissage lingual plus important pour percevoir les variations de teneur en matière grasse d'un aliment. Des sujets avec une langue très rugueuse pourraient donc avoir du mal à discriminer des produits ayant peu ou pas de matière grasse. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une forte rugosité rendrait plus difficile le rinçage entre deux consommations et donc la discrimination de la teneur en matière grasse de deux produits. En effet, si les échantillons se mélangent lors de la détermination des seuils de sensibilité au gras à cause de la rugosité de la langue, il est possible que le test soit plus difficile. Enfin, les sujets possédant plus de papilles pourraient avoir une langue plus rugueuse que les autres.



## 7.1. Matériels et Méthodes

### 7.1.1. Volume oral

Le volume de la cavité buccale a été mesuré à l'aide d'un rhyno-pharyngomètre acoustique EccoVision® (Hood laboratories, DHSS, Miami, FL, USA). Cet appareil comprend 4 compartiments : un tube à ondes, une plate-forme électronique, un embout buccal et un filtre jetable (Figure 28). L'appareil émet une onde sonore qui est réfléchiée sur les parois de la cavité orale. L'onde réfléchiée est alors détectée au moyen de deux microphones. Le dispositif original a été décrit par (Louis et al., Fredberg, 1994).

Le sujet s'installait confortablement avant de placer l'embout buccal dans sa bouche, les dents contre la collerette et la langue en position basse. Pour éviter les fuites d'air, il était demandé au sujet de mettre les lèvres autour de l'embout buccal. Chaque sujet a effectué quatre répétitions.

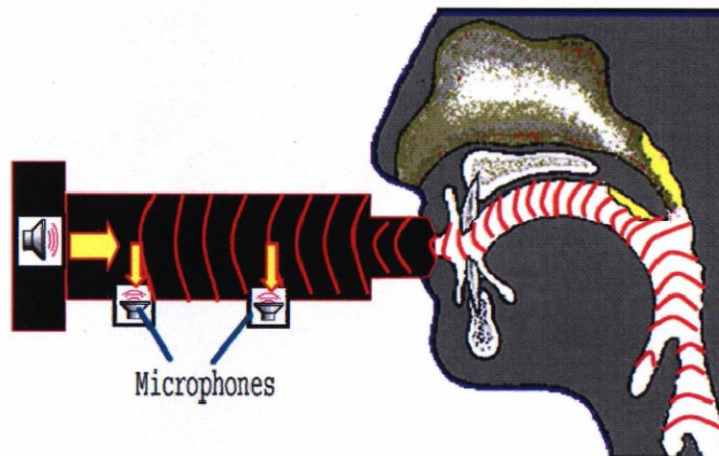


Figure 28 : Mesure du volume oral par un rhyno-pharyngomètre acoustique

### 7.1.2. Flux respiratoire, Fréquence respiratoire et Volume courant

Le flux respiratoire (FR) a été mesuré au repos, à l'aide d'un spiromètre (Pulmo System II, MSR, Rungis, France). Le sujet s'installait confortablement pour respirer de façon naturelle dans un masque nasal relié à l'appareil. Il lui était demandé de maintenir la bouche fermée et de respirer uniquement par le nez sur une période de trois minutes. Cette technique permet de mesurer le volume d'air inspiré, expiré et les débits qui s'y rattachent. Ainsi, deux paramètres ont été extraits pour chaque mesure : la fréquence respiratoire (FqR) et le volume courant (VC). La fréquence respiratoire représente le nombre de cycles respiratoires par minute et le volume courant correspond au volume d'air mobilisé à chaque cycle respiratoire (exprimé en litres). La formule

suivante :  $FR = (FqR*VC)/60$  permet d'obtenir le flux respiratoire ( $L.s^{-1}$ ). Chaque sujet a effectué trois répétitions.

### 7.1.3. Flux salivaire au repos

Les sujets déglutissaient une fois avant de commencer la procédure de mesure. La déglutition correspondait au temps 0. Après cela, le sujet penchait légèrement sa tête en avant et disposait d'un pot (préalablement pesé) dans lequel il évacuait la salive accumulée dans sa bouche sur une période de 10 minutes. Les sujets ne devaient pas boire, manger ou fumer au moins une heure avant la collecte. Le flux salivaire a été exprimé en  $mL.min^{-1}$ , en supposant que 1 g de salive correspond à 1mL. La différence de masse entre le flacon contenant de la salive et le flacon vide a permis l'obtention du flux salivaire.

### 7.1.4. Viscosité de la salive

La viscosité de la salive a été mesurée à l'aide d'un Vibro – viscosimètre type SV-A (A&D Compagny Limited Japan) (Figure 29). Cet appareil a déterminé la viscosité de la salive par vibration. Le viscosimètre a mesuré la viscosité en détectant le courant électrique de commande nécessaire pour faire résonner deux plaques de capteur à la fréquence constante de 30Hz et à l'amplitude de 1mm. Il était doté d'un régulateur de température qui permettait de maintenir la salive à une température de 30°C (température approximative de la bouche). La salive prélevée lors de la mesure du flux salivaire au repos a été utilisée pour les mesures de viscosité. Celle-ci a été introduite dans la cuve du viscosimètre qui a indiqué la viscosité salivaire en mPa.s.



Figure 29 : Photo des plaques vibrantes du viscosimètre utilisé pour la mesure de la viscosité de la salive.

### 7.1.5. Comptage des papilles fongiformes

Le comptage des papilles fongiformes a été réalisé dans la zone où la densité de papilles est la plus représentative de la densité totale (Shahbake et al., 2005), c'est-à-dire à droite de la ligne médiane de la langue et à 1 cm du bout de la langue sur une surface de 0,6 mm de diamètre (Figure 30).

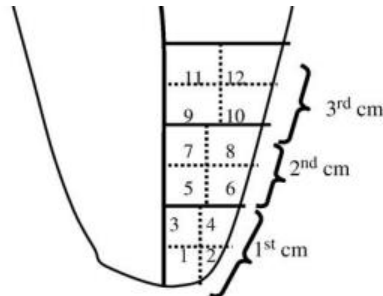


Figure 30 : Schéma représentant les travaux réalisés par Shahbake et al. (2005) aboutissant à la mise en évidence de la zone représentative de la densité totale de papilles fongiformes sur la langue (zone 5).

Ce comptage a été effectué à l'aide de la méthode de référence par photo. Cette méthode de référence, très largement utilisée pour le comptage de la densité des papilles fongiformes consiste à prendre en photo une zone de la langue. Pour se faire, le sujet était assis, les coudes sur la table, la tête calée entre les mains et la langue tirée, coincée entre les lèvres et/ou les dents (Figure 31). Après séchage de la langue avec du papier filtre, de l'encre bleue alimentaire diluée au 1/20<sup>ème</sup> a été appliquée à l'aide d'un coton tige. A nouveau, la langue du sujet a été séchée avec du papier filtre avant de disposer un disque avec un trou de 6 mm de diamètre pour déterminer la zone de comptage. Un appareil photo standard (LUMIX Panasonic TZ57) a ensuite été utilisé pour prendre en capture cette zone (Figure 31). Cette méthode a été répétée trois fois. Le comptage des papilles a été effectué à partir des photos par deux compteurs. Les papilles fongiformes sont rondes, en forme de champignon, en relief, et de couleur rosée car mal colorées par le colorant bleu.

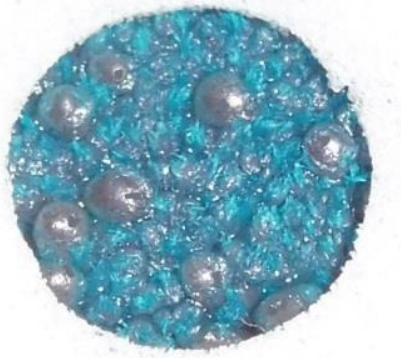


Figure 31 : Photo de la position à adopter lors du comptage des papilles fongiformes (à gauche) et photo de la zone située dans le disque de 6mm de diamètre après coloration de la langue au coton tige (à droite).

### 7.1.6. Tapissage et lipides résiduels

Les résultats de cette partie proviennent de l'expérimentation décrite dans la partie 5.

### 7.1.7. Rugosité de la langue

La rugosité de la langue a été mesurée par moulage du bout de la langue avec du silicone dentaire de la marque SIFLO délivré par le laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes à l'Ecole Centrale de Lyon. Habituellement, le laboratoire utilise ce silicone en cosmétologie pour mesurer la profondeur des rides de la peau. Le sujet était installé confortablement dans un fauteuil entre la position assise et couchée. Après séchage de la langue avec un mouchoir complété par un séchage à l'air froid pendant 10 secondes, 0,8 g de silicone mélangé avec 3 gouttes de catalyseur a été étalé sur le bout de la langue du sujet à l'aide d'une spatule en bois (Figure 32). Au bout de 2 minutes, le silicone qui a totalement durci a pu être retiré à l'aide de la spatule. L'emprunte annotée a ensuite été placée dans une petite boîte de Petri étiquetée pour être analysée au laboratoire de Lyon.



**Figure 32 : Application du silicone sur la langue avec la spatule en bois pour la détermination d'une empreinte de la langue.**

Le traitement des données a été effectué par le laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes à l'Ecole Centrale de Lyon.

### 7.1.8. Libération des composés d'arôme en bouche

#### a. Les produits

Le fromage blanc à 1% de matière grasse, formulé à partir des deux produits de références (0% et 7,8% de matière grasse) a été préparé 24 heures avant les séances de dégustation de sorte que les arômes aient le temps d'atteindre l'équilibre dans la matrice. Le fromage blanc a été battu au fouet durant 2 minutes. Par la suite, les  $\frac{3}{4}$  du fromage blanc à 1% de matière grasse ont été aromatisés à 1,4% avec l'arôme fourni par Firmenich supplémenté en 2,3-pentanedione et en 2,3-hexanedione,

toutes deux à 50 ppm dans la matrice. Nous avons décidé d'ajouter ces deux molécules dans nos matrices afin d'être surs de pouvoir les suivre par spectrométrie de masse. En effet, l'appareil s'est révélé insuffisamment sensible pour suivre *in vivo* les arômes en concentration naturelle dans le fromage blanc. Enfin, l'ensemble des fromages blancs (aromatisé et non aromatisé) ont été agités durant 2 minutes à l'aide d'une cuillère et placé dans une chambre froide à 4°C.

#### **b. Déroulement de la séance**

A son arrivée, le sujet s'installait confortablement, avec le dispositif casque présenté dans le chapitre 3 sur la tête et l'embout nasal positionné dans ses narines. Ce casque était relié au spectromètre de masse par réaction de transfert de proton. Au cours d'une acquisition, le sujet devait consommer en une seule fois, une cuillerée de 7 g de fromage blanc et signaler à l'expérimentateur sa première déglutition. Le fromage blanc aromatisé a été consommé trois fois pour obtenir trois répétitions. En plus de l'analyse des trois fromages blancs aromatisés, la séance débutait par la consommation d'un premier échantillon de 7 g de fromage blanc non aromatisé pour permettre au sujet de se familiariser avec le protocole de dégustation et vérifier le niveau de base des molécules d'intérêts. Entre deux échantillons, une pause de 2 minutes était imposée pour que le sujet se rince la bouche avec de l'eau. Les échantillons ont été servis à 7°C.

#### **c. Traitement des données de libération des composés d'arôme en bouche**

Les données obtenues à l'aide du logiciel TraitMass (développé au laboratoire par Jacques Maratray) représentent l'intensité (nCPS) des ions avec soustraction du bruit de fond. En plus des ions réactants  $m/z = 21,0221$ ,  $m/z = 39,0326$ , pas moins de 20 ions ( $m/z = 45,0335$ ,  $m/z = 47,0491$ ,  $m/z = 59,0491$ ,  $m/z = 60,0525$ ,  $m/z = 61,0284$ ,  $m/z = 63,00789$ ,  $m/z = 64,06$ ,  $m/z = 69,0699$ ,  $m/z = 75,0441$ ,  $m/z = 87,04804$ ,  $m/z = 87,07805$ ,  $m/z = 89,0597$ ,  $m/z = 101,0597$ ,  $m/z = 102,0631$ ,  $m/z = 115,0754$ ,  $m/z = 116,0787$ ,  $m/z = 117,091$ ,  $m/z = 119,0531$ ,  $m/z = 133,08$ ,  $m/z = 159,138$ ) ont été extraits pour chaque acquisition représentant chacun un profil de libération au cours du temps. Les courbes obtenues pour chaque ion ont été lissées afin d'éliminer les fluctuations dues aux cycles respiratoires des sujets à l'aide d'un logiciel développé sous MatLab par Vincent Gigot. Trois paramètres ont été extraits de chaque courbe de libération : l'aire sous la courbe (AUC) qui représente la quantité d'arôme libérée, l'intensité maximale ( $I_{max}$ ) et le temps nécessaire pour atteindre l'intensité maximale ( $t_{max}$ ).

Sur l'ensemble de données physiologiques et anatomiques, l'effet genre est susceptible d'intervenir. Ainsi, l'effet genre a été testé sur l'ensemble des paramètres mais il apparaît dans les résultats

uniquement lorsqu'il a été significatif. Il aurait cependant été intéressant d'augmenter le nombre de sujets pour mieux conclure.

## 7.2. Résultats

### 7.2.1. Volume oral

Le volume oral est significativement plus important chez les sujets peu sensibles au gras comparé aux sujets sensibles au gras (Figure 33a). Par ailleurs, le volume buccal des femmes est significativement plus petit que celui des hommes (figure 33b).

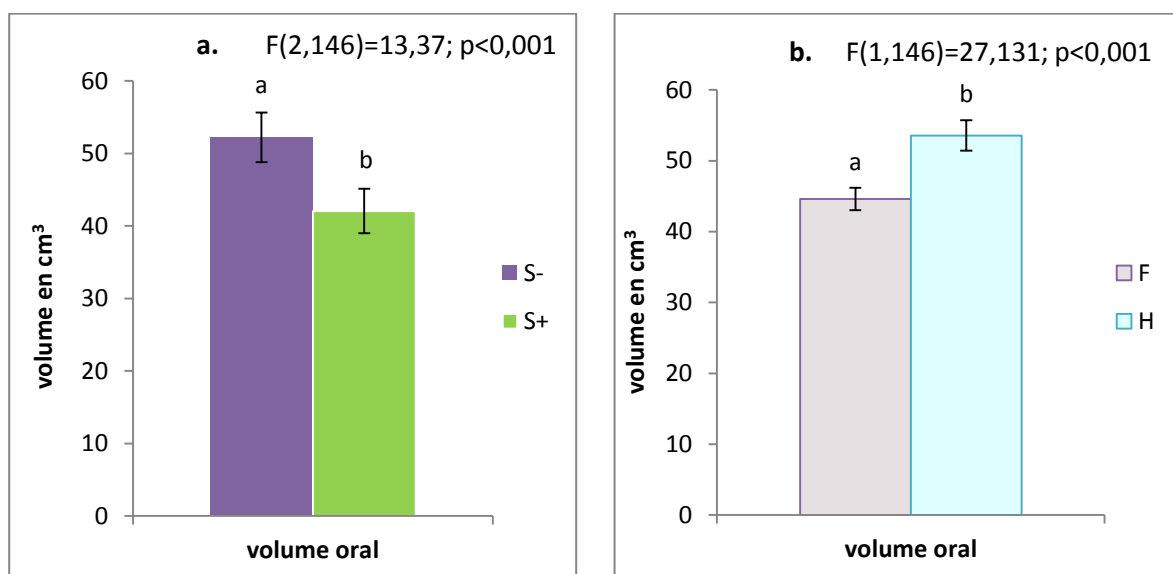


Figure 33 : Volume oral des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction a. de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6 et b. du genre : Femmes (F) n=7, Homme (H) n=7. Modèle de l'ANOVA : Volume oral = sensibilité + répétition + genre complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

### 7.2.2. Flux respiratoire, Fréquence respiratoire et Volume courant

Le flux respiratoire est similaire entre les deux groupes de sensibilité au gras (Figure 34a). En revanche, le flux respiratoire est moins important pour les femmes comparé à celui des hommes (Figure 33b). Ce dernier résultat est en accord avec les données de la littérature qui ont mis en évidence un effet genre dû à des différences physiologiques comme par exemple la taille des poumons (McClaran et al., 1998, Kilbride et al., 2003, Guenette et al., 2007).

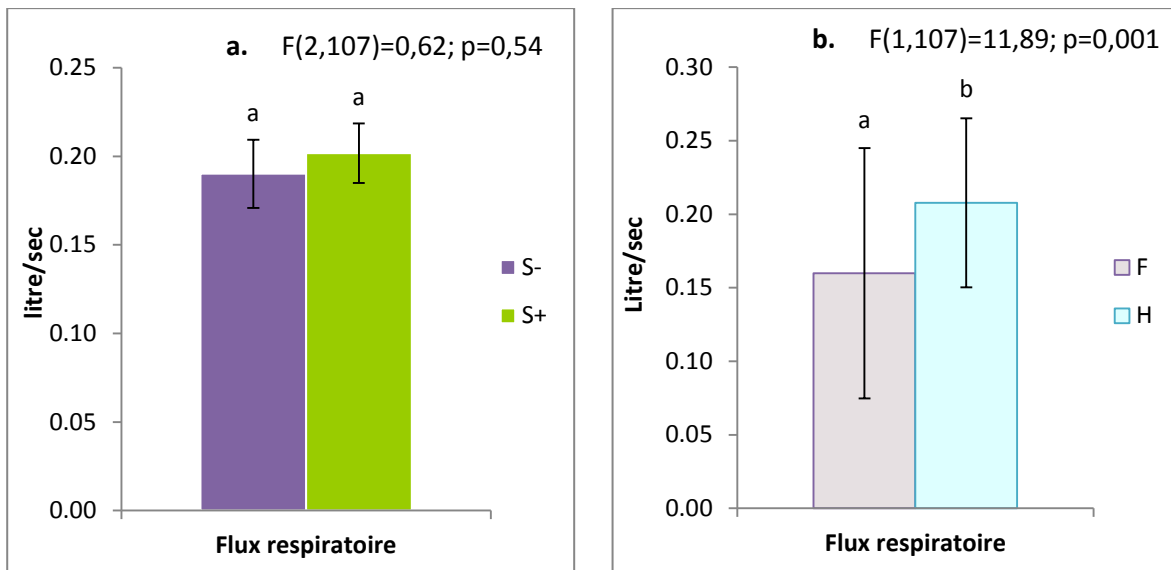


Figure 34 : Flux respiratoire des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction a. de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6 et b. du genre : Femmes (F) n=7, Homme (H) n=7. Modèle de l'ANOVA : Flux respiratoire = sensibilité + répétition + genre complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

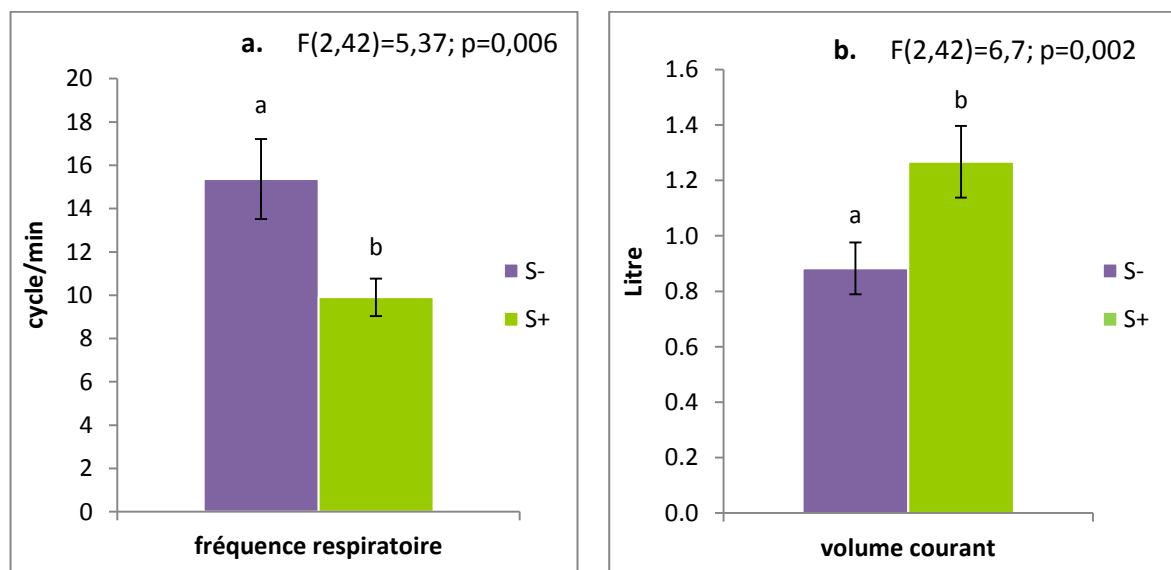


Figure 35 : Fréquence respiratoire (a.) et Volume courant (b.) des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6. Modèle de l'ANOVA : a. Fréquence respiratoire = sensibilité + répétition et b. Volume courant = sensibilité + répétition complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

Le flux respiratoire, qui représente l'activité respiratoire, est la combinaison de la fréquence respiratoire et du volume courant. Ainsi, pour éviter de masquer des différences qui pourraient être significatives, il semble particulièrement intéressant de distinguer ces trois paramètres. La figure 35a montre que les sujets peu sensibles ont une fréquence respiratoire plus élevée que les sujets très

sensibles au gras. D'autre part, les sujets les plus sensibles ont un volume courant plus important que les sujets peu sensibles (Figure 35b).

### 7.2.3. Flux salivaire

Le flux salivaire au repos des sujets peu sensibles tend à être inférieur à celui des sujets sensibles mais cette différence n'est pas significative (Figure 36).

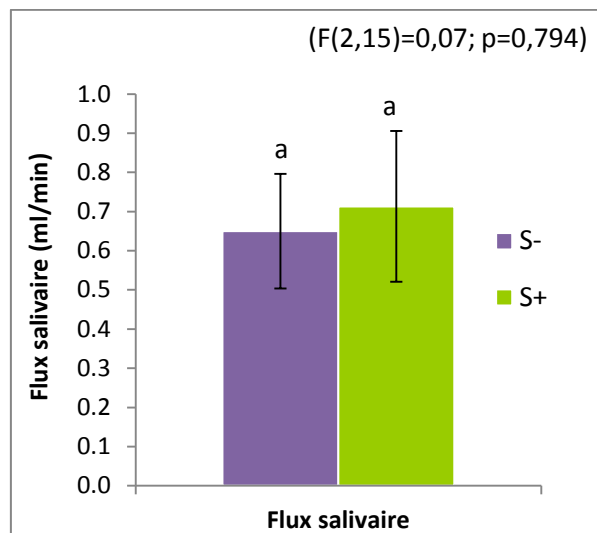


Figure 36 : Flux salivaire des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=9, Sujets très sensibles (S+) n=7. Modèle de l'ANOVA : Flux salivaire = sensibilité complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

### 7.2.4. Viscosité de la salive

La salive des sujets peu sensibles tend à être plus visqueuse que celle des sujets sensibles mais cette différence n'est pas significative (Figure 37). En effet, une variabilité importante est visible sur la viscosité de la salive des sujets peu sensibles.



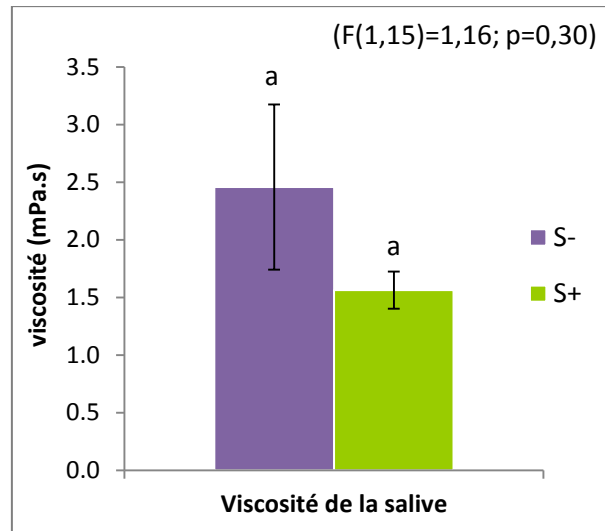


Figure 37 : Viscosité salivaire des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=9, Sujets très sensibles (S+) n=7. Modèle de l'ANOVA : Viscosité salivaire = sensibilité complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

### 7.2.5. Comptage des papilles fongiformes

Le comptage des papilles ne montre pas de différences significatives entre les deux groupes de sensibilité au gras (Figure 38).

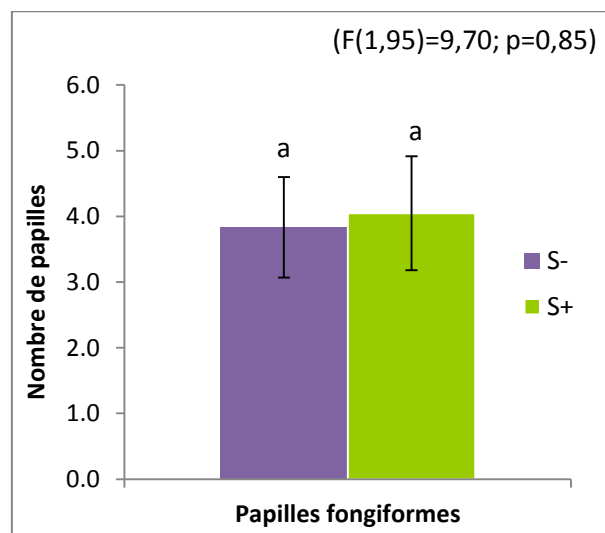


Figure 38 : Comptage des papilles fongiformes des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=9, Sujets très sensibles (S+) n=7. Modèle de l'ANOVA : papilles fongiformes = sensibilité + compteur + répétition + sujet (sensibilité) + sensibilité\*compteur + sensibilité\*répétition + compteur\*répétition complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

### 7.2.6. Tapissage et lipides résiduels

Bien que les différences de tapissage et de lipides résiduels soient très marquées entre les fromages blancs à différentes teneurs en matière grasse, de grandes différences interindividuelles ont aussi été observées. Une ANOVA produit + groupe de sensibilité + sensibilité \* produit a montré un effet produit et un effet groupe de sensibilité mais pas d'interaction groupe de sensibilité \* produit. Ainsi, l'effet de la matière grasse est le même quel que soit le groupe de sensibilité. Les sujets les plus sensibles au gras ont un niveau de tapissage du produit en bouche et une quantité de lipides résiduels associés moins important que les sujets peu sensibles (Figure 39a et 39b).

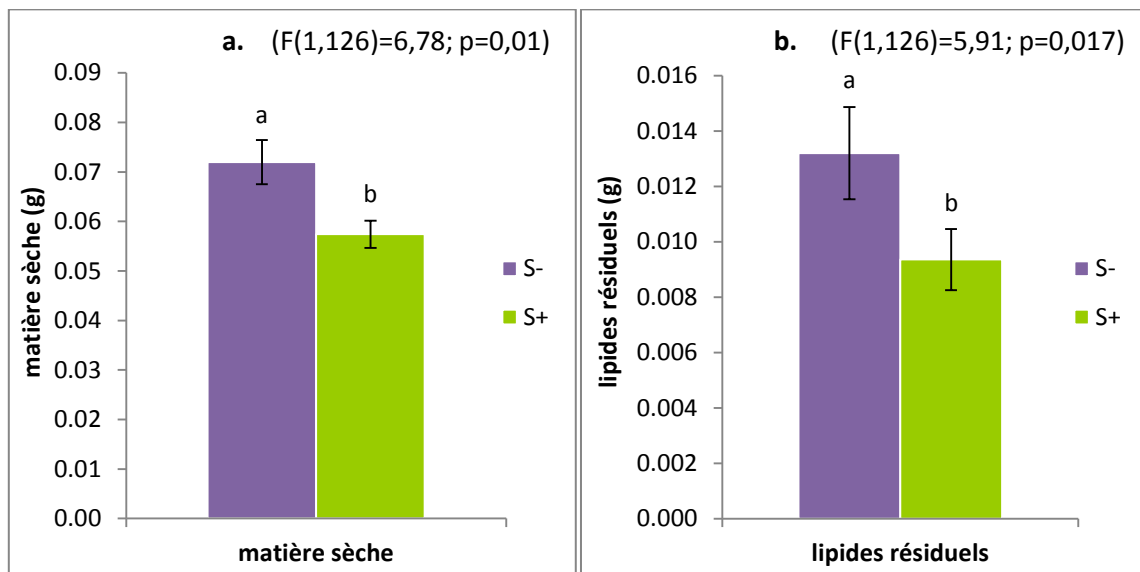
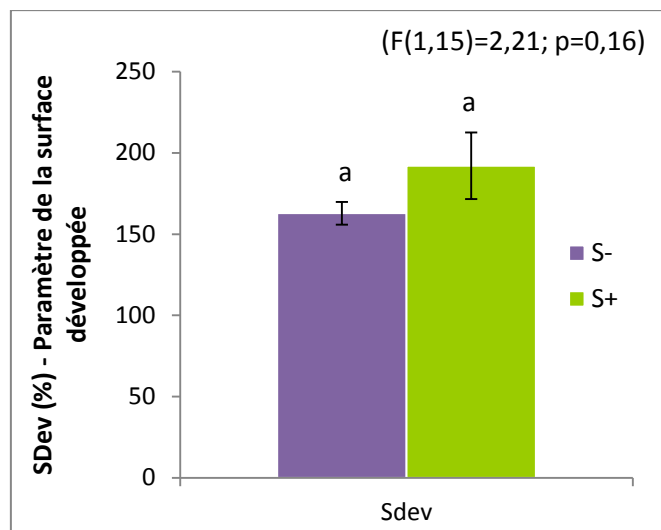


Figure 39 : Matière sèche (a.) et lipides résiduels (b.) des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6. Modèle de l'ANOVA : a. Matière sèche = sensibilité + % de matière grasse + répétition + sensibilité\*%de matière grasse, b. Lipides résiduels = sensibilité + % de matière grasse + répétition + sensibilité\*%de matière grasse, complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

### 7.2.7. Rugosité de la langue

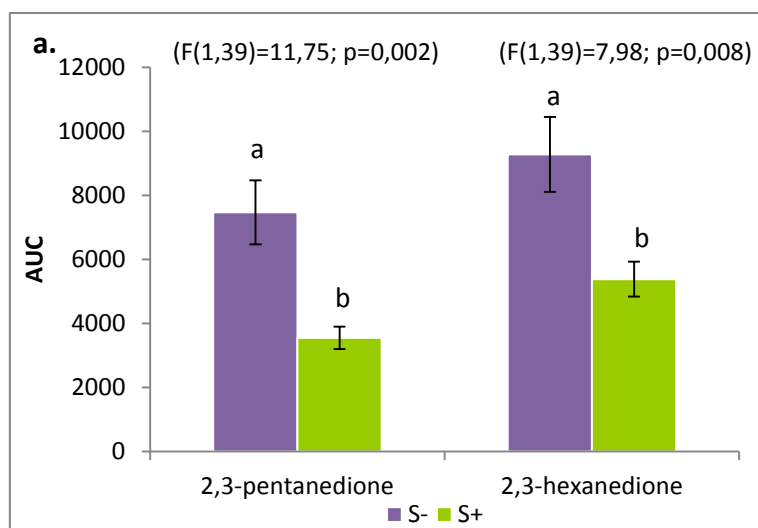
Les résultats de rugosité de la langue sont en cours de traitement. A ce jour, nous disposons de la surface développée de la rugosité (SDev en %). Si l'on imagine un papier plié en accordéon, Sdev est le rapport entre la longueur de la feuille ainsi plié et la longueur de la feuille quand elle est totalement dépliée. Ce paramètre n'est pas donc pas corrélé à l'amplitude des creux puisque l'on peut avoir Sdev identique avec des villosités très creuses mais peu nombreuses et des villosités peu creuses mais très nombreuses. Une fois de plus, la taille des deux groupes S+ et S- étant faible, nous n'observons que des tendances (Figure 40), ( $p > 0,05$ ).



**Figure 40 : SDev (%) - paramètre de la surface développée des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=9, Sujets très sensibles (S+) n=7. Modèle de l'ANOVA : SDev(%) = sensibilité complété par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).**

### 7.2.8. Libération des composés d'arôme en bouche

L'étude de la libération des arômes montre que, quel que soit le composé suivi, l'aire sous la courbe (Figure 41a), l'intensité maximale (Figure 41b) et le temps mis pour atteindre cette intensité maximale (Figure 41c) sont significativement plus élevés pour les sujets les moins sensibles que pour les sujets les plus sensibles. Par ailleurs, la Figure 41d qui représente la pente de libération ( $I_{max}/t_{max}$ ) est plus grande pour les sujets peu sensibles.



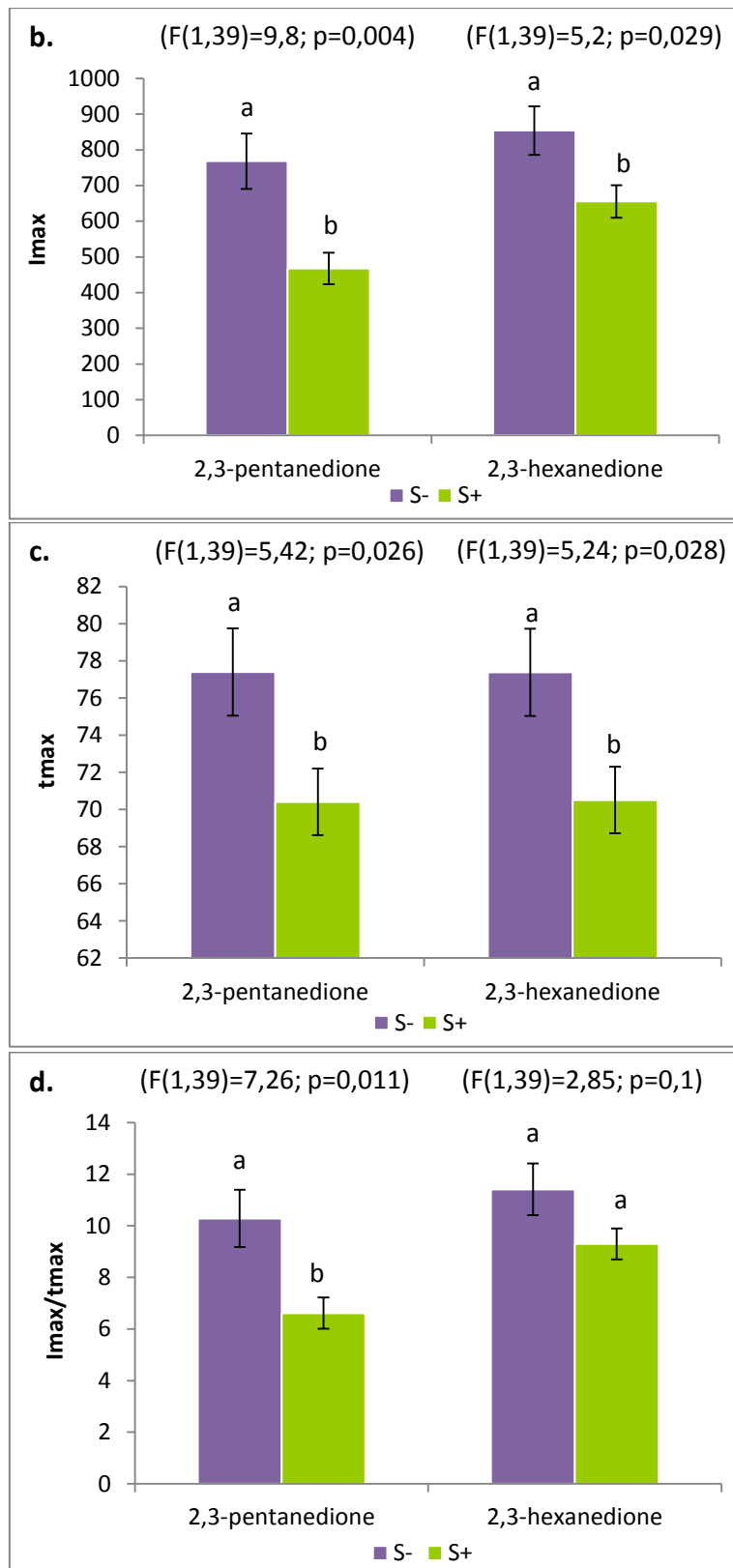


Figure 41 : Aire sous la courbe = AUC (a.), Intensité maximale = I<sub>max</sub> (b.) et Temps pour atteindre l'intensité maximale = t<sub>max</sub> (c.) des sujets (moyennes ± SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6. Modèle de l'ANOVA : a. Aire sous la courbe (AUC)= sensibilité + répétition, b. Intensité maximale (I<sub>max</sub>)= sensibilité + répétition, c. Temps pour atteindre l'intensité maximale (t<sub>max</sub>)= sensibilité + répétition, d. I<sub>max</sub>/t<sub>max</sub>=sensibilité + répétition, complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).

Ainsi, les sujets les moins sensibles libèrent les composés d'arôme en plus grande quantité et plus rapidement que les sujets les plus sensibles.

### 7.2.9. Discussion

Le profil sensoriel a mis en évidence les descripteurs qui permettent la discrimination sensorielle des produits et confirmé l'implication de différentes modalités sensorielles dans la perception du gras.

L'augmentation de la teneur en matière grasse a été associée à une intensité plus élevée du descripteur « arôme de crème », ce qui laisse supposer une implication de l'olfaction dans la perception du gras. Partant de ce constat, notre hypothèse a été que les sujets les plus sensibles au gras libèrent mieux les arômes connotés « gras » que les sujets les moins sensibles. Cependant, nos données sont en contradiction avec notre hypothèse de départ. En effet, les molécules d'intérêt (2,3-pentanedione et 2,3-hexanedione) sont présentes dans l'air expiré en quantité environ deux fois plus importante chez les sujets peu sensibles comparés aux sujets sensibles. Des travaux ont montré l'implication des paramètres oraux comme l'activité masticatoire, le comportement respiratoire et la salivation sur la libération des composés d'arôme (Pionnier et al., 2004a, Haahr et al., 2004). Au contact de la salive, l'aliment va s'hydrater et libérer des composés odorants et sapides. De grandes variations du flux salivaire ont été observés entre les individus (Neyraud et al., 2003, Pionnier et al., 2004a, Engelen et al., 2005, Tournier et al., 2014). Selon Haahr et al. (2004), l'augmentation du flux salivaire durant la consommation de chewing-gum permettrait de retenir les composés d'arôme dans la phase aqueuse. En accord avec l'étude menée par Pionnier et al. (2004a) nous n'avons observé aucun lien entre le flux salivaire et la libération des arômes. Bien que le flux salivaire tende à être plus important chez les sujets sensibles, cette différence n'est pas significative. De façon similaire, la viscosité de la salive des sujets peu sensibles n'a pas été trouvée significativement différente de celle des sujets sensibles. Cependant, la portée de ces résultats pourrait être limitée dans notre étude par l'effectif limité et par la mesure de ces paramètres qui n'a été effectuée qu'une fois. Par ailleurs, le flux salivaire a été mesuré au repos et n'est peut-être pas représentatif du flux salivaire au cours de la consommation d'un fromage blanc. De plus, la différence de quantité d'arôme libéré n'est peut-être pas le paramètre le plus pertinent à étudier en termes de libération. Il aurait sans doute été plus intéressant de mesurer la différence de libération entre un fromage blanc à 0% et un fromage blanc à 7,8% chez les différents groupes de sujets. C'est peut être cet écart qui n'est pas détectable chez les sujets les moins sensibles et qui le serait chez les sujets les plus sensibles. Néanmoins, d'une part ces mesures de libération *in vivo* étant lourdes il n'a pas été possible de les faire pour les différents fromages blancs étudiés, d'autre part, le seuil de détection des différentes molécules du projet

QualigrasPhy a été mesuré en dehors de ce travail de thèse, mais n'ont pas été montrés comme significativement différents entre nos groupes de sensibilité.

Au flux salivaire s'ajoute le flux respiratoire qui permet de transporter les composés d'arôme de la cavité buccale vers la cavité nasale. Pionnier et al. (2004a) ont mis en évidence l'importante variabilité interindividuelle du flux respiratoire et émettent l'hypothèse que ce flux pourrait contribuer aux différences de libération aromatique. De plus il a été montré qu'un flux respiratoire important augmente la quantité de composés d'arôme dans l'air expiré contrairement au flux respiratoire plus faible qui permettrait d'augmenter la perception olfactive (Hanaoka et al., 2001). Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différences du flux respiratoire entre nos deux groupes extrêmes. Cependant, le flux respiratoire se décompose en fréquence respiratoire et volume respiratoire dit volume courant. En étudiant ces paramètres individuellement, nous avons observé une fréquence respiratoire inférieure et un volume courant supérieur chez les sujets les plus sensibles au gras. Selon Hanaoka et al. (2001), l'augmentation du flux respiratoire provoquerait une augmentation de la concentration des composés d'arôme dans l'air expiré. Plus récemment, Doyennette et al (2014) ont suggéré que la fréquence respiratoire aurait un effet négatif sur la concentration des composés d'arôme dans le nez car elle favorisait leur élimination (via l'air expiré). Dans le cadre de notre étude, les sujets peu sensibles qui respirent peu profondément mais plus rapidement, élimineraient donc les arômes en quantité plus importante. Ainsi, le comportement respiratoire des sujets peu sensibles limiterait la quantité des composés odorants présents dans la cavité nasale. Par ailleurs, les sujets peu sensibles possèdent un volume oral plus important que les sujets sensibles ce qui pourrait favoriser la dilution des composés dans la cavité orale.

L'augmentation de la teneur en matière grasse a également été associée à une intensité plus faible du descripteur « amer ». Des travaux ont montré que le nombre de papilles fongiformes pourrait être à l'origine des différences de sensibilité. En effet, les sujets les plus sensibles à l'amer et au sucré possèderaient plus de papilles que les sujets peu sensibles (Delwiche et al., 2001, Segovia et al., 2002). De ce fait, nous avons supposé que nos sujets les plus sensibles au gras possèderaient plus de papilles fongiformes que nos sujets peu sensibles. Les résultats de notre étude n'ont cependant pas montré de différences significatives entre nos deux groupes. Nos résultats sont en accord avec ceux de Yackinous et al. (2001) qui n'ont pas montré de liens entre la quantité de papilles et la perception du gras, du salé et du sucré. D'autres auteurs ont observé une élévation du seuil de perception de la matière grasse dans le lait et le mélange lait/crème chez les sujets possédant plus de papilles fongiformes (Nachtsheim et Schlich 2013 et 2014). Cette discordance dans les résultats peut s'expliquer par l'effectif plus important dans ces études (plus de 100 sujets). Nous pouvons tout de même observer que nos résultats vont dans le même sens que ces auteurs avec un

nombre de papilles fongiformes légèrement supérieur chez les sujets sensibles. Un effectif plus conséquent aurait peut-être permis de rendre cette tendance significative.

Enfin, l'augmentation de la teneur en matière grasse dans le fromage blanc a été caractérisée par une intensité du descripteur « film de gras » plus importante. Ce descripteur qui correspond à la quantité de lipides résiduels associée au tapissage buccal pourrait intervenir dans la composante de texture de la perception du gras. Partant de ce constat, nous avons émis l'hypothèse que ce tapissage pourrait être différent entre les groupes de sensibilité au gras. Nos résultats montrent effectivement que les sujets peu sensibles ont un tapissage en bouche plus important que les sujets sensibles. Nous avons montré que le volume oral des sujets sensibles est inférieur à celui des sujets peu sensibles (Figure 33). Cette différence de volume pourrait être à l'origine de la réduction du tapissage en bouche des sujets sensibles. Cependant, lors de la consommation de produits semi-solides comme le fromage blanc, le produit résiduel est principalement retenu sur la langue, entre les dents et dans le creux du palais. De ce fait, il serait intéressant de rapporter nos données à la surface de la bouche et non pas au volume buccal. Nous pouvons supposer que les sujets peu sensibles, qui retiennent mieux le produit en bouche après déglutition, pourraient éprouver des difficultés à rincer leur bouche entre deux produits et donc à percevoir des différences de gras. Les différences de tapissage en bouche pourraient provenir des différences de rugosité de la langue. Une langue plus rugueuse retiendrait plus de produit qu'une langue lisse. Enfin, la rétention des lipides pourrait provenir de la rugosité de la langue engendrée par la présence des papilles gustatives (Pivk et al., 2008). Selon ces auteurs, les cavités situées entre les papilles forment des sites hydrophobes qui peuvent piéger les lipides. Une augmentation du nombre de papilles gustatives augmenterait alors la surface hydrophobe.

Enfin, comme décrit dans la littérature, il aurait été intéressant de mesurer la libération aromatique des produits simultanément à des tests sensoriels pour connaître le rôle de chacune des molécules sur la perception sensorielle. Malheureusement, l'appareil n'a pas été assez sensible pour mesurer la libération des composés *in vivo* du fromage blanc au cours de la consommation.

#### 7.2.10. Conclusion

Au travers de cette partie, nous avons essayé de chercher l'origine de la variabilité interindividuelle de la perception du gras en nous intéressant aux différentes modalités sensorielles qui interviennent dans la perception du gras (Tableau 10). Nous avons montré que les sujets peu sensibles ont un comportement respiratoire complètement différent des sujets sensibles. En effet, les sujets peu sensibles qui respirent rapidement et peu profondément semblent favoriser l'élimination des

composés d'arôme par l'air expiré. Si tel est le cas, ces molécules ne pourront pas s'accumuler au niveau de la cavité nasale. Le flux salivaire et la viscosité salivaire sont deux éléments qui peuvent favoriser la rétention des composés d'arôme. Cependant, ces paramètres non pas été trouvés significativement différents entre nos groupes. Bien que les sujets sensibles possèdent un plus grand nombre de papilles fongiformes, ce nombre n'a pas été significativement différent des sujets peu sensibles. Augmenter le nombre de sujets par groupe de sensibilité permettrait donc de mieux conclure sur la composante gustative. Enfin, le tapissage en bouche qui a été plus important chez les sujets peu sensibles ne leurs permet probablement pas de se rincer intégralement la bouche entre deux échantillons. La rugosité de la langue pourrait être à l'origine des différences de tapissage en bouche.

Tableau 10 : Résumé des paramètres étudiés (en gras le paramètre étudié est significativement supérieur).

Paramètre étudié	Sujet S-	Sujet S+
Volume oral (cm <sup>3</sup> )	<b>20,6</b>	14,7
Flux respiratoire (L/sec)	0,09	0,07
Fréquence respiratoire (cycle/min)	<b>9,1</b>	3,8
Volume courant (L)	0,46	<b>0,55</b>
Flux salivaire (mL/min)	0,65	0,71
Viscosité salivaire (mPA/sec)	2,45	1,56
Nombre de papilles fongiformes	3,8	4
Matière sèche (g)	<b>0,072</b>	0,057
Lipides résiduels (g)	<b>0,013</b>	0,009
Sdev (%)	163	192
AUC (2,3-pentanedione/ 2,3-hexanedione)	<b>7468/ 3553</b>	9274/ 5381
Imax (2,3-pentanedione/ 2,3-hexanedione)	<b>768/ 854</b>	467/ 655
Tmax (2,3-pentanedione/ 2,3-hexanedione)	<b>77/ 77</b>	70/ 70

## 8. Conclusion du chapitre

La réduction de la matière grasse dans les saucisses par ajout de fibre de Psyllium sans changement de la sensation de gras est possible, à condition que les saucisses soient consommées normalement (c'est à dire sans pince-nez) ce qui met en évidence le rôle de l'olfaction dans la perception du gras



de ces saucisses. Pourtant, la composition aromatique des saucisses avec fibre Psyllium n'est pas différente de la composition aromatique des saucisses à 15% de matière grasse. Si la composition aromatique n'est pas différente, nous supposons que c'est la libération des composés d'arômes qui est différente entre ces deux saucisses (15% de matière grasse avec et sans Psyllium) et qui expliquerait la perception plus importante du gras dans les saucisses avec Psyllium.

Dans le fromage blanc, l'ajout de différents composés d'arôme seuls, n'a pas permis de compenser sensoriellement la réduction de la matière grasse.

Le profil sensoriel réalisé sur les fromages blancs à différentes teneurs en matière grasse a montré que la teneur en matière grasse et l'intensité de l'arôme crème étaient positivement liés. Ce résultat peut s'expliquer par la présence de composés d'arôme à connotation grasse en plus grande quantité dans le fromage blanc à 7,8% de matière grasse que celui à 0% de matière grasse. La réduction de la matière grasse a augmenté l'amertume et les forces de friction, tout en diminuant la viscosité. D'après nos résultats, l'augmentation de la teneur en matière grasse diminue l'amertume et augmente les forces de frictions, le tapissage en bouche et plus précisément à la quantité de lipide résiduelle. Plus la teneur en matière grasse du produit consommé diminue, plus le film de gras mesuré instrumentalement mais aussi perçu diminue et plus les récepteurs aux saveurs et donc à l'amertume sont accessibles.

Nous avons mis en évidence une grande variabilité interindividuelle dans la perception du gras des fromages blancs et identifié deux groupes de sujets bien distincts, l'un étant très sensible au gras et l'autre très peu sensible au gras. D'après nos résultats, la différence de sensibilité entre ces deux groupes de sujets ne vient ni du flux salivaire, ni de la viscosité de la salive, ni du nombre de papilles gustatives. Par contre, elle peut s'expliquer par un tapissage plus important pour les sujets peu sensibles qui poserait des problèmes de nettoyage. Ce tapissage plus important proviendrait peut être d'une rugosité de la langue plus importante. De plus, ces sujets peu sensibles respirent rapidement et peu profondément ce qui laisserait peu de temps aux molécules volatiles pour atteindre les récepteurs olfactifs, malgré une libération d'arôme plus importante. La présence de ces molécules en plus forte concentration dans le nez pourrait d'ailleurs être à l'origine d'une autre différence entre les sujets sensibles et les sujets moins sensibles au gras. En effet, la concentration plus importante en composés d'arôme pourrait favoriser leur prise en charge par les EMOs (enzyme du métabolisme des odorants) et produire de nouveaux signaux olfactifs. Cette hypothèse fera l'objet du chapitre 3.



## ***Chapitre 3 : métabolisme de la muqueuse olfactive***

Le chapitre précédent montre que de nombreux éléments pourraient être à l'origine de la variabilité interindividuelle de la perception du gras. Par ailleurs, nous avons confirmé l'implication de la dimension olfactive dans la perception du gras. Aussi, nous émettons l'hypothèse que les arômes à connotation « gras » libérés par les aliments lors de leur consommation pourraient être métabolisés par les enzymes de la muqueuse olfactive, et donner naissance à d'autres composés d'arôme qui pourraient contribuer à la sensation de gras ou la moduler. L'état de l'art montre que seules quelques études menées chez le rat, se sont intéressées aux métabolites produits par les enzymes du métabolisme des odorants et leur impact sur la perception olfactive. Dans ce contexte, nous avons, au travers des résultats présentés dans ce troisième chapitre, essayé d'approfondir les connaissances sur le métabolisme de la muqueuse olfactive du rat, puis d'étudier son existence chez l'Homme et son rôle potentiel dans l'olfaction humaine.

## **1. La muqueuse olfactive du rat, un tissu qui produit des métabolites issus de molécules odorantes**

De par leur forte expression dans la muqueuse olfactive, les enzymes du métabolisme des odorants (EMOs) peuvent avoir un rôle protecteur vis-à-vis du tissu olfactif. Au travers de la synthèse de métabolites volatils odorants, elles pourraient moduler la perception olfactive. En effet, les EMOs pourraient jouer un rôle en biotransformant les composés odorants afin d'éviter la saturation du système olfactif ou l'exposition prolongée à de trop fortes concentrations (Heydel et al., 2013). En raison de leur petite taille et de leur propriété hydrophobe, les molécules odorantes peuvent être de potentiels substrats pour ces enzymes (Legendre et al., 2014, Faure et al., 2016). Cependant, comme nous l'avons vu au premier chapitre, peu d'études se sont intéressées au métabolisme des odorants par les EMOs.

Dans l'objectif d'étudier le métabolisme des molécules odorantes, une première méthode d'analyse *ex-vivo* proche des conditions physiologiques a été mise au point en Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) couplée à la technique d'extraction « headspace » (Faure et al., 2016). Les résultats de cette étude ont révélé la formation d'un métabolite volatil (l'éthanol) après l'injection d'un odorant (l'acétate d'éthyle) sous forme gazeuse dans l'espace de tête d'une muqueuse olfactive prélevée sur le lapereau. Cette technique présente l'avantage d'utiliser les molécules odorantes sous forme gazeuse et de travailler avec des muqueuses olfactives intactes ce qui permet de conserver la structure particulière de ce tissu. Des essais préliminaires menés sur la MO de rat ont conduit aux mêmes résultats. Toutefois, des contraintes techniques liées à cette méthode appliquée sur des cinétiques relativement longues (30 minutes) ne permettent pas de suivre l'évolution du

métabolisme durant les 5 premières minutes de contact entre l'odorant et la muqueuse olfactive. Pour que ce mécanisme de biotransformation soit efficace physiologiquement, il doit être très rapide voire instantané. Aussi, nous avons émis l'hypothèse d'une action très rapide des EMOs dès la mise en contact avec l'odorant. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons été amenés à mettre au point une nouvelle méthode d'étude du métabolisme olfactif à des temps inférieurs à 5 minutes en utilisant une méthode de Spectrométrie de Masse en injection directe : la Spectrométrie de Masse par Réaction de Transfert de Proton (PTR-MS).

### 1.1. Etude du métabolisme de la muqueuse olfactive du rat par PTR-MS en temps réel et de manière discontinu (article 3)

#### **Résumé de la publication :**

La muqueuse olfactive (MO) est capable de métaboliser des composés odorants par différents mécanismes enzymatiques. Ces composés odorants, conduisent à la production de métabolites qui peuvent être eux-mêmes odorants ou non. Des études préliminaires menées par CPG « headspace » ont révélées la formation de métabolites volatils après injection de molécules odorantes dans l'espace de tête situé au-dessus d'une muqueuse olfactive de rat fraîchement disséquée. Cependant, cette méthode ne permettait pas de suivre le métabolisme de la MO durant les 5 premières minutes de contact entre l'odorant et la muqueuse olfactive.

Afin d'approfondir les connaissances sur le métabolisme des EMOs dans la muqueuse olfactive, cette étude a pour objectif d'étudier la cinétique de l'activité métabolique des odorants chez le rat durant les 5 premières minutes de contact entre l'odorant et la muqueuse olfactive, dans le but de la relier au processus physiologique olfactif humain.

Pour ce faire, une méthode innovante a été mise au point afin de mesurer les composés odorants volatils en temps réel par spectrométrie de masse (PTR-MS) après exposition d'une molécule odorante dans l'espace de tête d'une MO de rat fraîchement disséquée.

En utilisant le PTR-MS, nous avons été capables, d'étudier les premiers instants du processus enzymatique du métabolisme de la MO du rat. L'acétate d'éthyle, molécule qui a servie de molécule odorante modèle, a été rapidement métabolisé par la MO du rat pour produire, en moins de 30 secondes, son métabolite volatil qui est l'éthanol.

Les résultats de cette étude suggèrent fortement un rôle potentiel des EMOs dans la perception olfactive.

## Real-time monitoring of the metabolic capacity of ex vivo rat olfactory mucosa by proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS)

Rachel Schoumacker<sup>1,2,3</sup> · Aline Robert-Hazotte<sup>1,2,3</sup> · Jean-Marie Heydel<sup>1,2,3</sup> · Philippe Faure<sup>1,2,3</sup> · Jean-Luc Le Quéré<sup>1,2,3</sup>

Received: 27 October 2015 / Revised: 16 December 2015 / Accepted: 21 December 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Olfactory mucosa (OM) can metabolise odorant volatile organic compounds through various enzymatic mechanisms to produce odorous or non-odorous metabolites. Preliminary ex vivo studies using headspace-gas chromatography (HS-GC) revealed the formation of metabolites when odorant molecules were injected in the headspace above a fresh explant of rat olfactory mucosa. However, this method did not allow accessing the data during the first 5 min of contact between the odorant and the mucosa; thus limiting the olfactory biological significance. Using a direct-injection mass spectrometry technique with a proton transfer reaction instrument (PTR-MS), we have been able, for the first time, to investigate the first moments of the enzymatic process of the metabolic capacity of ex vivo rat olfactory mucosa in real time. Using ethyl acetate as a model volatile odorous substrate, we demonstrated here for the first time that this odorant could be metabolised by an ex vivo olfactory mucosa within seconds, producing ethanol as metabolite.

**Keywords** PTR-MS · Olfaction · Metabolite · Rat · Ethyl acetate · XMEs

Parts of this work were presented as a poster at the 20th International Mass Spectrometry Conference in Geneva, Switzerland.

✉ Jean-Luc Le Quéré  
jllequere@dijon.inra.fr

<sup>1</sup> CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA), F-21000 Dijon, France

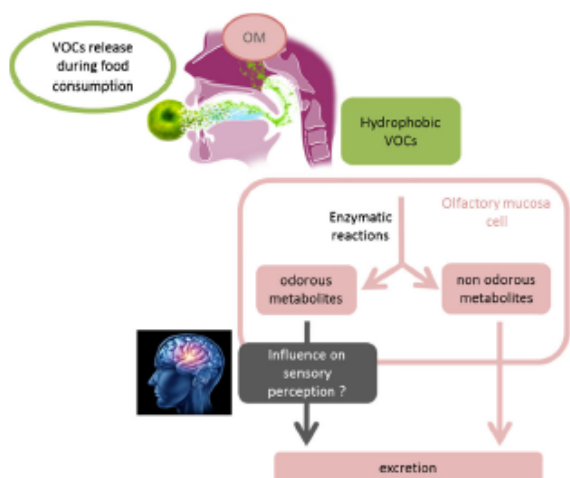
<sup>2</sup> INRA, UMR1324 CSGA, F-21000 Dijon, France

<sup>3</sup> Université de Bourgogne, UMR CSGA, F-21000 Dijon, France

### Introduction

In animals, olfaction is an essential sense to find food and to identify congeners or predators. Humans as well as animals detect and discriminate thousands of odorous volatile organic compounds (VOCs) of various chemical classes [1]. Following inhalation, to be perceived, odorous compounds need first to reach and bind their olfactory receptor proteins located on the cilia of olfactory sensory neurons in the olfactory mucosa (OM). This binding triggers the transduction of the olfactory signal [2]. Subsequent integration of the signal in the olfactory bulb and cerebral cortex allows olfactory perception to happen. VOCs, as other potentially toxic xenobiotics are mainly hydrophobic molecules that easily penetrate into OM cells where xenobiotic metabolising enzymes (XMEs) participate in their clearance from the olfactory tissue. This major detoxification process (occurring in the liver for the main part) is organised in three principal enzymatic steps catalysing the biotransformation of the xenobiotic in hydrophilic inactivated metabolites prompt to be eliminated. It has been shown that XMEs, present in high amount in OM, are involved in olfactory signal termination by metabolising odorant molecules, avoiding receptor saturation and thus olfactory sensitivity alteration [3–5]. Interestingly, it has been shown that the enzymatic conversion of odorants also occurs in the nasal mucus (aqueous layer of the OM) [6]. Therefore, if the synthesized metabolites are volatile and odorous, we can hypothesise that these metabolites could modify olfactory detection and be implied in overall aroma sensory perception during the course of food consumption in humans (Fig. 1).

The headspace-gas chromatography (HS-GC) method is frequently employed to analyse volatile compounds as a standard method. This technique is relatively simple and sensitive and allows separating and quantifying the different molecules. Ex vivo HS-GC methodology was initially developed to study



**Fig. 1** Production of odorous metabolites by XMEs, and their hypothetical role in sensory perception during food consumption

the metabolism of toxic VOCs by rat liver microsomes [7] and by rat OM microsomes [8]. We recently adapted and automated this method to analyse odorant metabolism in OM [9]. This *ex vivo* study revealed the formation of a volatile metabolite (ethanol) when the odorant ethyl acetate (EA) was injected in the headspace above a fresh explant of rabbit OM together with the significant decrease of the initial EA probably by the action of carboxylesterases [9]. Kinetics of apparition of the metabolite and concomitant disappearance of the primary odorant could be measured. This method permitted highly reproducible olfactory metabolism analysis using a regular GC equipped with a headspace autosampler. Preliminary experiments conducted with fresh explant of rat OM revealed the same results. However, due to technical constraints, this HS-GC method did not allow to access the data during the first minutes of contact between the odorant and the mucosa. This analysis blind spot makes the method not suitable for accessing the olfactory enzymatic process in the time course of physiological events. Direct-injection mass spectrometry is a technique that allows analysis of biological events in real time [10]. Thus, atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry (APCI-MS) was used for the *in vitro* analyses of the binding of odorants to a rat odorant-binding protein deposited in a fused silica capillary [11–13]. Proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) is also a dedicated technique for direct, rapid and sensitive analysis of VOCs in real time [14]. PTR-MS through precise control of the primary reactant ions may be considered a quantitative technique [14].

The present work aims to study the first moment of the kinetics of the odorant metabolism activity to put it in perspective with the dynamic of the olfactory physiological process. For this purpose, we set up a novel method aimed at measuring VOCs (odorants and their metabolites) in real time by PTR-MS after an exposure of odorant molecules to fresh

explant of rat OM. Metabolism kinetics of EA was explored as odorant target since its transformation involving carboxylesterase enzymes leading to ethanol is well characterised [9, 15, 16].

## Materials and methods

### Chemicals

Ethyl acetate was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). D8-ethyl acetate was purchased from Cluzeau-Info-Labo (CIL; Ste Foy la Grande, France). Mucin and bovine serum albumin were from Sigma-Aldrich.

### Rat model

Male Wistar rats (200–200 g; Harlan, Gannat, France) were hosted in an exempt organisms pathogen-specific (E.O.P.S.) animal room of the animal facility of CSGA (12 h light–12 h dark cycles, 50 % of humidity, temperature 22 °C) during 7 weeks. They were raised in polypropylene cages, fed *ad libitum* with standard food from Dietex (Argenteuil, France) and water. After decapitation of the animals, careful OM dissection was performed to avoid contamination with respiratory epithelium. The freshly removed OM was immediately placed in a 20-mL vial sealed with a Teflon-lined stopcock. We used a total of 13 rats for *ex vivo* measurements. All the experiments were conducted with the agreement of the Ethical Committee for Animal Experimentation (Dijon, France).

### PTR-MS

Freshly dissected rat olfactory mucosa was placed convoluted upwards into the 20-mL vial. The time between dissection and analyses was kept as short as possible to reduce the loss of metabolism activity. This vial was then connected to a PTR-MS time-of-flight (ToF) instrument (PTR-ToF-MS 8000, Ionicon Analytik, Innsbruck, Austria) via a polyether ether ketone (PEEK) capillary (dimension = 1 mm internal diameter, 1 m long, external diameter 1/16 in.) inserted in a heated transfer line maintained at 110 °C. The headspace was admitted in the instrument with a flow rate fixed at 40 mL/min. All the experiments were conducted at room temperature in the air-conditioned room (22 ± 1 °C) where the PTR-MS instrument was operated. The PEEK tube was linked to the vial via a three-way Luer valve, which allowed closing the vial in order not to exhaust the headspace, while ambient air is admitted continuously to the instrument. The scan speed was 108 ms for a mass range  $m/z$  0–250. The primary ions  $m/z = 19.018$  [ $\text{H}_3\text{O}^+$ ] and  $m/z = 37.028$  [ $(\text{H}_2\text{O})_2\text{H}^+$ ] were systematically monitored following their respective  $^{18}\text{O}$  isotopic contributions at  $m/z$  21.022 [ $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ ] and  $m/z$  39.032 [ $\text{H}_2\text{O}^{18}\text{OH}_3^+$ ]

to check instrument performances and to detect cluster formation. The mass calibration was realised following the peaks of known ions ( $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ ,  $m/z = 21.022086$ ;  $\text{NO}^+$ ,  $m/z = 29.997440$ ; protonated acetone,  $m/z = 59.049141$ ) present at any time in spectra. The intra-measurement variations of the  $\text{H}_3\text{O}^+$  primary ion intensity (monitored on  $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ ) did not exceed 5–6 %, and no depletion of the main reactant ion was noticeable. During the acquisition, we focused on specific masses:  $m/z = 47.047$  (protonated ethanol),  $m/z = 89.059$  (protonated EA) and  $m/z = 90.063$  (protonated  $^{13}\text{C}$ -ethyl acetate) for experiments using ethyl acetate and  $m/z = 52.080$  (protonated  $^2\text{H}_5$ -ethanol),  $m/z = 97.110$  (protonated  $^2\text{H}_8$ -ethyl acetate) and  $m/z = 98.113$  (protonated  $^{13}\text{C}^2\text{H}_8$ -ethyl acetate) for the investigation of D8-ethyl acetate. Because of the  $m/z = 89.059$  and  $97.110$  frequent signal saturation at the detector, quantitative data were determined for their respective  $^{13}\text{C}$ -analogues at  $m/z = 90.063$  and  $98.113$  ions. The measured gas-liquid partition coefficient of ethyl acetate ( $K = 0.0125$ , [9]) allowed to determine the respective EA concentrations in aqueous and gas phases; 500  $\mu\text{L}$  of gaseous ethyl acetate at 20 mg/L was injected with an automatic syringe in the headspace above the OM to obtain a final gaseous concentration of 0.5 mg/L in the vial. After injection, the 3-way Luer valve was opened for 1 s at different times (10, 30, 60, 120, 180, 240 and 300 s) in order to allow sampling the headspace. All analyses were carried out with a drift tube pressure of 2.3 mbar, a drift tube temperature of 110 °C and a drift voltage of 350 V giving an electric field strength to number density ratio  $E/N$  of 90 Td (1 Td =  $10^{-17} \text{cm}^2 \text{V}$ ) and  $\text{H}_3\text{O}^+$  as reagent ion. All the spectra were background subtracted using the first 20 s of each acquisition before injection of EA took place. As calibration curves were not produced, the data were expressed in normalised CPS (nCPS) using primary ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})$  as recommended by the manufacturer to account for primary ions fluctuations using the software PTR-MS Viewer ver 3.1.0.28.

### Controls

Different controls were realised. A blank was obtained using an empty vial (without OM) in which the same amount of ethyl acetate was injected allowing measurement of the headspace exhaustion in the absence of adsorbing biological material. A control was obtained with a vial containing mucin and bovine serum albumin (BSA) that mimicked the non-enzymatic protein part of OM and allowed to check for adsorption phenomenon of the volatile compounds. Finally, another control was obtained using a vial containing mucosa previously heated at 80 °C for 15 min and cooled down at room temperature prior to the analysis in the aim of denaturing the enzymes that allowed to check for adsorption on the tissue and to confirm the enzymatic nature of the reaction. The absence of any significant intrinsic metabolism was checked in

the headspace of a vial containing only OM. Controls using D8-ethyl acetate have also been done producing  $^2\text{H}_5$ -ethanol at  $m/z = 52.080$  in order to demonstrate that the main metabolite (ethanol) does not come from the environment but really from enzymatic metabolism involving olfactory mucosa. All the measurements were done at least in triplicate.

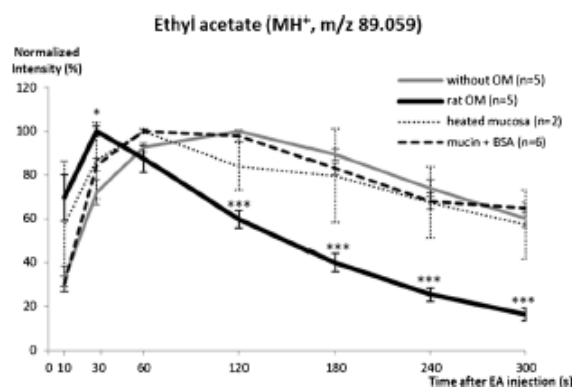
### Data analysis

For statistical analyses, data were averaged in available replicates and analysed using the Student's *t* test to compare the profile of the headspace content of the blank vial without OM to those of the determination vials. Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## Results and discussion

### Decrease of ethyl acetate in the headspace of the olfactory mucosa

To investigate the metabolic capacity of rat OM in the first moments of contact, the odorous molecule EA was injected above fresh explant of rat olfactory mucosa and several controls were done. Figure 2 shows the behaviour of EA ( $m/z = 89.059$ ) intensity calculated from the  $^{13}\text{C}$ -analogue intensity at  $m/z = 90.063$  in vials used with different conditions (see experimental part). To compare the data, the decrease of EA in the vials headspace was expressed as the normalised percentage of disappearance calculated for each sampling time (10, 30, 60, 120, 180, 240 and 300 s) from the maximum EA signal intensity obtained in each condition. From 0 to 60 s, in all the samples, the EA signal increased before reaching a maximum, and this was interpreted in terms of time to reach the equilibrium in the vial headspace after injection of the volatile EA. However, in the vial containing OM, the time to reach the maximum signal was shorter revealing a clear

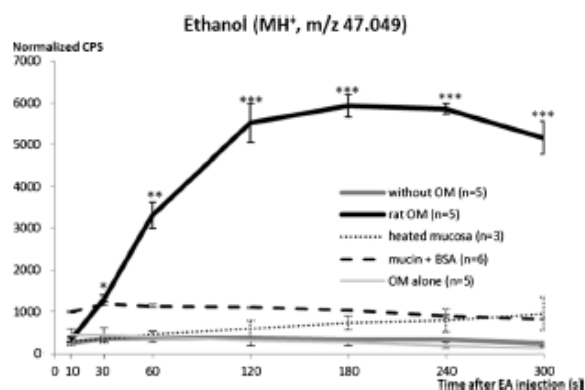


**Fig. 2** Behaviour of ethyl acetate after injection in vials containing rat OM and in different control vials. Data represent the mean  $\pm$  SEM from independent assays. The significant differences are noted \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$  (Student's *t* test) for data comparison



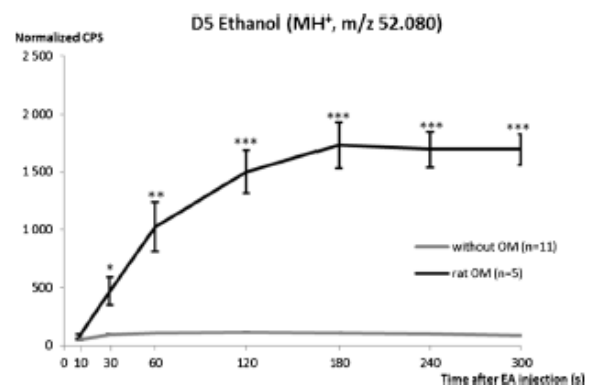
decrease of EA signal as early as 30 s, indicating that the equilibration time was cut short before the steady state was established due to the immediate metabolic activity. The decrease became very significantly different ( $p < 0.001$ ) from the blank control after 120 s. In fact, at 30 s, this signal decrease was significantly different ( $p < 0.05$ ) from the signal decrease on the blank control without OM representing headspace exhaustion. Using heated mucosa, for which the enzymes are inactivated, despite a significant lowered EA raw signal intensity (data not shown) presumably due to adsorption of the volatile compound in the OM tissue, the percentage of EA decrease was not found significantly different from the blank control decrease (Fig. 2) when their time-course releases were similar. The same applied for the mucin + BSA mixture aimed at mimicking the adsorption protein part of the mucosa (Fig. 2). All together, these results prove an enzymatic activity in degrading EA as early as 30 s, in our conditions, even before the headspace equilibrium was established.

**Detection of metabolites in the headspace of the olfactory mucosa** Even if a significant depletion of EA in the presence of OM due to enzymatic activity has been evidenced, another affirmation of metabolic activity of the OM would be to identify metabolites. Figure 3 shows the averaged ethanol (main EA volatile metabolite [15, 16]) profiles obtain for each experimental condition described above. Injection of EA above rat OM resulted in immediate appearance of ethanol ( $m/z = 47.049$ ) whose concentration significantly increases continuously to reach a plateau at 180 s suggesting that the enzymatic metabolism activity was limited by the disappearance of EA. Control samples omitting either OM ( $n = 5$ ) or EA ( $n = 5$ ) showed only a background signal of ethanol along all the acquisition time (background due to residual traces of ethanol in the room air that was not filtered). The average curve of the three replicates using heated mucosa showed a very slight increase of ethanol production suggesting there was still a



**Fig. 3** Ethanol detection in vials containing rat OM or mucin + BSA and in blank control exposed to EA. Data represent the mean  $\pm$  SEM from independent assays. The significant differences are noted \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$  (Student's *t* test) for data comparison

little enzymatic activity and therefore that the deactivation procedure was not completely efficient. The basic level of ethanol for the mucin + BSA controls was higher than the level of other blank curves, assuming a higher background ethanol level in room air during these acquisitions. However, as expected, no ethanol increase was noticed over time in this case. In conclusion, an immediate appearance of ethanol was observed that became significant as early as 30 s after the injection of EA in the vial containing active OM. To ensure that ethanol production resulted from the xenobiotic enzymes synthesis in the OM another control was performed which consisted in injecting deuterated (D8) EA ( $m/z = 97.110$ ) above rat OM. Figure 4 shows the immediate apparition of the deuterated D5-ethanol ( $m/z = 52.080$ ) in the presence of OM whose concentration significantly increases from 30 s to reach a plateau again at 180 s. Acetic acid should be the second volatile metabolite of EA produced by XMEs in the olfactory mucosa. However, it could not be followed because its molecular ion at  $m/z 61.028$  ( $m/z 65.053$  for the deuterated analogue) could not be distinguished from the McLafferty rearrangement fragment ion of EA found at the same  $m/z$  with an important abundance of 60 % relative to the base peak found at  $m/z = 89.059$  ( $m/z = 97.110$  for deuterated EA). The acetyl fragment at  $m/z 43.018$ , the main fragment ion of acetic acid in PTR-MS, was also indistinguishable from the fragment ion coming from this rearrangement ion, and its relative abundance was not found different in the experimental sample compared with the control sample without OM. Moreover, it is well known that the physiological role of acetyl-coA synthetase (EC 6.2.1.1) is to convert acetic acid to acetyl-coenzyme A to provide the cell with this two-carbon metabolite used in many anabolic and energy generation processes [17]. Concentration of free acetic acid (not metabolised) in cells is also maintained at a very low level to avoid damages caused by abrupt pH changes. Therefore, highly effective acetic acid metabolism may probably take place in rat OM



**Fig. 4** D5-ethanol production in vials containing rat OM or without OM and exposed to D8 EA. Data represent the mean  $\pm$  SEM from independent assays. The significant differences are noted \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$  (Student's *t* test) for data comparison

cells and explain the lack of signal also observed during our previous HS-GC analysis [9]. No other volatile compound was apparent and ethanol appeared as the only detectable metabolite, confirming our HS-GC results [9] and previous observations [15, 16].

## Conclusions

Using a direct-injection mass spectrometry technique with a proton transfer reaction instrument, we have been able for the first time to investigate the first moments of the enzymatic process of the metabolic capacity of ex vivo rat olfactory mucosa. Using ethyl acetate as model volatile odorous substrate, we have been able to monitor the kinetics of apparition of the volatile metabolites and concomitant progressive disappearance of the primary substrate during the first 5 min of the reaction. This is a clear improvement compared with the HS-GC method previously used [9], which did not allow investigating this time period. However, the developed methodology in headspace vials allowed only discrete sampling, while during the first 30–60 s after injection of the volatile substrate the headspace equilibrium was obviously not reached. The development of a continuous on-line methodology capable of true real-time monitoring is therefore desirable and will be the subject of our efforts in the near future. Nevertheless, the present results demonstrated for the first time that an odorant molecule can be metabolised by an ex vivo rat olfactory mucosa within seconds, producing an identified volatile odorous metabolite. These findings emphasise the potential role of XMEs in olfaction.

**Acknowledgements** Etienne Sémon, CSGA ChemoSens Platform, is thanked for technical assistance with the PTR-ToF-MS instrument. The Regional Council of Burgundy and the European Regional Development Fund are thanked for financial support (equipment funding), and the Carnot Institute Qualiment is thanked for supporting this research with INRA (QualigastPhy project and PhD grant to RS). RS thanks Giract for a Bursary Award obtained through its PhD Flavour Research Programme.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Gottfried J. Smell: central nervous processing. In: Hummel T, Welge-Lüssen A, editors. Taste and smell. An update. Advances in oto-rhino-laryngology. Basel: Karger; 2006. p. 44–69.
- Taylor AJ, Linforth RST, Harvey BA, Blake A. Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for in vivo analysis of volatile flavour release. *Food Chem.* 2000;71:327–38.
- Thiebaud N, Veloso Da Silva S, Jakob I, Sicard G, Chevalier J, Menetrier F, et al. Odorant metabolism catalyzed by olfactory mucosal enzymes influences peripheral olfactory responses in rats. *PLoS One.* 2013;8(3):e59547. doi:10.1371/journal.pone.0059547.
- Leclerc S, Heydel JM, Amosse V, Gradinaru D, Cattarelli M, Artur Y, et al. Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system: activity, expression and age-linked modifications of UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1, and relation to mitral cell activity. *Mol Brain Res.* 2002;107(2):201–13.
- Heydel JM, Coelho A, Thiebaud N, Legendre A, Le Bon AM, Faure P, et al. Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat Rec.* 2013;296(9):1333–45. doi:10.1002/ar.22735.
- Nagashima A, Touhara K. Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *J Neurosci.* 2010;30(48):16391–8.
- Hwang IY, Reardon KF, Tessari JD, Yang RSH. A gas-liquid system for enzyme kinetic studies of volatile organic chemicals. Determination of enzyme kinetic constants and partition coefficients of trichloroethylene. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(4):377–82.
- Hong JY, Wang YY, Bondoc FY, Yang CS, Lee M, Huang WQ. Rat olfactory mucosa displays a high activity in metabolizing methyl *tert*-butyl ether and other gasoline ethers. *Fundam Appl Toxicol.* 1997;40:205–10.
- Faure P, Legendre A, Hanser HI, Andriot I, Artur Y, Guichard E, et al. Odorant metabolism analysis by an automated ex vivo headspace gas-chromatography method. *Chem Senses.* 2015. doi:10.1093/chemse/bjv055.
- Biasioli F, Yeretzyan C, Märk TD, Dewulf J, Van Langenhove H. Direct-injection mass spectrometry adds the time dimension to (B)VOC analysis. *TrAC Trends Anal Chem.* 2011;30(7):1003–17.
- Yabuki M, Scott DJ, Briand L, Taylor AJ. Measuring dynamics of odorant binding to odorant binding protein under physiological conditions. In: Hofmann T, Meyerhof W, Schieberle P, editors. Advances and challenges in flavor chemistry & biology. Proceedings of the 9th Würzburg Symposium. Freising: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie; 2010. p. 33–8.
- Yabuki M, Scott DJ, Briand L, Taylor AJ. Dynamics of odorant binding to thin aqueous films of Rat-OBP3. *Chem Senses.* 2011;36(7):659–71. doi:10.1093/chemse/bjr037.
- Yabuki M, Portman K, Scott D, Briand L, Taylor A. DyBOBS: a dynamic biomimetic assay for odorant-binding to odor-binding protein. *Chemosens Percept.* 2010;3(2):108–17. doi:10.1007/s12078-010-9070-4.
- Lindinger W, Hansel A, Jordan A. On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) medical applications, food control and environmental research. *Int J Mass Spectrom Ion Process.* 1998;173:191–241.
- Gallaher EJ, Loomis TA. Metabolism of ethyl acetate in the rat: hydrolysis to ethyl alcohol in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975;34(2):309–13.
- Gupta RC. Carboxylesterases. In: Wexler P, editor. Encyclopedia of toxicology. 2nd ed. New York: Elsevier; 2005. p. 432–5.
- Starai VJ, Escalante-Semerena JC. Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming). *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(16):2020–30. doi:10.1007/s00018-004-3448-x.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois, à l'aide de la technique de PTR-MS (1) la biotransformation d'un odorant en présence d'une muqueuse olfactive de rat fraîchement disséquée et (2) la production immédiate de son métabolite volatil, significative dès le prélèvement à 30 secondes après la mise en contact de l'odorant avec la MO.

Le métabolisme d'autres molécules d'intérêt pour l'olfaction humaine a été étudié et fait l'objet de complément de résultats de cette partie. Ces résultats complémentaires ont deux objectifs : (1) valider la méthodologie présentée dans l'article 3 et (2) apporter une meilleure compréhension du métabolisme de molécules à connotation grasse. Les molécules utilisées pour ces résultats complémentaires sont la 2,3-pentanedione, la 2,3-hexanedione et la 2-acetoxy-3-butanone. La méthode de mesure du métabolisme dans la muqueuse olfactive du rat a été similaire à celle présentée dans l'article 3 ci-dessus.

### 1.2. Détermination du coefficient de partage gaz/liquide des molécules odorantes étudiées

Le coefficient de partage gaz/liquide est le coefficient correspondant à la répartition, à l'équilibre, du composé entre la phase liquide dans laquelle il est en solution (ici dans l'eau) et la phase gazeuse (Equation). Il doit être calculé afin de pouvoir déterminer précisément les concentrations en phase gazeuse qui seront mises en contact de la muqueuse.

$$K_{aw}^{\alpha} = \frac{C_a^{\alpha} \text{ (g/l)}}{C_w^{\alpha} \text{ (g/l)}} \quad \begin{array}{l} \alpha = \text{molécule} \\ a = \text{air} \\ w = \text{eau} \end{array}$$

**Equation : Formule du coefficient de partage.**

Ce coefficient est mesuré en faisant varier les concentrations de la molécule odorante étudiée dans un volume constant de la phase liquide.

Préalablement, des gammes d'étalonnages liquides ont été réalisées à 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 et 500 mg/L en injectant 5 µL de chaque point de gamme en CPG. Les courbes d'étalonnages représentant l'aire sous la courbe en fonction de la concentration de la molécule en solution ont été tracées pour chaque molécule (exemple Figure 42 pour la 2,3-pentanedione). Cette procédure permet la détermination de l'équation de la droite d'étalonnage pour chaque molécule.

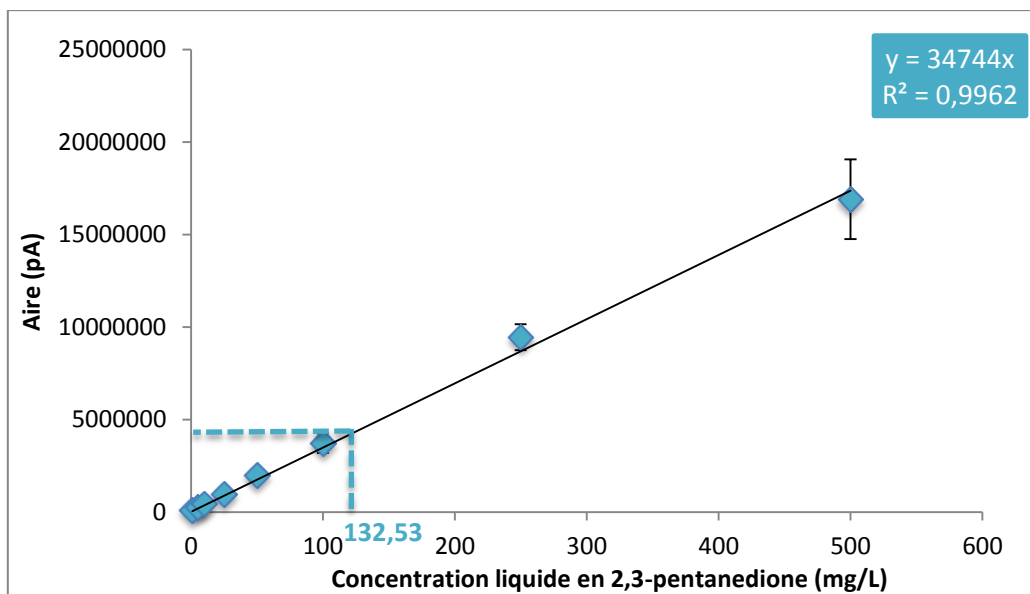


Figure 42 : Détermination de l'équation de la droite moyenne d'étalonnage obtenue à partir des injections de la 2,3-pentanedione en solution aqueuse à différentes concentrations (n = 15).

Ensuite, des flacons hermétiques de 20 mL contenant 10 mL de molécule odorante en solution dans l'eau à 25, 50, 100 et 500 mg/L ont été incubés à 37°C, sous agitation à 200 rpm durant 12h afin d'obtenir l'équilibre entre la phase liquide et la phase gazeuse (Figure 43).

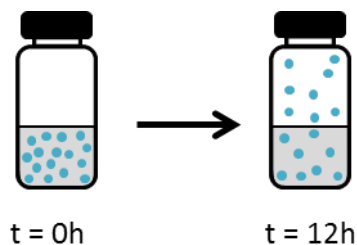


Figure 43 : Représentation de l'équilibre entre la phase liquide et la phase gazeuse d'une molécule volatile après 12h d'incubation.

Après cette incubation, 1 mL de la phase gazeuse a été prélevé au moyen d'une seringue à gaz dans la partie supérieure de chaque flacon pour être injecté en CPG. L'analyse par CPG a permis l'obtention de l'aire sous la courbe de chaque molécule pour chacune des concentrations étudiées (Exemple Tableau 11 pour la 2,3-pentanedione).

**Tableau 11 : Tableau des aires de 2,3-pentanedione obtenues après incubation de différentes concentrations de 2,3-pentanedione en phase aqueuse puis injection de la phase gazeuse à l'équilibre en CPG et du coefficient de partage obtenu à partir de différentes concentrations de 2,3-pentanedione.**

Concentration de la 2,3-pentanedione en phase liquide (mg/L)	Aire moyenne du pic de 2,3-pentanedione obtenue après injection sous la forme gazeuse (pA)	Coefficient de partage
25	230 822	0,001329
50	452 231	0,001302
100	944 818	0,001359
<b>500</b>	4 604 630	0,001325

Le coefficient de partage est alors déterminé par calcul en utilisant les gammes liquides étalons réalisées précédemment. La solution de 2,3-pentanedione préparée à partir d'une solution à 500 mg/L en phase liquide et injectée sous forme gazeuse après équilibre sera utilisée comme exemple pour expliquer le calcul du coefficient de partage.

Afin de calculer le coefficient de partage pour chaque concentration (Tableau 11), nous avons utilisé l'équation de la droite d'étalonnage des gammes liquides. D'après l'équation obtenue pour les gammes liquides  $y=34744x$ , la valeur de concentration pour  $x$  correspondante à l'**aire moyenne du pic de 2,3-pentanedione obtenue après injection sous la forme gazeuse** serait de 132,53 mg/L ( $4604630 / 34744 = 132,53$  mg/L). Cependant, le volume de molécule injecté en phase gazeuse a été de 1 mL contre 5  $\mu$ L en phase liquide soit 200 fois plus. Un facteur correctif de 200 a donc été appliqué pour obtenir une concentration de  $132,53/200 = 0,663$  mg/L dans la phase gazeuse. Ainsi, en appliquant la formule  $K_{aw} = C_a/C_w = 0,663/500 = 0,001325$ . Cette valeur correspond au coefficient de partage gaz/liquide de la 2,3-pentanedione.

Ce calcul a également été réalisé pour les autres concentrations de 2,3-pentanedione (20, 50 et 100). C'est en moyennant l'ensemble de ces résultats que le coefficient de partage gaz/liquide a été déterminé pour cette molécule. Les coefficients de la 2,3-hexanedione, la 3,4-hexanedione, la 2-acetoxy-3-butanone et de l'acétoïne ont été déterminés de la même manière (Tableau 12).

**Tableau 12 : Coefficient de partage des molécules d'intérêts.**

Molécule	Coefficient de partage
2,3-pentanedione	$1,328.10^{-3}$
2,3-hexanedione	$4,06.10^{-3}$
3,4-hexanedione	$3,41.10^{-3}$
2-acetoxy-3-butanone	$7,120.10^{-5}$
acétoïne	$1,994.10^{-5}$

### 1.3. Résultats complémentaires

Tout comme dans l'article 3 pour l'acétate d'éthyle, à cause des concentrations utilisées, les signaux de la 2,3-pentanedione ( $MH^+$ ,  $m/z= 101,059$ ), de la 2,3-hexanedione ( $MH^+$ ,  $m/z= 115,075$ ) et de la 2-acetoxy-3-butanone ( $MH^+$ ,  $m/z= 131,07$ ) étaient saturés au niveau du détecteur. Pour cette raison, la quantification de ces molécules a été réalisée à partir du signal de leurs isotopologues en  $^{13}C$  respectifs à  $m/z = 102,0631$ ,  $m/z = 116,0727$  et  $m/z = 132,076$ .

#### 1.3.1. 2,3-pentanedione

L'injection de la 2,3-pentanedione à 0,1 mg/L ( $MH^+$ ,  $m/z = 101,059$ ) sous forme gazeuse dans l'espace de tête au-dessus de la muqueuse olfactive de rat entraîne une diminution de la molécule dans l'espace de tête au cours du temps. Après 2 minutes de contact entre la muqueuse et l'odorant, la diminution de la 2,3-pentanedione devient significativement différente du témoin sans muqueuse (Figure 44).

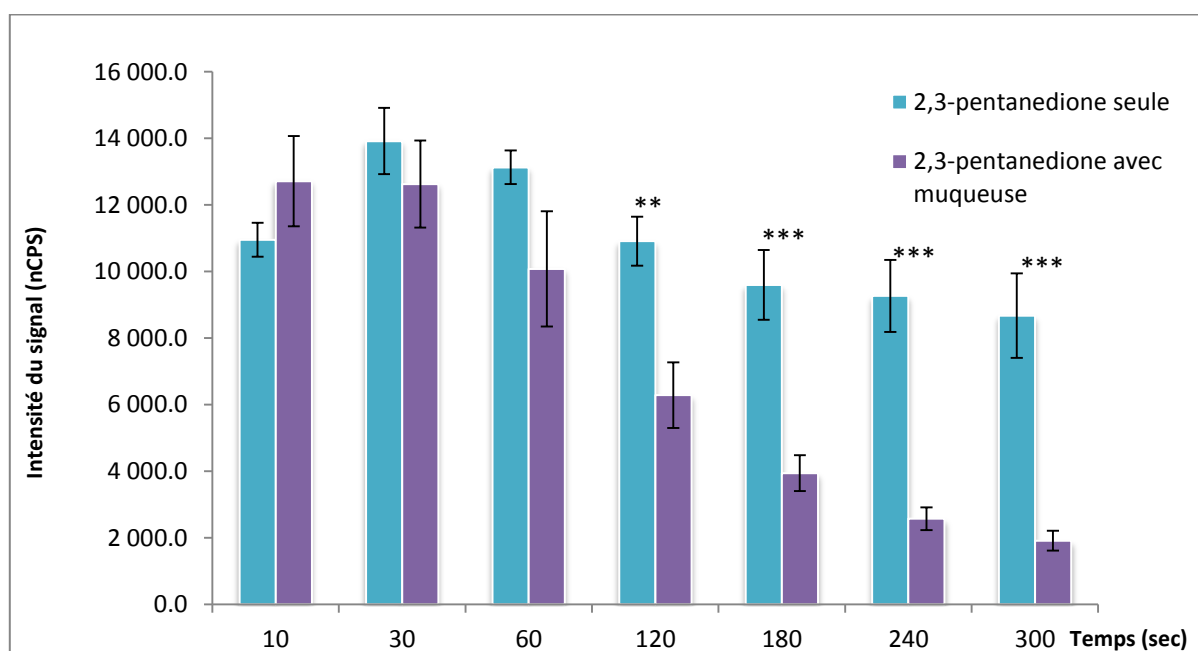


Figure 44 : Evolution du signal de 2,3 pentanedione ( $MH^+$ ,  $m/z = 101,059$ ) au cours du temps, après injection de 500  $\mu$ L de la 2,3-pentanedione (0,1 mg/L en phase gaz) en l'absence (■ ; n = 5) ou présence (■ ; n = 6) de muqueuse olfactive de rat. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond et les histogrammes représentent les données moyennées  $\pm$  SEM. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (test de Student).

### 1.3.2. 2,3-hexanedione

L'injection de la 2,3-hexanedione à 0,1 mg/L ( $MH^+$ ,  $m/z = 115,075$ ) sous forme gazeuse dans l'espace de tête de la muqueuse olfactive de rat entraîne également une diminution de la molécule. Cette diminution devient significativement différente du témoin dès 30 secondes de contact muqueuse/odorant (Figure 45).

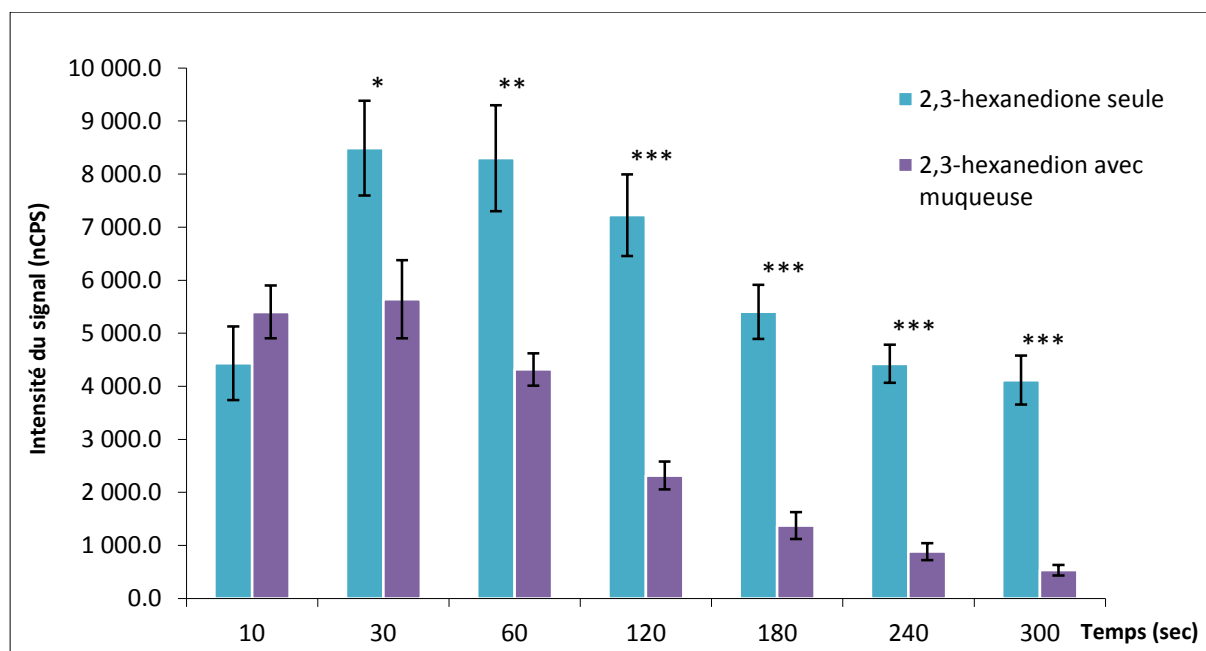


Figure 45 : Evolution du signal de 2,3-hexanedione ( $MH^+$ ,  $m/z = 115,075$ ) au cours du temps, après injection de 500  $\mu$ L de la 2,3-hexanedione (0,1 mg/L en phase gaz) en l'absence (■ ; n = 5) ou présence (■ ; n = 7) de muqueuse olfactive de rat. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond et les histogrammes représentent les données moyennées  $\pm$  SEM. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (test de Student).

### 1.3.3. 2-acetoxy-3-butanone

Le métabolisme de la 2-acetoxy-3-butanone ( $MH^+$ ,  $m/z = 131,070$ ) par la muqueuse olfactive du rat conduit à la diminution de la molécule dans l'espace de tête dont la concentration devient significativement différente de celle du témoin 4 minutes après le contact muqueuse/odorant (Figure 46).

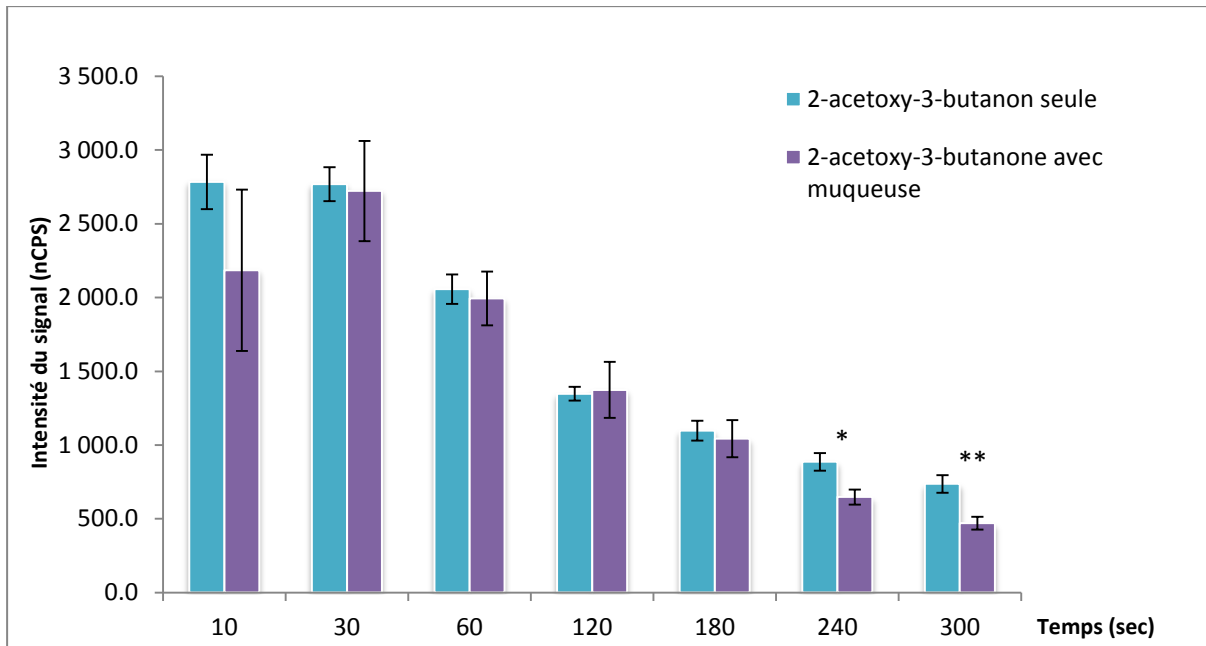


Figure 46 : Evolution du signal de 2-acetoxy-3-butanone ( $MH^+$ ,  $m/z = 131,070$ ) au cours du temps, après injection de 500  $\mu L$  de la 2-acetoxy-3-butanone (0,1 mg/L en phase gaz) en l'absence (■ ; n = 4) ou présence (■ ; n = 9) de muqueuse olfactive de rat. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond et les histogrammes représentent les données moyennées  $\pm$  SEM. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (test de Student).

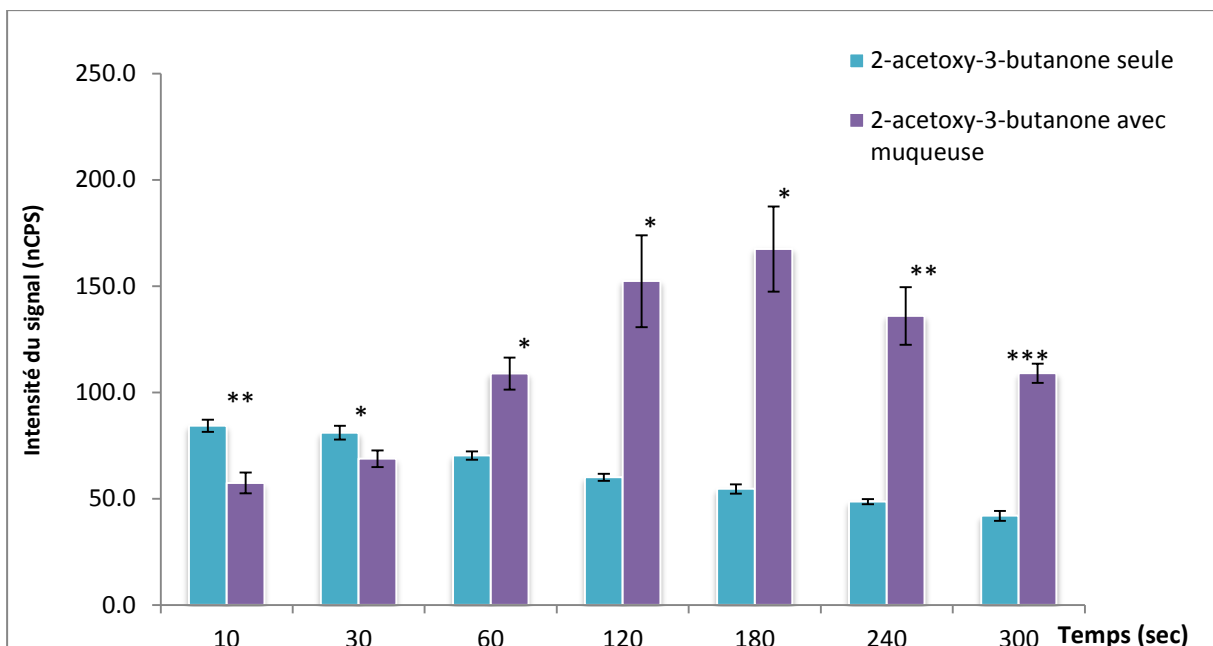


Figure 47 : Détection de l'ion  $m/z = 87,04$  après injection de 500  $\mu L$  de la 2-acetoxy-3-butanone (0,1 mg/L en phase gaz) en l'absence (■ ; n = 4) ou présence (■ ; n = 9) de muqueuse dans le tube. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond et les histogrammes représentent les données moyennées  $\pm$  SEM. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (test de Student).



Parallèlement, et observée pour la première fois, l'injection de cette molécule odorante dans le flacon contenant la muqueuse olfactive de rat montre l'apparition d'un ion de masse  $m/z = 87,04$ . Cet ion pourrait correspondre au  $MH^+$  d'une molécule de masse 86, métabolite de la 2-acétoxy-3-butanone dont la concentration devient significativement supérieure au témoin dès le temps 60 secondes (Figure 47).

#### 1.4. Discussion et conclusion

Cette technique utilisant le PTR-MS en autorisant les prélèvements en discontinu a permis de mettre en évidence le métabolisme de la muqueuse olfactive de rat en utilisant une molécule « modèle », l'acétate d'éthyle. Différents contrôles, dont la muqueuse olfactive chauffée (dénaturation des enzymes), ont été effectués afin de s'assurer que ce système fait bien intervenir des EMOs. En utilisant cette même méthodologie, 3 autres molécules odorantes ont été efficacement métabolisées par la muqueuse olfactive du rat. En effet, les résultats ont montré une diminution des molécules odorantes après contact avec la MO de rat qui a été plus ou moins rapide selon la molécule injectée. Par ailleurs, l'injection de la 2-acétoxy-3-butanone sur la muqueuse olfactive de rat a entraîné l'apparition d'un métabolite seulement 1 minute après la mise en contact de l'odorant sur la muqueuse de rat. Pour les autres molécules étudiées, aucun métabolite n'a été observé. Cette méthode innovante permet donc d'une part de suivre le métabolisme d'une molécule volatile et d'autre part de mettre en évidence l'apparition de métabolites à condition qu'ils soient volatils.

L'utilisation de cette méthode du suivi du métabolisme de la MO du rat par PTR-MS en discontinu nous a permis de répondre à l'hypothèse de départ qui supposait une efficacité du système enzymatique de la MO dans un délai inférieur à 5 minutes. Cependant, pour être parfaitement efficace et physiologiquement pertinent, ce système de biotransformation des odorants doit être actif dès la mise en contact entre l'odorant et le tissu. Un développement méthodologique supplémentaire a donc été nécessaire pour répondre à ce défi. Ce développement est l'objet de la partie suivante.

## 2. Rapidité du système de biotransformation des odorants

L'objectif de cette partie était donc de mettre au point une nouvelle technique permettant la mesure du métabolisme des odorants en temps réel et en continu dès la mise en contact du substrat et du matériel enzymatique. Cette technique devait nous permettre notamment d'accéder aux 30

premières secondes de la réaction, ce temps de 30 secondes correspondant à notre premier point de mesure significativement différent du témoin avec le dispositif décrit précédemment.

Cette étude a donné lieu à un projet de publication (Schoumacker et al., en cours de rédaction).

### 2.1. Etude du métabolisme de la muqueuse olfactive du rat par PTR- MS en temps réel et de manière continu (article 4)

#### **Résumé de la publication :**

En utilisant la Spectrométrie de la Masse Par Transfert de Protons, nous avons été capables d'enregistrer le processus enzymatique, correspondant à l'apparition d'un métabolite volatil en corrélation avec la disparition d'une molécule odorante modèle, en présence d'une muqueuse olfactive de rat. Toutefois, en raison des limites techniques, il n'a pas été possible de suivre la cinétique de l'absorption et de la synthèse des métabolites qui pourrait impacter la dynamique du processus olfactif.

Afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes enzymatiques périphériques du système olfactifs et l'éventuelle contribution des métabolites dans la perception du gras, cette étude avait pour objectif de suivre la cinétique de libération des métabolites produits par la muqueuse olfactive du rat en temps réel mais aussi d'identifier les métabolites produits.

Pour ce faire, des pièges en verre contenant une muqueuse olfactive de rat fraîchement disséquée, couplés au PTR-MS, ont été exposés en continu à une molécule odorante. En parallèle, l'adsorption des métabolites produits sur une fibre SPME couplée à la CPG-MS a été employée dans le but d'identifier des métabolites produits.

Dans cette étude, nous avons montré la production quasi immédiate de métabolites volatils via la synthèse des molécules odorantes apportées au niveau de la muqueuse olfactive de rat. Par ailleurs, notre modèle a permis l'identification de ces métabolites produits. Les résultats de cette étude laissent supposer l'implication des métabolites dans la perception olfactive.

## ***Ex-vivo* real-time monitoring of volatile metabolites resulting from odorant nasal metabolism**

**Rachel Schoumacker, Aline Robert-Hazotte, Etienne Sémon, Elisabeth Guichard, Jean-Luc Le Quéré, Philippe Faure, Jean-Marie Heydel**

**Running title: Odorants give odorants**

### **Abstract**

Enzymatic nasal metabolism is critically involved in the clearance of odorant molecules to maintain the sensitivity of the olfactory detection. However, evidence that this mechanism occur in the same space-time scale that odorant reception lacks to definitely establish its role in olfactory perception. Herein, we set up and validated an *ex-vivo* method allowing to measure odorant metabolism in real-time. Glass trap containing explant of rat olfactory mucosa (OM) was exposed in continuous to odorant and coupled to proton transfer reaction mass spectrometry for volatile compounds analysis. Focusing on carboxylic ester and diketone odorants, we observed a *quasi*-instantaneous uptake of odorants by OM, concomitant with the release of volatile metabolites in the headspace. These results definitely change the picture of the real-time *in situ* odorant metabolism and strongly emphasize the participation of metabolites in the olfactory perception. Our method allows the systematic identification of odorant metabolites using a validated animal model.

### **Introduction**

Trapped in the nasal cavity, following inhalation, the odorant molecules travel within the airflow to reach the sensory olfactory mucosa (OM). This allows the mucosa deposition of a maximum of molecules which activate their dedicated olfactory receptors triggering the olfactory signal . The residence time of the odorants in the OM environment conditioned their bioavailability which is critical with regard to (i) the activation *vs* the saturation of olfactory receptors, (ii) potential toxicity against OM or (iii) brain and systemic odorant delivery. Odorant bioavailability is under control of perireceptor events including enzymes involved in odorant biotransformation, the Odorant Metabolizing Enzymes (OME). OME belongs to xenobiotic metabolizing enzymes involved in detoxification by enzymatic deactivation of chemicals in easily eliminable hydrophilic metabolites. These enzymes, which are highly expressed in olfactory tissues (similar to liver reported on a per-cm<sup>2</sup> tissue), permanently interact with odorants. In addition to insect, a few studies demonstrated, in

vertebrate, the function of perireceptor OME in odorant biotransformation catalysis, olfactory signal termination and consequently in the olfactory perception itself. While metabolism can clearly inactivate odorant signal and therefore avoid receptor saturation, it has been also proposed that metabolites could be involved in the perception initiated by the parent odorant .

Despite these progresses, the significant role of OME in the process of olfaction is still under debate because important questions remain unanswered: Does the physiological kinetic of this enzymatic mechanism is consistent with the dynamic of the olfactory process? What is the fate of metabolites? To address these critical questions it was necessary to develop specific technical means. We previously set up and validated an automated *ex-vivo* headspace gas-chromatography method. It allowed to measure the metabolism mediated uptake of odorants in vapor phase from the headspace of a fresh explant of OM. Thereafter, in similar *ex-vivo* experimental conditions, using real-time monitoring by PTR-MS (proton transfer reaction mass spectrometry), we were able to record the first moments of the enzymatic process corresponding to the disappearance of the odorant correlated with the appearance of the corresponding volatile metabolite in the OM headspace. In the context of the peripheral olfactory process, both technics showed, in *quasi* physiological conditions, that OM presented an efficient and rapid uptake of odorants and that volatile metabolites desorbing from the tissue can be detected in the headspace. However, due to technical limits, they failed to estimate a kinetic of the uptake and the metabolite synthesis which could be in total agreement with the dynamic of the olfactory process. Such demonstration could finally assess enzymatic odorant metabolism as a rightful mechanism in olfaction.

In this manner, the technical approach that we developed and validated here, coupled the continuous delivery of odorants to OM explant and the headspace real-time quantitative monitoring of both the odorant uptake and the release of volatile metabolites resulting from its metabolism. The method was successfully applied to two kinds of odorants not sensory or structurally related and not involving the same enzymes, as demonstrated by the use of inhibitors. Aiming to better understand the role of perireceptor enzymatic mechanisms in olfaction, our work opens a wide field of research consisting in the identification of volatile odorant metabolites and the study of their potential impact on olfactory perception. Besides, our results brought new insights about the *in situ* olfactory metabolism of odorants which have to be taken in account to improve the olfactory Physiological Based Pharmacokinetic models.

## Materials and Methods

\* Chemicals

Ethyl acetate, 2,3-pentanedione and 2-acetoxy-3-butanone used in this study were purchased at Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

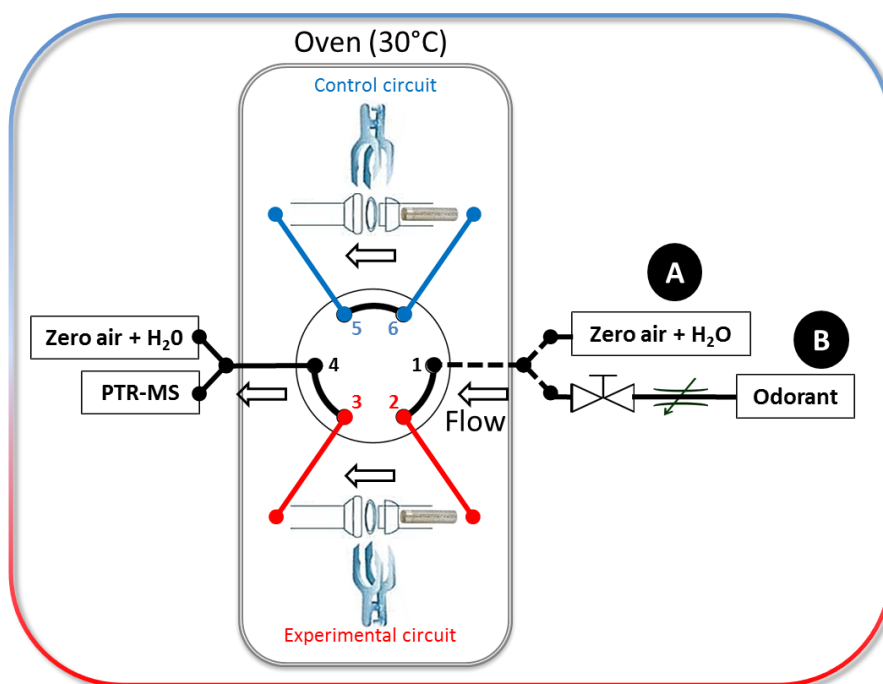
\* Rat model

Male Wistar rats (200-200 g; Harlan, Gannat, France) were hosted in an exempt organisms pathogen specific E.O.P.S. animal room of the animal facility of CSGA (12h light - 12h dark cycles, 50% of humidity, temperature 22°C) during 7 weeks. They were raised in polypropylene cages, fed ad libitum with standard food from Dietex (Argenteuil, France) and water. After decapitation of the animals, careful OM dissection was performed to avoid contamination with respiratory epithelium. The freshly removed OM was immediately placed in a 20 mL vial sealed with a Teflon-lined stopcock. All the experiments were conducted with the agreement of the Ethical Committee for Animal Experimentation (Dijon, France).

\* PTR-ToF-MS

An installation was developed to measure the metabolism of rat olfactory mucosa under a closed system. 2 Tedlar® hermetic gas bags connected to the system are located outside the enclosure (Figure 1). The first one contains 250mL of mili-Q water and ultrapure air (A: zero air) and the second one contains 250mL of odorant and ultrapure air (B: odorant). Gas bags were prepared one day before the experimentation to ensure equilibrium between air and liquid phases. The zero air gas bag allows to bring air to the system without extern contamination (flow rate = 115 mL/min). A fine valve located after the odorant gas bag allows to change the odorant/zero air proportion. After the fine valve, a shut-off valve allows to introduce or to stop the contribution of odorant in the system. The flow rate from the odorant gas bag was fixed at 29 mL/min. During the acquisition, molecules in gaseous form contained in the two gas bags come inside the enclosure and move towards one of the two identical circuits in the enclosure at 30°C. The control circuit (CC) served as control and does not contain olfactory mucosa. The experimental circuit (EC) is the experimental circuit with the olfactory mucosa. Each circuit contains a glass trap hermetically closed with a rotulex plier. The olfactory mucosa is located convolution upwards in the part of the glass trap closest to PTR-ToF-MS instrument (PTR-ToF-MS 8000, IoniconAnalytik, Innsbruck, Austria) in the EC. A strainer was installed in the entered of each trap to disperse the flow rate. A 6-way valve allows to switch from one circuit to the other circuit. The complete experimental set-up is arranged with PEEK tube (ajouter dimension). The 6-way valve was then connected to the PTR-MS via a polyether ether ketone PEEK capillary (dimension = 1mm internal diameter, 1m long, external diameter 1/10'') inserted in a heated transfer line maintained at 110°C which aspirated the headspace in the instrument with a flow rate fixed at 160 mL/min. The scan speed was 499 ms for a mass range  $m/z$  0 - 250. The primary ion  $m/z = 19.018 [H_3O^+]$  and  $m/z = 37.028 [(H_2O)2H^+]$  were systematically monitored following their respective  $^{18}O$  isotopic

contributions at 21.022 [ $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ ] and  $m/z$  39.032 [ $\text{H}_2\text{O}^{18}\text{OH}_3^+$ ] to check instrument performances and to detect cluster formation. The mass calibration was realized following the peaks of known ions ( $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ ,  $m/z= 21.022086$ ;  $\text{NO}^+$ ,  $m/z= 29.997440$ ; acetone,  $m/z = 59.049141$ ) present at any time in spectra. The intra-measurement variations of the  $\text{H}_3\text{O}^+$  primary ion intensity (monitored on  $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ ) did not exceed 5 - 6 %. During the acquisition we focused on specific masses:  $m/z = 47.047$  (ethanol) and  $m/z = 89.059$  (ethyl acetate) for experiments using ethyl acetate,  $m/z = 101.059$  (2.3-pentanedione) and  $m/z= 103.075$  (2-hydroxy-pentan-3-one and 3-hydroxy-pentan-2-one) for the investigation of 2.3-pentanedione. The measured gas-liquid partition coefficient of ethyl acetate ( $K=0.0125$ , Faure et al., 2015) allowed to determine the EA concentration in aqueous and gas phases. Using the same methodology, we measured the coefficients of the 2.3-pentanedione ( $K=0.001329$ ) and the 2-acetoxy-3-butanone ( $K=0.0000712$ ). Concentrations in the gaseous phase were 30 ppb for EA gas bag, 5ppb for 2.3-pentanedione gas bag and 1ppb for the 2-acetoxy-3-butanone. Before starting the acquisition, the freshly dissected OM was located convolution upwards in the part of the glass trap closest to PTR-MS in the EC. The time between dissection and analyses was kept as short as possible to reduce the loss of metabolism activity. After starting the acquisition, zero air was vacuumed at 115 ml/min during one minute in control circuit from the gas bag to the PTR-MS to obtain the basal signal level. After one minute, the shut-off valve was opened during two minutes to introduce gaseous odorant in the CC (a). One minute after closing the shut-off valve, the 6-way valve was switched from the control circuit to the experimental circuit during one minute to obtain the basal level of the signal in EC. Without interrupting the acquisition, the shut-off valve was opened during two minutes to introduce gaseous odorant at 29 ml/min in the EC (b). One minute after closing the shut-off valve, the 6-way valve was switched from the experimental circuit to the control circuit during one minute. To finish, the shut-off valve was opened during two minutes (c) in CC to obtain an other control. Between each acquisition, the experimental gas trap was cleaned with mili-Q water and the two circuits were cleaned with zero air to avoid the persistence of odorant molecules. All analyses were carried out with a drift tube pressure at 2.3mbar, drift tube temperature at 80°C and a drift voltage of ...V giving an electric field strength to number density ratio  $E/N$  of 110Td ( $1 \text{ Td} = 10^{17} \text{ V.cm}^2.\text{V}$ ) and  $\text{H}_3\text{O}^+$  as reagent ion. As calibration curves were not produced, the data were expressed in normalized CPS (nCPS) as recommended by the manufacturer using primary ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $(\text{H}_2\text{O})_2$  using the software PTR-MS Viewer ver 3.1.0.28 to account for primary ions fluctuations.



**Fig. 1.** Schematic representation of the system developed to analyse the real time metabolic capacity of ex-vivo rat olfactory mucosa after exposure to an odorant molecule.

\* Controls

The system development and controls were realized with ethyl acetate. Concentration of EA in gaseous phase of the gas bag was 30 ppb. Different controls were done. Firstly, we controlled that the two circuits were identical by measuring the flow rate and the signal of EA in each circuit. The CC without olfactory mucosa containing the same level of odorant allowed to measure odorants and metabolites reference signals. Secondly, mucosa was previously heated at 80°C for 15 min and cooled down at room temperature prior to the analysis, in the aim of denaturing the enzymes that allowed to check for adsorption on the tissue and to confirm the enzymatic nature of the reaction. In order to reduce the number of rats sacrificed, heated mucosa were beforehand used in experimental conditions. It was previously checked that heated mucosa signal after one exposition was not significantly different from a directly heated mucosa. Thirdly, the absence of any significant intrinsic metabolism was checked in the EC containing only olfactory mucosa. Then, 100 µL of BNPP, a carboxylesterase inhibitor at 100 µmol was injected of the dissected OM during 5 minutes before acquisition to confirm the action of carboxylesterase. As a control, the same experimentation was done with 100 µL of milli-Q water. The last control was to demonstrate the enzymatic implication by comparing signals of 0.5, 1 and 1.5 mucosa. All the measurements were done at least in triplicate.

\* PTR-ToF-MS Data analysis

Results are expressed as averaged signal during the 30 last seconds at the plate (before closing the shut-off valve). All the spectres were background subtracted using the 30 seconds before opening the

shut-off valve. For each acquisition, results of the two CC plate signals were averaged. For statistical analyses, data were averaged in available replicates and analysed using the Student's t-test to compare the profile of the EC containing olfactory mucosa with controls. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean). As calibration curves were not produced, the data were expressed in normalized CPS (nCPS) as recommended by the manufacturer using primary ions  $H_3O^+$  using the software PTR-MS Viwer rel. 5.

#### \* SPME-GC-MS

To confirm the identification of metabolites, Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC-MS) Agilent MSD 5973N GC/MS analyses of the headspace were realized. A DB-WAX capillary column (30 m x 0.32 mm, film thickness 0.5 $\mu$ m, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) was used. The use of a 3 phases (Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane) Solid Phase Micro-Extraction (SPME) allowed to capture the maximum amount of metabolites in the headspace. To analyze the maximum of potential metabolites, a temperature gradient of 5 °C/min from 40°C to 240°C was set the GC/MS. Freshly dissected rat olfactory mucosa was placed convolution upwards into a 20 mL vial sealed with a Teflon-lined stopcock. The time between dissection and analyses was kept as short as possible to reduce the loss of metabolism activity. 500  $\mu$ L of gaseous ethyl acetate at 40 mg/L was injected with an automatic syringe in the headspace above the olfactory mucosa to obtain the concentration of 1mg/L in the vial. After 30 minutes the SPME fibre was disposed in the vial close to the OM during 10 minutes to adsorb volatile molecules present in the headspace. Then the fiber was recovered and placed in the GC-MS for an approximately 40 min. In parallel controls containing only OM and the disposition of the SPME fiber only 5 minutes after injection of EA on the OM were realized. Similarly, these experimentations were realized with 2,3-pentanedione at 1 mg/L and 2-acetoxy-3-butanone at 0.1 mg/L in the vial.

## Results

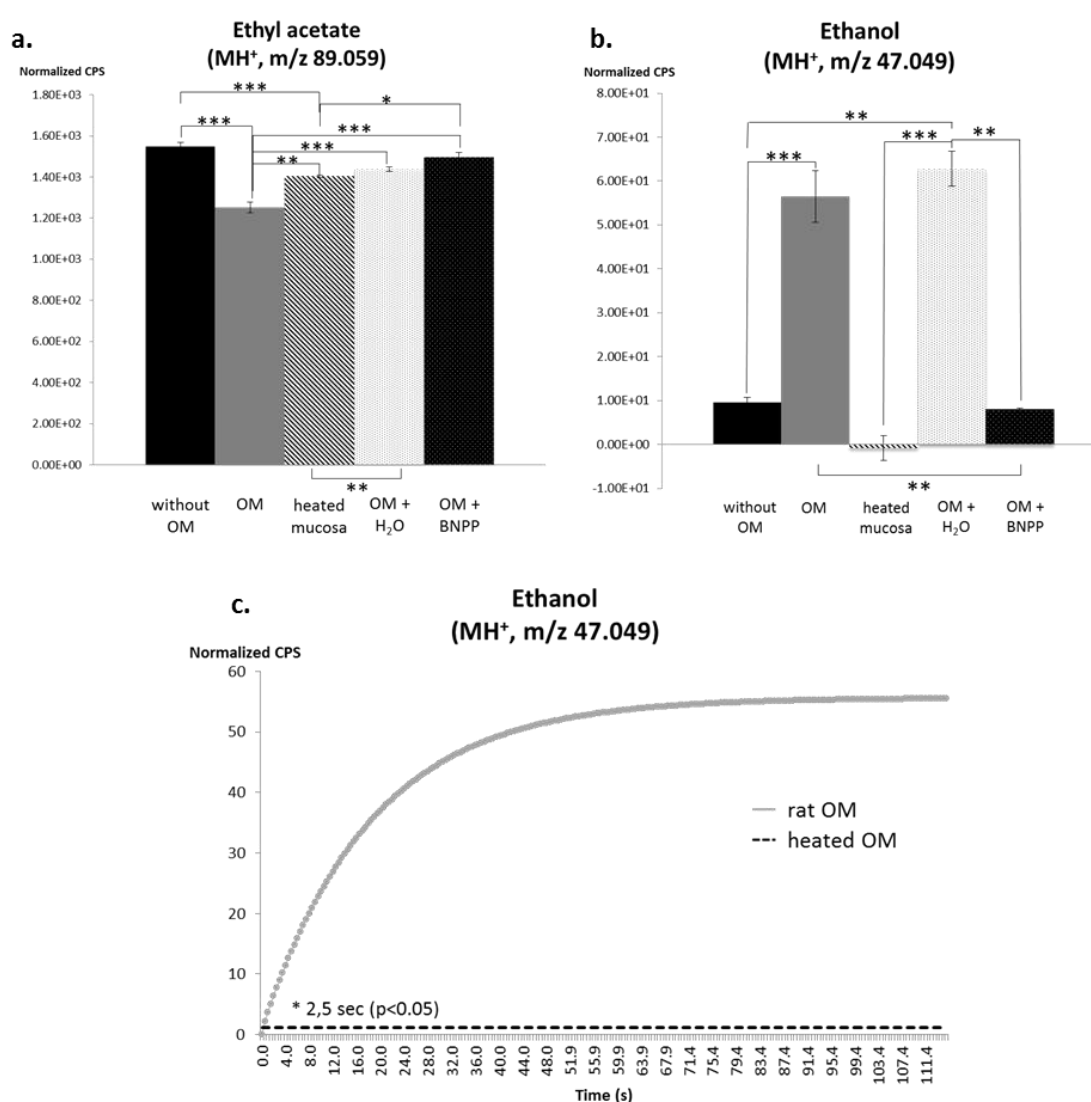
Using ethyl acetate, a new system enables to follow in real-time the metabolism of OM was developed. At first, some measurements were done to control the similarity of experimental and control circuits. The flow rate at 50, 100 and 150 ml/min remain unchanged during the 15 minutes of measurement in the two circuits. Moreover, the signal of EA ( $m/z = 89.059$ ) at 1ppb/min detected by the PTR-MS was strictly analogous between the two circuits.

### Real-time olfactory metabolism of the carboxylic ester EA: analysis of EA uptake

To investigate the metabolic capacity of OM, the odorant molecule EA was continuously injected above a fresh explant of OM and several controls were done. Figure 2.a. shows the behaviour of EA



level intensity during the 30 last seconds of the signal measured continuously in real time by PTR-MS obtained with different conditions. Continuously injection of EA above OM significantly decreased EA signal compared with signal obtained without OM, suggesting a metabolic activity toward EA in the OM. With heated OM, for which the enzymes were mostly inactivated, we observed a lower decrease of EA raw signal intensity presumably due to adsorption of the volatile compound in the OM tissue and interestingly though, this level of EA was found significantly higher than the OM not heated which contains intact enzymes involved in metabolism (Fig. 2.a.). The level of EA in presence of OM + BNPP, an inhibitor of carboxylesterase activity, was not significantly different than its own control realised with addition of 100  $\mu$ L mili-Q water (OM + H<sub>2</sub>O) corresponding to the volume of aqueous solution necessary for this enzymatic inhibition experiments.

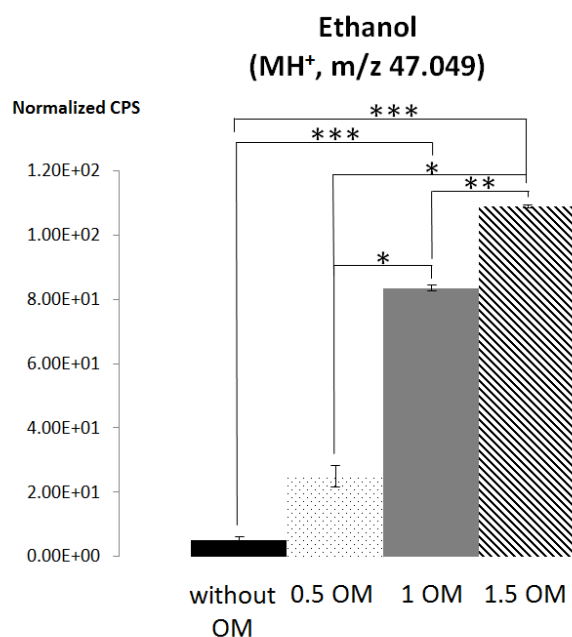


**Fig. 2.** Computed signal (Normalized CPS) of ethyl acetate (a) and ethanol (b) measured in real time by PTR-MS during 20 s when the signal reached a constant maximum value in the control circuit without OM (n = 16) and in the experimental circuit containing OM (n = 5) or heated OM (n = 3) or OM+ H<sub>2</sub>O (n = 3) which used as control of OM + BNPP (n = 3) throughout continuous inflow of ethyl acetate (x mg/l in the gaseous fraction of the corresponding gas bag) at 30 ppb.

## Real-time olfactory metabolism of the carboxylic ester EA: analysis of EA metabolites

Figure 2.b. shows the average level of ethanol, the main EA volatile metabolite, acquired by PTR-MS during 20s for each experimental condition described above. Injection of EA above OM resulted in appearance of ethanol ( $m/z = 47.049$ ) produced by the metabolic activity toward EA in the OM. The level of ethanol for the OM and OM + H<sub>2</sub>O were very significantly higher from the background level measured without OM. Besides, the enzymatic metabolism inactivation by OM external heating as well as the addition of BNPP, completely inhibited the production of the metabolite. The average level of ethanol in presence of OM + BNPP and in the circuit without OM showed a very slight PTR-MS signal of ethanol due to its ubiquitous presence in the environment. Acetic acid should be the second volatile metabolite of EA produced by OM enzymes in the OM. However, it could not be followed because its molecular ion at  $m/z 61.028$  could not be distinguished from the McLafferty rearrangement ion of EA found at the same  $m/z$  with an important abundance of 60% relative to the base peak found at  $m/z = 89.059$ . The acetyl fragment at  $m/z = 43.018$ , the main fragment ion of acetic acid in PTR-MS, was also indistinguishable from the fragment ion coming from this rearrangement ion, and its relative abundance was not found different in the experimental circuit compared with the control circuit without OM. Figure 2. c. shows the ethanol kinetic profile obtained in real time during the continuous injection of EA above the OM. The injection of EA resulted in immediate appearance of ethanol whose become significant only 2.5 seconds after starting the introduction of the odorant above OM. Then, EA concentration increased continuously to reach a plate. Control samples containing heated OM showed only a background signal of ethanol along all the acquisition time. Using a new system connected to the PTR-MS, this result shows for the first time the remarkable speed of the OM enzymatic metabolism.

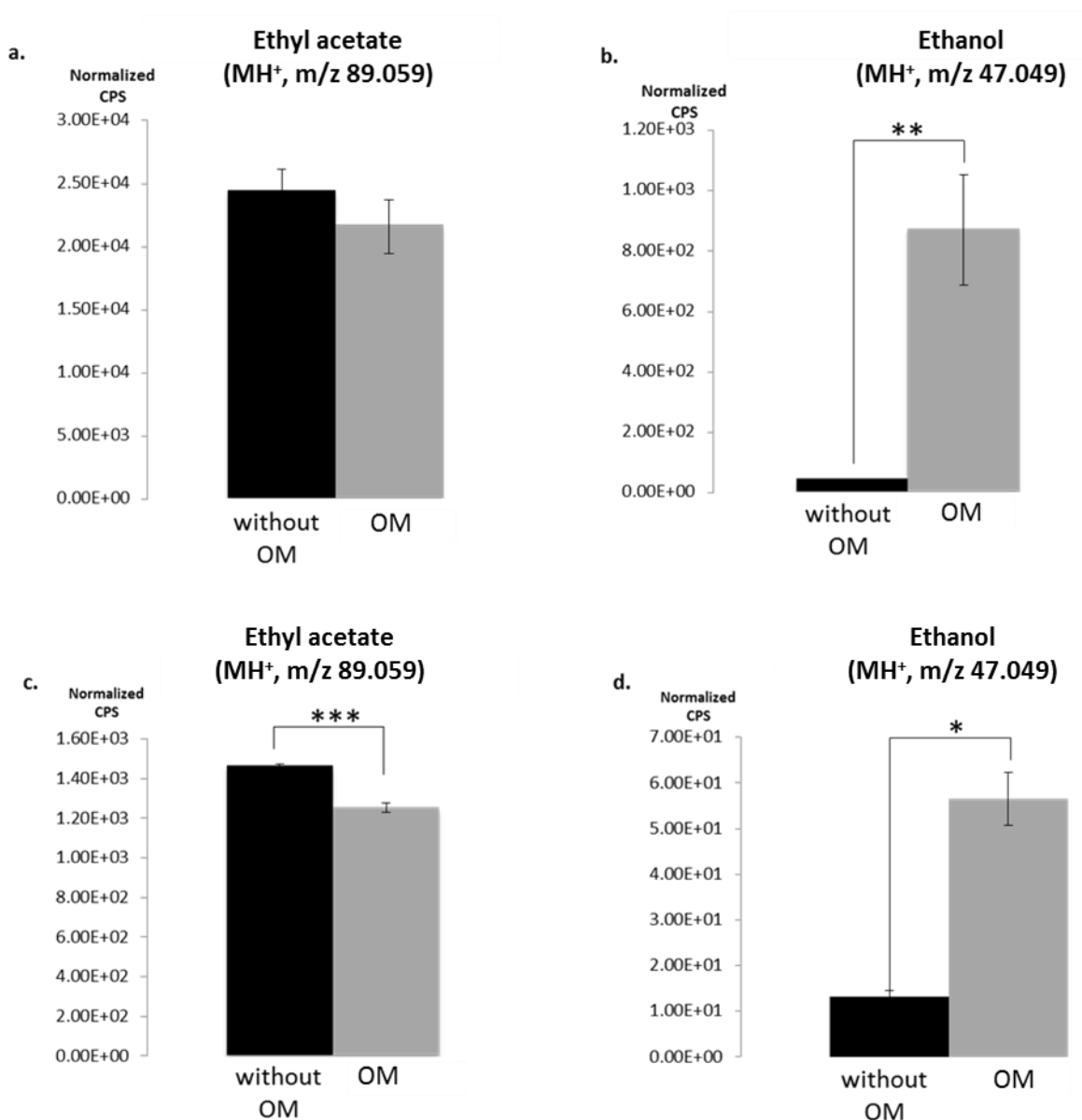
To ensure that ethanol production resulted from the enzymes activity in the OM, another control was performed which consisted to enhance enzymes amount by increasing the quantity of OM used in our experiments. Figure 3 shows a significant increase of ethanol level between a half-OM and one whole OM. Similarly, the level of ethanol was significantly higher with one and a half OM than with one whole OM, showing that ethanol synthesis is indexed on the quantity of tissue therefore on the enzyme amount.



**Fig. 3.** Computed signal (Normalized CPS) of ethanol's production measured in real time by PTR-MS during 20 s when the signal reached a constant maximum value in the control circuit without OM (n = 12) and in experimental circuit containing a half-OM (0.5 OM, n = 2\*3 different signal acquisitions during 20 s) or a whole OM (1 OM, n = 2\*3 different signal acquisitions during 20 s) or one and half OM (1.5 OM, n = 2\*3 different signal acquisitions during 20 s) throughout continuous inflow of ethyl acetate (x mg/l in the gaseous fraction of the corresponding gas bag) at 30ppb. Data represent the mean ± SEM from independent assays. The significant differences are noted \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 (Student's T-test) for data comparison.

### Real-time olfactory metabolism of the carboxylic ester EA: dose related effects.

A dose/effect experiment of EA metabolism was performed using two different concentrations (Fig. 4.). A high EA concentration was mainly used to amplify metabolite production by increasing the enzymes substrate. Using a weakest EA concentration with the same amount of enzymes that previously, we expected to amplify signal difference of EA metabolism between experiments with OM compared to experiments without OM. On the top (Fig. 4.a and 4.b), the high level of EA continuously injected above the OM did not allow to observe a significant signal decrease in presence of OM because the enzymes could not metabolise all odorant but conversely could lead to a large production of ethanol. As expected, the low level of EA (Fig. 4.c. and d.) could significantly decrease EA signal in presence of OM compared to experiments without OM and additionally produced a good level of the metabolite.

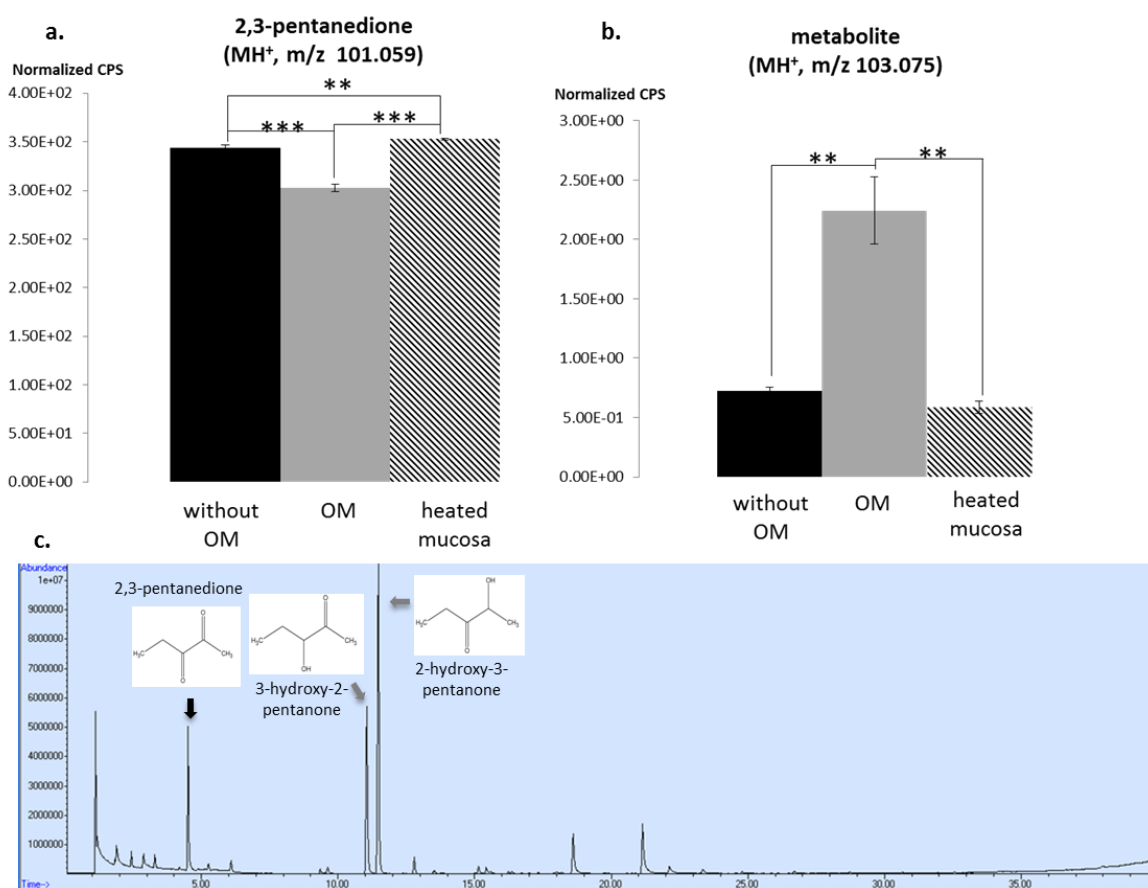


**Fig. 4.** . Computed signal (Normalized CPS) of ethyl acetate (**a**) and ethanol (**b**) measured in real time by PTR-MS during 20 s when the signal reached a constant maximum value in the control circuit without OM (n = 10) and in the experimental circuit containing OM (n = 5) throughout continuous inflow of ethyl acetate (246 ppb in the gaseous fraction of the corresponding gas bag) at ...ml/l. Computed signal (Normalized CPS) of ethyl acetate (**c**) and ethanol (**d**) measured in real time by PTR-MS during 20 s when the signal reached a constant maximum value in the control circuit without OM (n = 10) and in the experimental circuit containing OM (n = 5) throughout continuous inflow of ethyl acetate (30 ppb in the gaseous fraction of the corresponding gas bag) at ...ml/l. Data represent the mean ± SEM from independent assays. The significant differences are noted \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 (Student's T-test) for data comparison.

### Real-time olfactory metabolism of a diketone: analysis of 2,3-pentanedione

Using the same methodology, the metabolism of the 2,3-pentanedione was studied. Figure 5.a. shows the behaviour of 2,3-pentanedione during the 30 last seconds of the signal measured continuously in real time by PTR-MS obtained with different conditions. Continuously injection of 2,3-pentanedione above OM significantly decreased the computed signal compare with signal obtained without OM,

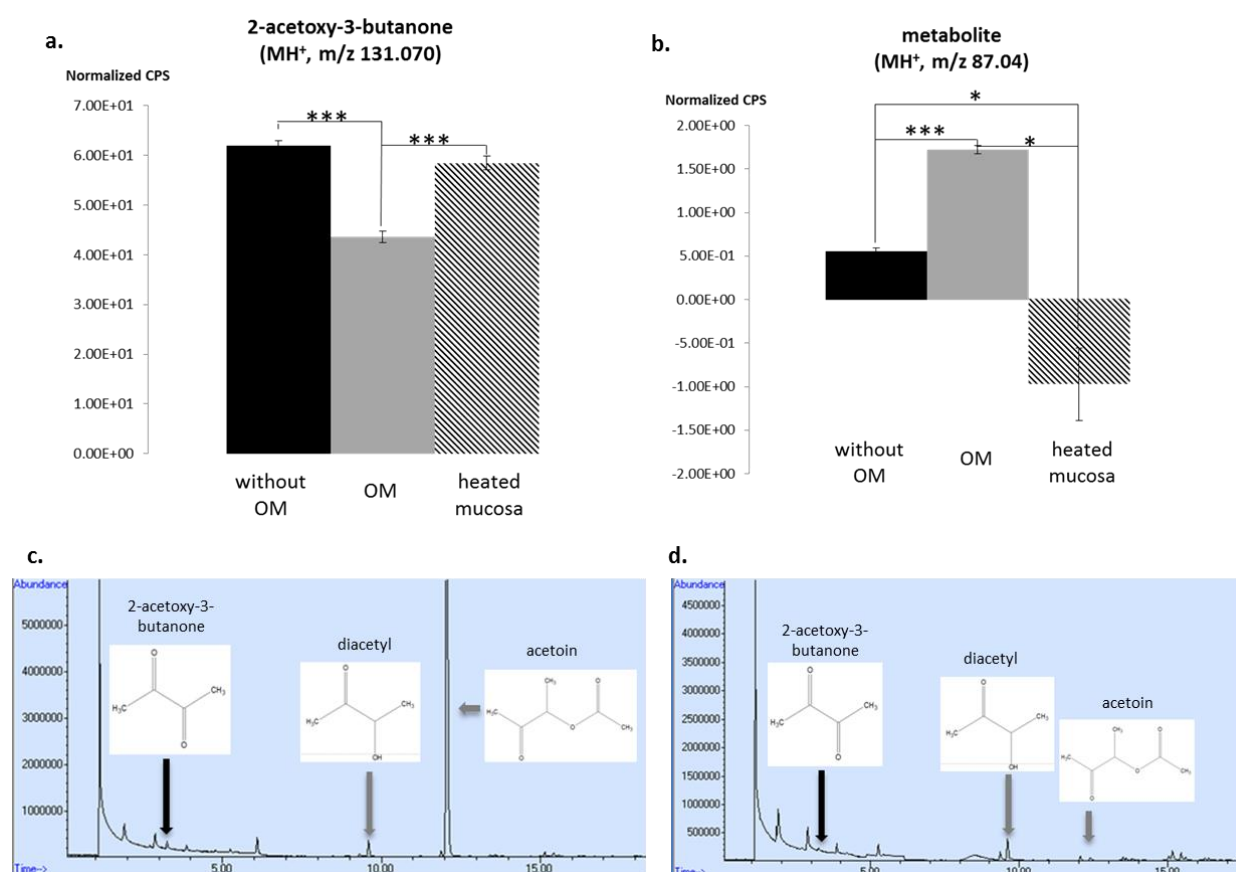
suggesting a metabolic activity toward 2,3-pentanedione in the OM. With heated OM, the level of 2,3-pentanedione signal was found significantly higher than with the OM not heated corresponding to a disappearance of its metabolism. Concomitant to the depletion of 2,3-pentanedione, PTR-MS methodology revealed the apparition of the ion  $m/z = 103.075$  in presence of OM (Fig. 5.b.) and the signal of this metabolite recovered a background value when the OM was heated. To identify this metabolite, GC-MS analysis was realized after concentration by SPME. Figure 5.c. shows the chromatogram of gaseous environment nearby OM trapped by SPME fiber and injected on GC-MS, 30 minutes after injection of the odorant molecule in a vial containing the OM. This figure shows the production of two specific volatile metabolites: 2-hydroxy-pentan-3-one and 3-hydroxy-pentan-2-one, in presence of OM and 2,3-pentanedione. These compounds were specific because they were not present in the controls vials containing only OM or only the odorant, meaning that both OM and odorant were needed to form these compounds. These two compounds correspond to the metabolite signal observed by PTR-MS ( $m/z = 103.075$ ) but could not be distinguished by this method because of their identical ion mass.



**Fig. 5.** Computed signal (Normalized CPS) of 2,3-pentanedione (**a**) and its metabolites (**b**) measured in real time by PTR-MS during 20 s when the signal reached a constant maximum value in the control circuit without OM ( $n = 16$ ) and in the experimental circuit containing OM ( $n = 5$ ) or heated OM ( $n = 3$ ) throughout continuous inflow of ethyl acetate ( $x$  mg/l in the gaseous fraction of the corresponding gas bag) at 5ppb. Data represent the mean  $\pm$  SEM from independent assays. The significant differences are noted \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  (Student's T-test) for data comparison.

Identification of 2,3-pentanedione's metabolites (**c**) by Gas Chromatography / Mass Spectrometry analysis after adsorption/desorption using Solid Phase Micro-Extraction fibers.

The second fatty molecule studied was the 2-acetoxy-3-butanone. Contrary to the heated OM, the OM significantly decreased the level of 2-acetoxy-3-butanone at the plateau (Fig 6.a.) and simultaneously produced a metabolite with an ion mass at  $m/z = 87.04$  (Fig 6.b.). Similarly to the 2,3-pentanedione, the identification of the metabolite was done by GC-MS methodology (Fig. 6.c. and 6.d.). The Figure 6.d. showed the chromatogram of the headspace of the 2-acetoxy-3-butanone 30 minutes after injection of the odorant molecule at 0.1ppm in the vial above the OM. This chromatogram revealed the apparition of an other metabolite: the acetoin but the expected metabolite was not found. For this reason, an other chromatogram of the headspace of the 2-acetoxy-3-butanone was done 10 minutes after injection of the odorant molecule. This result (Fig 6.c.) shown that there was generation of two specific compounds: the diacetyl and the acetoin.



**Fig. 6.** Computed signal (Normalized CPS) of 2-acetoxy-3-butanone (a) and its metabolites (b) measured in real time by PTR-MS during 20 s when the signal reached a constant maximum value in the control circuit without OM (n = 16) and in the experimental circuit containing OM (n = 5) or heated OM (n = 3) throughout continuous inflow of ethyl acetate (x mg/l in the gaseous fraction of the corresponding gas bag) at 1ppb. Data represent the mean  $\pm$  SEM from independent assays. The significant differences are noted \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 (Student's T-test) for data comparison.

Identification of 2-acetoxy-3-butanone's metabolites (c) by Gas Chromatography / Mass Spectrometry analysis after adsorption/desorption using Solid Phase Micro-Extraction fibers.

## Discussion

It is now well admitted that olfactory metabolism is involved in the clearance of odorant molecules in the peripheral olfactory system. It is indeed necessary to get rid of odorant background to maintain the sensitivity of the detection. Despite significant results in this emerging field, it has been opposed that such enzymatic mechanism could not be actually involved in the perception *per se*. Herein, we set up a real-time analytic method allowing us to demonstrate that biotransformation is definitely convoluted to the peripheral olfactory signal processing.

To estimate the efficiency of the OM to metabolize the odorants, we developed a method which continuously deliver an odorant to an explant of OM. Therefore, a low continuous flow rate of odorant (29 mL/min) was used in comparison to a regular rat sniffing and a dispersion of odorant was obtained using a strainer to expose the whole olfactory mucosa. Connected to a PTR-ToF-MS, the system monitored in real-time and from the headspace both the depletion of the studied odorant and the synthesis of its metabolites. To assess that these records are resulting from the metabolism, controls experiments with heated tissues and inhibitors were necessary. Thus, we showed that *ex-vivo* odorant uptake by the OM and the release corresponding volatile metabolite are efficiently inhibited when the inhibitor is directly applied on the tissue explant a few minutes before signal acquisition.

Regarding odorant metabolism in the OM, numerous *in-vitro* (tissue homogenate) studies have been performed over years in order to characterize the kinetic parameters of the OME's activities toward different odorants. This allowed for example to compare enzymes efficiencies between species or during development. Besides, to get closer to olfactory physiological conditions, *ex-vivo* headspace method were set up to measure odorant metabolism in vapor phase in explant of OM. The original method presented in this work combined the benefit of the *ex-vivo* headspace method with the real-time monitoring by PTR-MS. We thus evidenced in real-time the very fast ability of OM for the clearance vs conversion of odorants either regarding hydrolytic or reductase enzymatic activity. Due to inevitable technical constraints, significant detection (over background) of metabolites was obtained after around 2 seconds, but the recording slope clearly showed no latency in the synthesis meaning that this enzymatic mechanism is *quasi* instantaneous in these *ex-vivo* conditions. Moreover, the continuous gaseous delivery of odorant demonstrated the powerful capacity of OM to efficiently clear out odorants, over 30 minutes, from the OM headspace, even in *ex-vivo* conditions. Strikingly, the clearance of the tested odorants was concomitant with the very fast synthesis of odorants metabolites detectable instantaneously in the headspace. This last point is particularly interesting with regard to the Physiological Based Pharmacokinetic compartment model of the nasal cavity previously proposed. We present a schematic unit compartment model for ethyl acetate in the OM. Our update of the previous model mainly relies on the evidence that volatile metabolites are released in the OM headspace through the mucus layer (proportionally to their air / mucus partition coefficient). This provides a new mucus flow parameter regarding the fate of metabolites in addition to the air flow and

the blood flow. Desorption from the mucus to the air of volatile metabolites were not taken in account in the last nasal PBPK models.

Besides, whether the metabolism takes place in the mucus or in the OM cells, our results revealed that odorant metabolites necessarily meet and thus potentially activate olfactory receptors located in the membrane of the sensory neurons cilia. As suggested previously, we demonstrated here that volatile metabolites are physiologically able to trigger olfactory signal. We added a fifth compartment call the receptor layer, which is the place of metabolites / receptors interaction coupled with odorant metabolism since it presents structures rich in OMEs including olfactory neurons cilia (carrying receptors), supporting cells cilia and mucus.

Ethyl acetate is a small carboxylic acid ester with a sweet fruity smell which has been widely studied as solvent or wine component. Our method revealed that ethanol is released by OM, in the receptor vicinity, after exposure to ethyl acetate. As shown using inhibitors, this detection of ethanol resulted in olfactory carboxylesterase activity which have been previously characterized in OM. Accordingly, since alcohols are well-described olfactory stimuli , the numerous carboxylic esters present in food and beverages appears as potential source of secondary signaling alcohol metabolites. Interestingly, a recent study pointed out the importance to consider abiotic hydrolysis of carboxylic ester in the release of aroma from food ; herein we demonstrated that OM is the place of a fast enzymatic hydrolytic conversion of carboxylic esters in alcoholic stimuli presenting totally different sensory characteristics. Olfactory metabolism of 2,3-pentanedione, a food grade diketone aroma presenting fatty sensory characteristic, instantaneously produced two metabolites: 2-hydroxy-pentan-3-one and 3-hydroxy-pentan-2-one. The use of inhibitors with our method designated the role of the enzyme Dicarboxyl/1-xylulose reductase (DCXR) in the synthesis of both metabolites. 2-hydroxy-pentan-3-one metabolite (but not 3-hydroxy-pentan-2-one) was recently identified *in-vitro* in human cultured normal bronchial/tracheal epithelial cells (NHBE) following 2,3-pentanedione exposure also involving DXCR . Our results are supported both by the high activity of DCXR in the OM (10 times higher than in the respiratory or the tracheal mucosa) and its localization in rat OM. Interestingly, 2-hydroxy-pentan-3-one (isolated from cheese) presents a different descriptor than 2,3-pentanedione (XXX vs YYY respectively) , strongly suggesting that the perception of 2,3-pentanedione could results also in the detection of its metabolites. Although some differences exist between rat and human regarding olfactory metabolism (gloede and campbell), the enzyme OM equipment is quite similar, therefore as in drug metabolism, the rat is a validated model that can be used with our method to characterize odorant metabolites. In this work, we focused on the first enzymatic step of the biotransformation catalyzing odorants hydrolysis, oxidation or reduction. However a large number of other OMEs catalyze conjugation reaction (with glutathione, sulfate or glucuronic acid) toward the odorant itself or more often to the first step metabolites. Since such reaction synthesizes highly hydrophilic



metabolites, they may not activate olfactory receptors but this cannot be rule out according to the versatility of the olfactory reception.

In this study, we have made steps toward a spatially refine picture of the real-time *in situ* odorant metabolism showing also that it occurs in same space-time scale than odorant reception. As suggested previously, our results strongly emphasized the role of volatile metabolites in sensory detection. The richness of OM in different class of OMEs controls the bioavailability and the potential conversion of infinity of odorants. Our method allows the systematic screening of volatiles metabolites resulting from odorant metabolism in a validated animal model. Now, what are we going to further learn about odorant metabolites in term of sensory characteristic? Detection threshold? Involvement and behaviour in combinatorial coding? This may certainly strongly change and improve our knowledge on the peripheral olfactory system in physiological or pathophysiological conditions as well as open to new application in aroma design.

## References

- Avila, M., Garde, S., Fernandez-Garcia, E., Medina, M. and Nunez, M. (2006) Effect of high-pressure treatment and a bacteriocin-producing lactic culture on the odor and aroma of hispanico cheese: correlation of volatile compounds and sensory analysis. *J Agric Food Chem*, 54(2), pp. 382-9.
- Ben-Arie, N., Khen, M. and Lancet, D. (1993) Glutathione S-transferases in rat olfactory epithelium: purification, molecular properties and odorant biotransformation. *Biochem J*, 292 ( Pt 2), pp. 379-84.
- Bogdanffy, M. S. (1990) Biotransformation enzymes in the rodent nasal mucosa: the value of a histochemical approach. *Environ Health Perspect*, 85, pp. 177-86.
- Bogdanffy, M. S., Sarangapani, R., Kimbell, J. S., Frame, S. R. and Plowchalk, D. R. (1998) Analysis of vinyl acetate metabolism in rat and human nasal tissues by an in vitro gas uptake technique. *Toxicol Sci*, 46(2), pp. 235-46.
- Bogdanffy, M. S., Sarangapani, R., Plowchalk, D. R., Jarabek, A. and Andersen, M. E. (1999) A biologically based risk assessment for vinyl acetate-induced cancer and noncancer inhalation toxicity. *Toxicol Sci*, 51(1), pp. 19-35.
- Bogdanffy, M. S. and Taylor, M. L. (1993) Kinetics of nasal carboxylesterase-mediated metabolism of vinyl acetate. *Drug Metab Dispos*, 21(6), pp. 1107-11.
- Buck, L. and Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), pp. 175-87.
- Campbell, J. L., Andersen, M. E. and Clewell, H. J. (2014) A hybrid CFD-PBPK model for naphthalene in rat and human with IVIVE for nasal tissue metabolism and cross-species dosimetry. *Inhal Toxicol*, 26(6), pp. 333-44.
- Chertemps, T., Francois, A., Durand, N., Rosell, G., Dekker, T., Lucas, P. and Maibeche-Coisne, M. (2012) A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. *BMC Biol*, 10, pp. 56.
- Chertemps, T., Younus, F., Steiner, C., Durand, N., Coppin, C. W., Pandey, G., Oakeshott, J. G. and Maibeche, M. (2015) An antennal carboxylesterase from *Drosophila melanogaster*, esterase 6, is a candidate odorant-degrading enzyme toward food odorants. *Front Physiol*, 6, pp. 315.

- Faure, P., Legendre, A., Hanser, H. I., Andriot, I., Artur, Y., Guichard, E., Coureaud, G. and Heydel, J. M. (2016) Odorant Metabolism Analysis by an Automated Ex Vivo Headspace Gas-Chromatography Method. *Chem Senses*, 41(1), pp. 15-23.
- Gervasi, P. G., Longo, V., Naldi, F., Panattoni, G. and Ursino, F. (1991) Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa. *Biochem Pharmacol*, 41(2), pp. 177-84.
- Gu, J., Su, T., Chen, Y., Zhang, Q. Y. and Ding, X. (2000) Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: potential roles in developmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 165(2), pp. 158-62.
- Heydel, J. M., Coelho, A., Thiebaud, N., Legendre, A., Le Bon, A. M., Faure, P., Neiers, F., Artur, Y., Golebiowski, J. and Briand, L. (2013) Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat Rec (Hoboken)*, 296(9), pp. 1333-45.
- Heydel, J. M., Holsztynska, E. J., Legendre, A., Thiebaud, N., Artur, Y. and Le Bon, A. M. (2010) UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function. *Drug Metab Rev*, 42(1), pp. 71-94.
- Hubbs, A. F., Cumpston, A. M., Goldsmith, W. T., Battelli, L. A., Kashon, M. L., Jackson, M. C., Frazer, D. G., Fedan, J. S., Goravanahally, M. P., Castranova, V., Kreiss, K., Willard, P. A., Friend, S., Schwegler-Berry, D., Fluharty, K. L. and Sriram, K. (2012) Respiratory and olfactory cytotoxicity of inhaled 2,3-pentanedione in Sprague-Dawley rats. *Am J Pathol*, 181(3), pp. 829-44.
- Hwang, I. Y., Reardon, K. F., Tessari, J. D. and Yang, R. S. (1996) A gas-liquid system for enzyme kinetic studies of volatile organic chemicals. Determination of enzyme kinetic constants and partition coefficients of trichloroethylene. *Drug Metab Dispos*, 24(4), pp. 377-82.
- Iyanagi, T. (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol*, 260, pp. 35-112.
- Leclerc, S., Heydel, J. M., Amosse, V., Gradinaru, D., Cattarelli, M., Artur, Y., Goudonnet, H., Magdalou, J., Netter, P., Pelczar, H. and Minn, A. (2002) Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system: activity, expression and age-linked modifications of UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1, and relation to mitral cell activity. *Brain Res Mol Brain Res*, 107(2), pp. 201-13.
- Legendre, A., Faure, P., Tiesset, H., Potin, C., Jakob, I., Sicard, G., Schaal, B., Artur, Y., Coureaud, G. and Heydel, J. M. (2014) When the nose must remain responsive: glutathione conjugation of the mammary pheromone in the newborn rabbit. *Chem Senses*, 39(5), pp. 425-37.
- Lewis, J. L., Nikula, K. J., Novak, R. and Dahl, A. R. (1994) Comparative localization of carboxylesterase in F344 rat, beagle dog, and human nasal tissue. *Anat Rec*, 239(1), pp. 55-64.
- Maibeche-Coisne, M., Nikonov, A. A., Ishida, Y., Jacquin-Joly, E. and Leal, W. S. (2004) Pheromone anosmia in a scarab beetle induced by in vivo inhibition of a pheromone-degrading enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31), pp. 11459-64.
- Mayer, U., Kuller, A., Daiber, P. C., Neudorf, I., Warnken, U., Schnolzer, M., Frings, S. and Mohrlen, F. (2009) The proteome of rat olfactory sensory cilia. *Proteomics*, 9(2), pp. 322-34.
- Minn, A. L., Pelczar, H., Denizot, C., Martinet, M., Heydel, J. M., Walther, B., Minn, A., Goudonnet, H. and Artur, Y. (2005) Characterization of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases in the rat olfactory mucosa. *Drug Metab Dispos*, 33(8), pp. 1229-37.
- Morris, J. B. (2013) Nasal dosimetry of inspired naphthalene vapor in the male and female B6C3F1 mouse. *Toxicology*, 309, pp. 66-72.
- Nagashima, A. and Touhara, K. (2010) Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *J Neurosci*, 30(48), pp. 16391-8.
- Nara, K., Saraiva, L. R., Ye, X. and Buck, L. B. (2011) A large-scale analysis of odor coding in the olfactory epithelium. *J Neurosci*, 31(25), pp. 9179-91.
- Oka, Y., Takai, Y. and Touhara, K. (2009) Nasal airflow rate affects the sensitivity and pattern of glomerular odorant responses in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, 29(39), pp. 12070-8.
- Rayne, S. and Forest, K. (2011) Estimated carboxylic acid ester hydrolysis rate constants for food and beverage aroma compounds. *Natue precedings*, doi:10.1038/npre.2011.6471.1.

- Robinson, D. A., Bogdanffy, M. S. and Reed, C. J. (2002) Histochemical localisation of carboxylesterase activity in rat and mouse oral cavity mucosa. *Toxicology*, 180(3), pp. 209-20.
- Schoumacker, R., Robert-Hazotte, A., Heydel, J. M., Faure, P. and Le Quere, J. L. (2016) Real-time monitoring of the metabolic capacity of ex vivo rat olfactory mucosa by proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS). *Anal Bioanal Chem.*
- Thiebaud, N., Veloso Da Silva, S., Jakob, I., Sicard, G., Chevalier, J., Menetrier, F., Berdeaux, O., Artur, Y., Heydel, J. M. and Le Bon, A. M. (2013) Odorant metabolism catalyzed by olfactory mucosal enzymes influences peripheral olfactory responses in rats. *PLoS One*, 8(3), pp. e59547.
- Wei, Z., Xu, Z., Li, B. and Xu, F. (2013) Numerical simulation of airway dimension effects on airflow patterns and odorant deposition patterns in the rat nasal cavity. *PLoS One*, 8(10), pp. e77570.
- Zacccone, E. J., Goldsmith, W. T., Shimko, M. J., Wells, J. R., Schwegler-Berry, D., Willard, P. A., Case, S. L., Thompson, J. A. and Fedan, J. S. (2015) Diacetyl and 2,3-pentanedione exposure of human cultured airway epithelial cells: Ion transport effects and metabolism of butter flavoring agents. *Toxicol Appl Pharmacol*, 289(3), pp. 542-9.
- Zhao, K., Dalton, P., Yang, G. C. and Scherer, P. W. (2006) Numerical modeling of turbulent and laminar airflow and odorant transport during sniffing in the human and rat nose. *Chem Senses*, 31(2), pp. 107-18.
- Zhao, K., Scherer, P. W., Hajiloo, S. A. and Dalton, P. (2004) Effect of anatomy on human nasal air flow and odorant transport patterns: implications for olfaction. *Chem Senses*, 29(5), pp. 365-79.

En conclusion, nous avons montré à l'aide de la technique que nous avons développée de PTR-MS en continu, la biotransformation immédiate d'un odorant en présence d'une muqueuse olfactive de rat et concomitamment, la production quasi immédiate de son métabolite (significativité obtenue après seulement 2,5 secondes, qui correspondent au temps estimé pour parcourir le volume mort du dispositif). Cette méthode mise au point sur la molécule modèle d'acétate d'éthyle a été ensuite validée sur une molécule à connotation grasse : la 2,3-pentanedione. En effet, nous avons pu mettre en évidence l'apparition des deux métabolites de cette molécule en présence d'une muqueuse olfactive de rat qui sont : la 2-hydroxy-3-pentanone et la 3-hydroxy-2-pentanone.

Le métabolisme d'autres molécules a été étudié et fait l'objet de compléments de résultats de cette partie. Ces résultats complémentaires ont à nouveau deux objectifs : (1) valider la méthodologie présentée dans l'article 4 et (2) apporter une meilleure compréhension du métabolisme de molécules à connotation grasse. Les molécules utilisées pour les résultats complémentaires sont la 2,3-hexanedione, la 3,4-hexanedione et la 2-acetoxy-3-butanone. La méthode de mesure du métabolisme de la muqueuse olfactive du rat a été similaire à celle présentée dans l'article 4 ci-dessus.

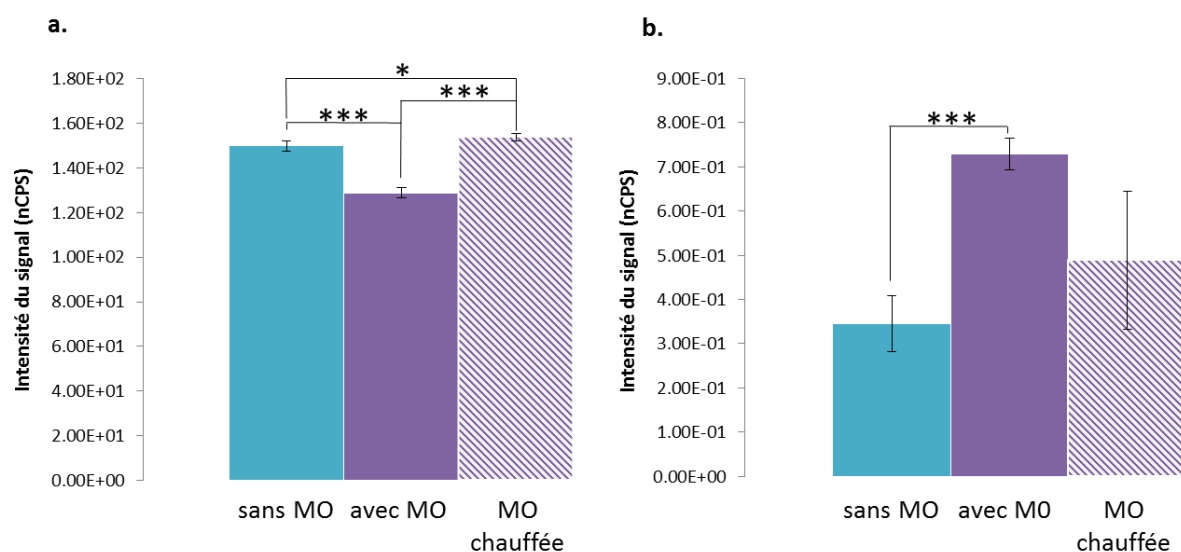
## 2.2. Résultats complémentaires

Tout comme dans l'article 4, les résultats des molécules présentés dans cette partie résultent de la moyenne du signal sur 30 secondes au plateau, soit 1 minute 30 après ouverture du circuit de l'odorant et de la mise en contact avec la muqueuse olfactive. Contrairement au signal obtenu de manière discontinue, le signal de la 2,3-hexanedione, de la 3,4-hexanedione et de la 2-acetoxy-3-butanone obtenue de manière continue n'a pas présenté de saturation au niveau du détecteur. En effet, les concentrations des odorants étudiés ont été réduites permettant en outre de se rapprocher des conditions physiologiques.

### 2.2.1. 2,3-hexanedione

Le signal de la 2,3-hexanedione ( $MH^+$ ,  $m/z = 115,075$ ) dans le piège en verre contenant la muqueuse olfactive de rat est significativement inférieur à celui sans MO et ce, malgré un apport continu de la molécule à 5 ppb (Figure 48a). En parallèle la Figure 48b met en évidence la production significative d'un ion de masse,  $m/z = 117,091$  pourrait être attribué au pic  $MH^+$  d'un métabolite produit dans le circuit contenant la muqueuse. L'inactivation des enzymes de la muqueuse olfactive du rat par chauffage n'entraîne pas de diminution du signal de la 2,3-hexanedione en comparaison au témoin

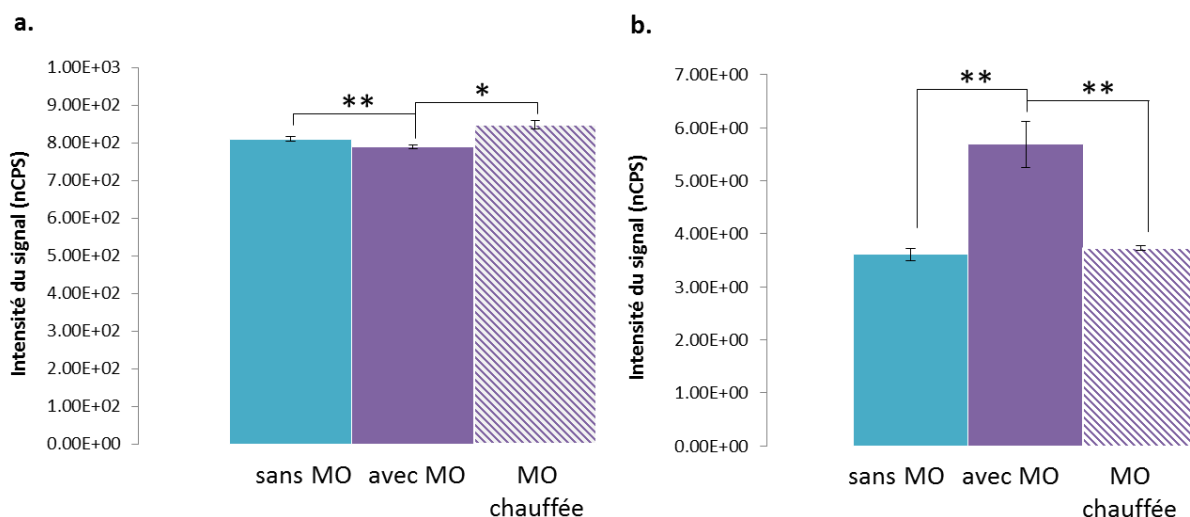
sans muqueuse. Ce résultat signifie que cette molécule n'est plus métabolisée et par conséquent aucune production de métabolite ne peut être observée (Figure 48b).



**Figure 48 : a. Signal de la 2,3-hexanedione (MH<sup>+</sup>, m/z = 115,075) et b. Signal du métabolite de la 2,3-hexanedione (MH<sup>+</sup>, m/z = 117,091).** Ces données ont été obtenues par PTR-MS suite au passage de l'odorant dans le circuit contrôle sans muqueuse (sans MO, n = 16), dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat (avec MO, n = 5) et dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat chauffée (MO chauffée, n = 3). L'odorant est apporté en continu dans l'un ou dans l'autre circuit à la concentration de 5 ppb en phase gazeuse. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond, et tiennent compte de la contribution isotopique <sup>18</sup>O de l'isotopologue de l'hexanedione (MH<sup>+</sup>, m/z = 117,080) pour le calcul du métabolite. Les histogrammes représentent les données moyennées ± SEM. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (test de Student).

### 2.2.2. 3,4-hexanedione

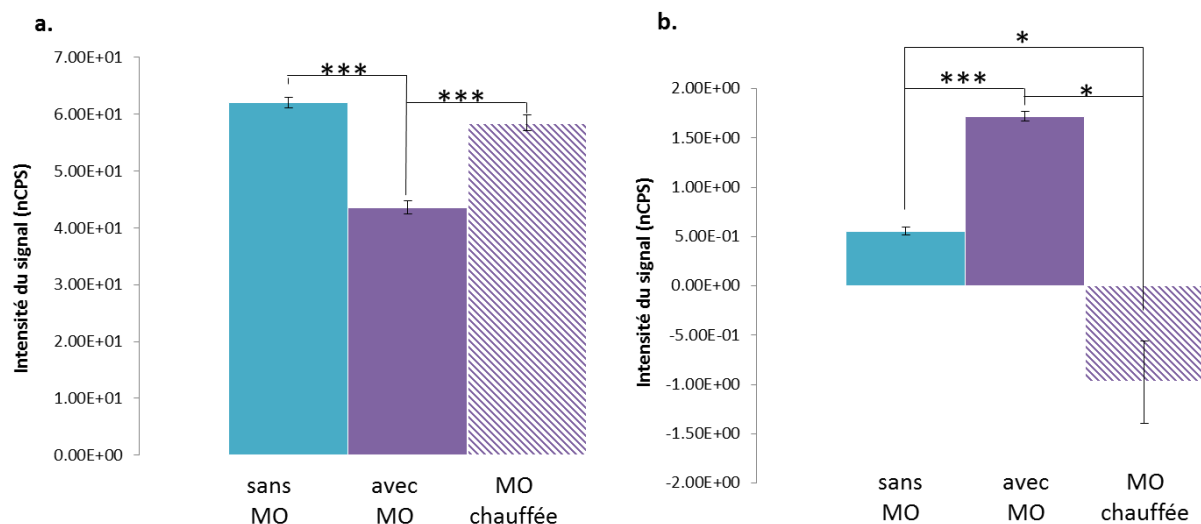
De la même manière, le signal de la 3,4-hexanedione (MH<sup>+</sup>, m/z = 115,075) dans le piège en verre contenant la muqueuse olfactive de rat est significativement inférieur au contrôle sans MO (circuit contrôle) et ce, malgré un apport continu de la molécule à 50 ppb en phase gazeuse (Figure 49a). Parallèlement, un métabolite de masse MH<sup>+</sup>, m/z = 117,091 est produit dans le circuit contenant la muqueuse (Figure 49b). A nouveau, l'inactivation des enzymes de la muqueuse olfactive du rat par chauffage n'entraîne pas de diminution du signal de la 3,4-hexanedione et par conséquent n'augmente pas la production de son métabolite (Figure 49a et 49b).



**Figure 49 : a. Signal de la 3,4-hexanedione (MH<sup>+</sup>, m/z = 115,075) et b. Signal du métabolite de la 3,4-hexanedione (MH<sup>+</sup>, m/z = 117,091).** Ces données ont été obtenues par PTR-MS suite au passage de l'odorant dans le circuit contrôle sans muqueuse (sans MO, n = 16), dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat (avec MO, n = 5) et dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat chauffée (MO chauffée, n = 3). L'odorant est apporté en continu dans l'un ou dans l'autre circuit à une concentration de 50 ppb en phase gazeuse. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond, et tiennent compte de la contribution isotopique <sup>18</sup>O de l'isotopologue de l'hexanedione (MH<sup>+</sup>, m/z = 117,08) pour le calcul du métabolite. Les histogrammes représentent les données moyennées ± SEM. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (test de Student).

### 2.2.3. 2-acetoxy-3-butanone

Les résultats observés sur les deux molécules précédentes sont confirmés par ceux obtenus sur la 2-acetoxy-3-butanone. En effet, le signal de la 2-acetoxy-3-butanone (MH<sup>+</sup>, m/z = 131,070) dans le piège en verre contenant la muqueuse olfactive de rat est significativement inférieur au contrôle sans MO (circuit contrôle) et ce, malgré un apport continu de la molécule à 1 ppb en phase gazeuse (Figure 50a). Comme pour les molécules précédentes, un métabolite est détecté. Celui-ci de masse MH<sup>+</sup>, m/z = 87,04 est produit dans le circuit contenant la muqueuse (Figure 50b). L'inactivation des enzymes de la muqueuse olfactive du rat par chauffage n'entraîne pas de diminution du signal de la 2-acetoxy-3-butanone et par conséquent n'augmente pas la production de son métabolite (Figure 50a et 50b).



**Figure 50** : a. Signal de 2-acetoxy-3-butanone (MH<sup>+</sup>, m/z = 131,070) et b. Signal du métabolite de la 2-acetoxy-3-butanone (MH<sup>+</sup>, m/z = 87,04). Ces données ont été obtenues par PTR-MS suite au passage de l'odorant dans le circuit contrôle sans muqueuse (sans MO, n = 16), dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat (avec MO, n = 5) et dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat chauffée (MO chauffée, n = 3). L'odorant est apporté en continu dans l'un ou dans l'autre circuit à une concentration de 1 ppb en phase gazeuse. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond. Les histogrammes représentent les données moyennées ± SEM. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (test de Student).

### 2.3. Discussion et conclusion

Nous avons mis au point une nouvelle méthode permettant de suivre l'évolution en temps réel du métabolisme d'un odorant de manière continue et ce, dès la mise en contact de l'odorant avec la muqueuse olfactive de rat. Cette technique, qui a montré la rapidité de la biotransformation des molécules odorantes par la muqueuse olfactive de rat, a également permis de mettre en évidence l'apparition d'un métabolite volatil pour chacune des molécules étudiées. En effet, l'apparition d'un métabolite volatil a été significativement différente du témoin sans muqueuse en moins de 2,5 secondes, ce qui correspond environ au temps nécessaire pour l'odorant à parcourir le volume mort du dispositif. L'utilisation d'une muqueuse chauffée, pour laquelle les enzymes ont été inactivées, a confirmé l'intervention des enzymes dans le système olfactif.

Ainsi, le développement de cette méthode du suivi du métabolisme de la MO du rat par PTR-MS en continu a bien permis de répondre à l'hypothèse de l'extrême rapidité du système enzymatique présent dans la MO et de la production de métabolites volatils. Il reste maintenant à identifier les métabolites produits.

### 3. Identification des métabolites produits

L'objectif de cette partie était d'identifier les métabolites produits par la muqueuse olfactive du rat par une technique de chromatographie en phase gazeuse couplée avec un détecteur de spectrométrie de masse. Pour ce faire, les métabolites ont été pré-concentrés sur une fibre de micro extraction sur phase solide (SPME).

#### 3.1. Matériels et Méthodes

La méthode utilisée pour identifier après pré-concentration les métabolites produits par la muqueuse olfactive du rat en présence d'une molécule odorante a été décrite dans l'article 4. Par ailleurs, il a été vérifié que les indices de rétentions des molécules odorantes et des métabolites produits correspondent aux indices de références.

#### 3.2. Conclusion des résultats de l'article 4

Cette technique a permis d'identifier deux métabolites de la 2,3-pentanedione produits en présence d'une muqueuse olfactive de rat : la 2-hydroxy-3-pentanone et la 3-hydroxy-2-pentanone (article 4). Ces deux métabolites identifiés par CPG-MS correspondent bien à l'ion  $[MH^+]$  observé en PTR-MS, à la masse  $m/z = 103,075$ . Nos résultats sont en accords avec ceux de Avila et al. (2006) qui ont identifié ces deux molécules dans des fromages.

#### 3.3. Résultats complémentaires

C'est en suivant la même méthodologie, que les métabolites de la 2,3-hexanedione, de la 3,4-hexanedione et de la 2-acetoxy-3-butanone ont été identifiés. Le chromatogramme de la Figure 51 qui représente le métabolisme de la 2,3-hexanedione 30 minutes après injection de l'odorant à 1 ppm sur la muqueuse olfactive de rat et pré-concentration sur une fibre SPME montre la présence de deux métabolites : M1 et M2 et d'une quantité résiduelle de 2,3-hexanedione de départ.



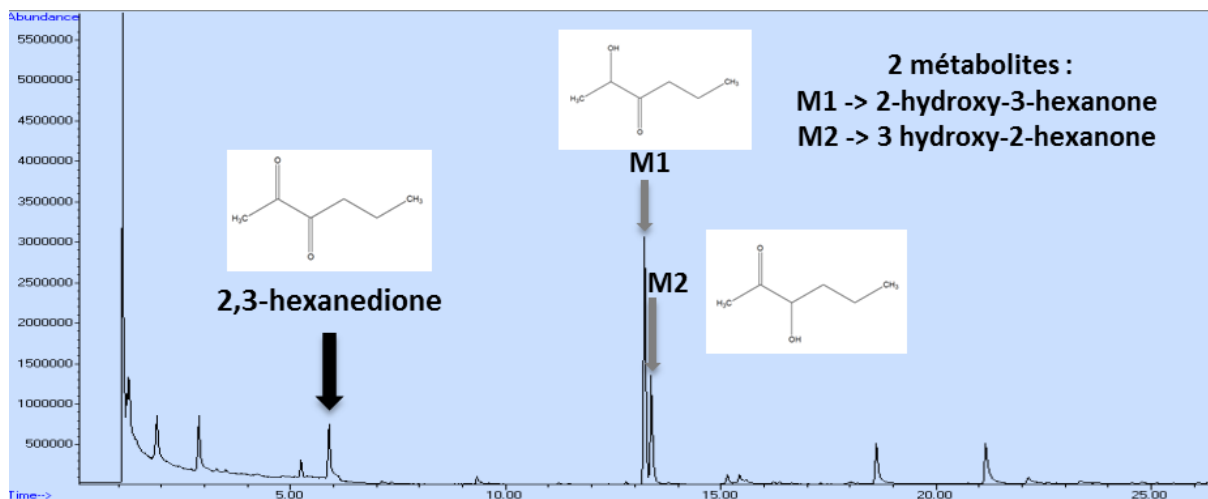


Figure 51 : Chromatogramme représentant le métabolisme de la 2,3-hexanedione 30 minutes après injection de l'odorant à 1ppm en phase gaz dans le flacon contenant une muqueuse olfactive de rat.

Les spectres des métabolites obtenus en CPG-MS sont similaires aux spectres de référence trouvés dans la littérature pour la 2-hydroxy-3-hexanone et la 3-hydroxy-2-hexanone (Figures 52 et 53). Les ions majoritaires de la 2-hydroxy-3-hexanone sont 43, 45, 55, 71 et 73. Les ions majoritaires de la 3-hydroxy-2-hexanone sont 43, 55 et 73. Les identifications de ces deux métabolites de masse 116 (Figures 52 et 53) correspondent bien à la masse  $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$  identifiée au PTR-MS, les deux isomères ne pouvant pas être séparés par la technique.

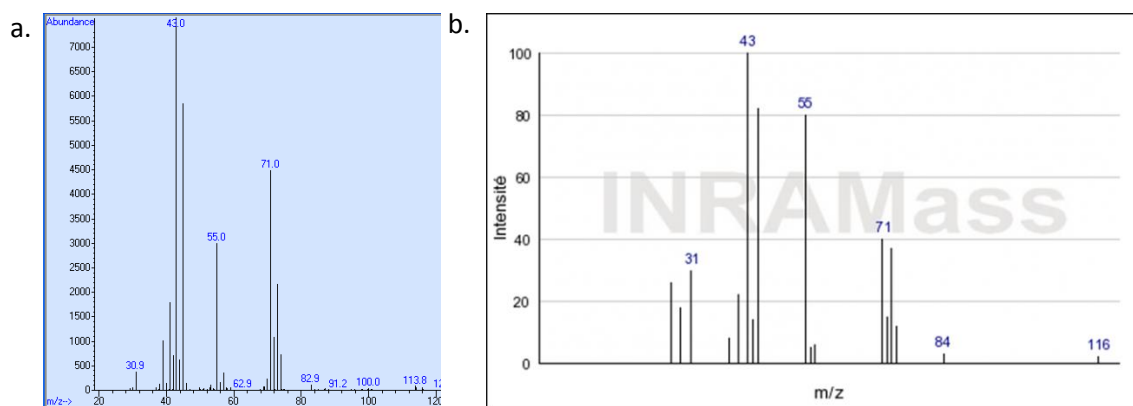


Figure 52 : a. Spectre du métabolite M1 de la 2,3-hexanedione obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence de la 2-hydroxy-3-hexanone (INRA Mass).

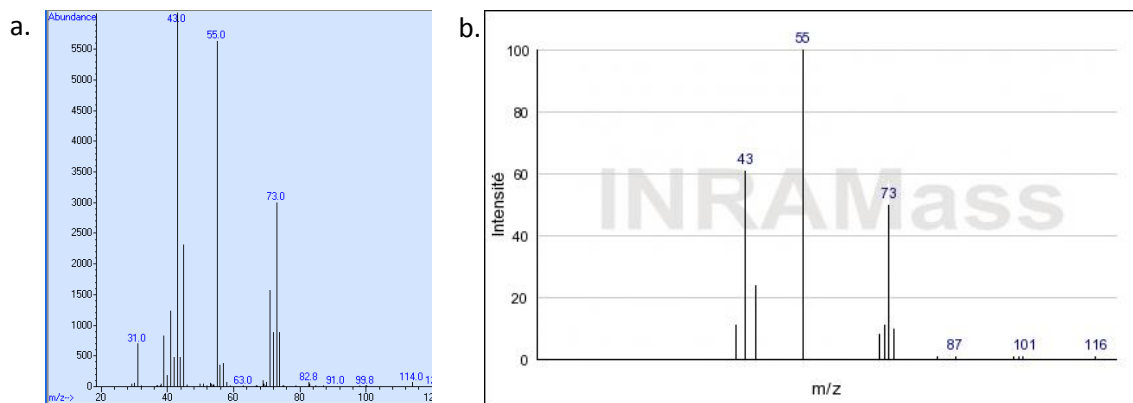


Figure 53 : a. Spectre du métabolite M2 de la 2,3-hexanedione obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence de la 3-hydroxy-2-hexanone (INRAMass).

De par sa structure parfaitement symétrique, la 3,4-hexanedione ne produit qu'un seul métabolite, probablement la 4-hydroxy-3-hexanedione de masse 116 (Figure 54) correspondant à la masse  $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$  détectée en PTR-MS.

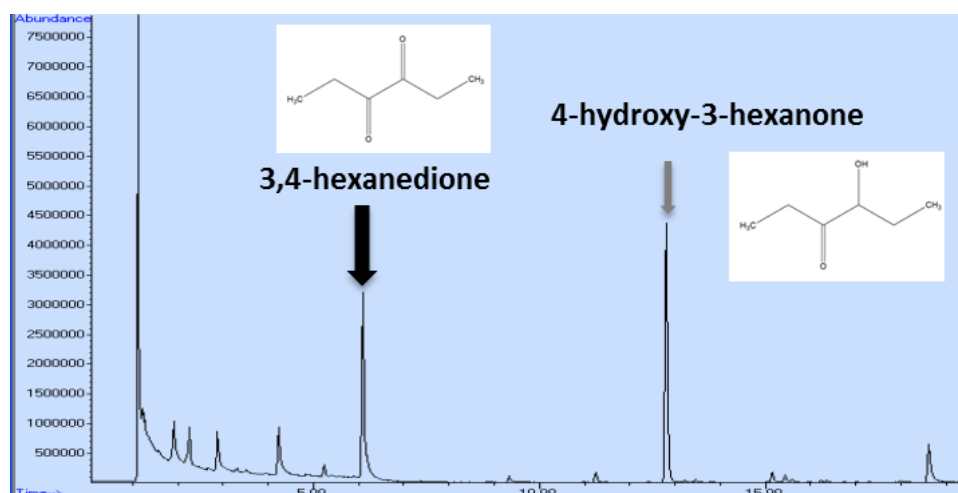


Figure 54 : Chromatogramme représentant le métabolisme de la 3,4-hexanedione 30 minutes après injection de l'odorant à 1 ppm en phase gazeuse dans le flacon contenant une muqueuse olfactive de rat.

En effet, le spectre du métabolite obtenu en CPG-MS est similaire au spectre répertorié dans la banque de spectres de masse NIST 08 pour la 4-hydroxy-3-hexanone (Figure 55). Les ions majoritaires de la 4-hydroxy-3-hexanone sont les ions 59, 57, 31 et 41. L'identification de ce métabolite de masse 116 (Figure 55) correspond bien à la masse  $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$  identifiée en PTR-MS.

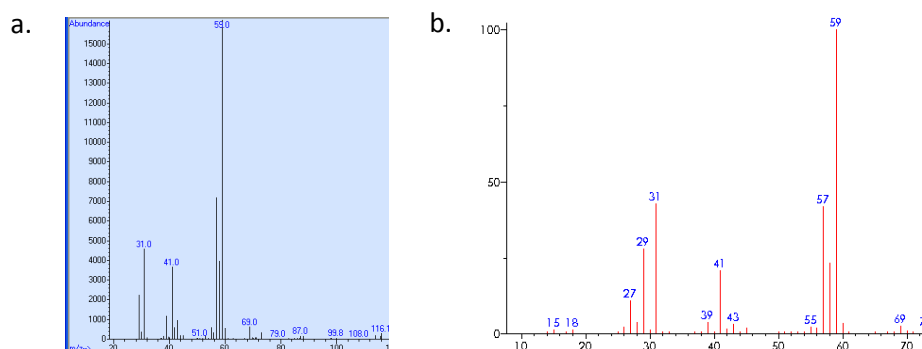


Figure 55 : a. Spectre du métabolite de la 3,4-hexanedione obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence de la 4-hydroxy-3-hexanone (NIST 08).

De façon similaire, le métabolite de la 2-acétoxy-3-butanone (Figure 56) qui donne un ion à  $m/z = 87.04$  au PTR-MS, attribué au  $MH^+$  d'une molécule de masse 86, correspond au diacétyle identifié par CPG-MS (Figure 57). Son spectre obtenu en CPG-MS est similaire au spectre de référence très caractéristique du diacétyle constitué essentiellement des ions majoritaires 43 et 86 (Figure 57). Un second métabolite de la 2-acétoxy-3-butanone uniquement identifié en CPG-MS (Figure 58) par son spectre de masse identique au spectre de référence correspond à l'acétoïne (Figure 58). Les ions majoritaires de l'acétoïne sont les ions 45, 43 et 88 (Figure 58). La technique de PTR-MS n'a permis d'observer qu'un seul métabolite : le diacétyle. En CPG-MS, un deuxième métabolite, l'acétoïne, s'accumule pendant que le diacétyle disparaît. Ce second métabolite pourrait donc résulter du métabolisme secondaire du diacétyle ayant eu lieu durant les 30 minutes d'exposition de la MO au 2-acétoxy-3-butanone dans le flacon. Tandis qu'en PTR-MS, l'apport de l'odorant se faisant en continu, la plus grande partie du diacétyle serait éliminée par le flux d'aspiration de l'appareil avant de pouvoir être à son tour métabolisée.

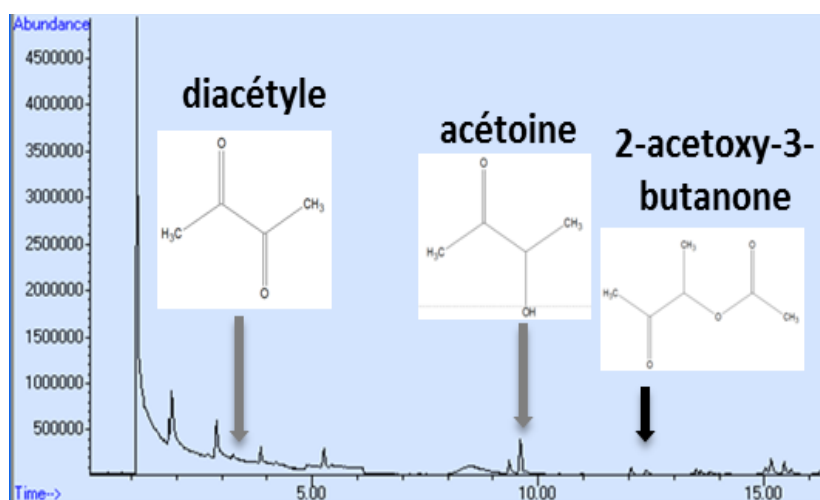


Figure 56 : Chromatogramme représentant le métabolisme de la 2-acétoxy-3-butanone 30 minutes après injection de l'odorant à 1 ppm en phase gazeuse dans le flacon contenant une muqueuse olfactive de rat.

Au final, après 30 minutes d'exposition avec la muqueuse olfactive de rat, la 2-acetoxy-3-butanone injectée dans le flacon est quasiment totalement métabolisée (Figure 56) ce qui est en adéquation avec la faible quantité de diacétyle retrouvée et l'accumulation de l'acétoïne. Enfin, les autres pics observés sur ce chromatogramme correspondent aux impuretés apportés par la fibre ou la muqueuse de rat.

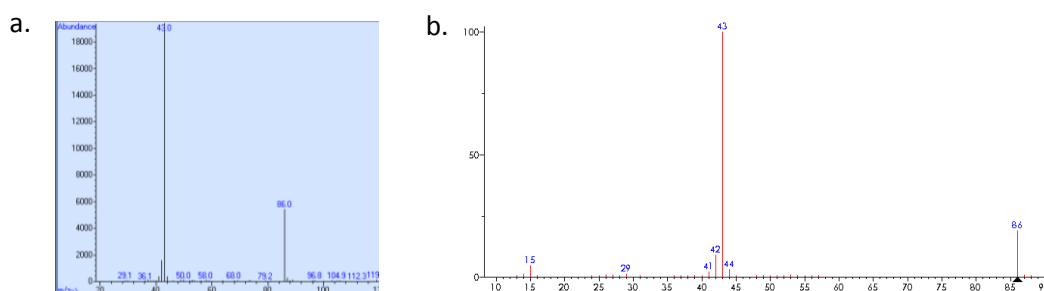


Figure 57 : a. Spectre du premier métabolite de la 2-acetoxy-3-butanone obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence du diacétyle (NIST 08).

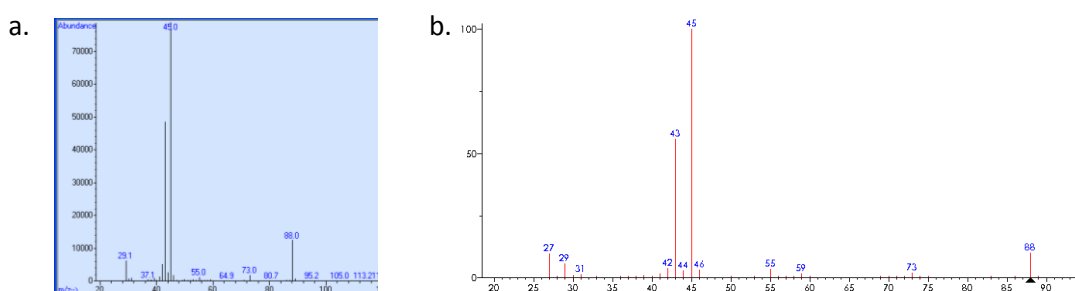


Figure 58 : a. Spectre du second métabolite de la 2-acetoxy-3-butanone obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence de l'acétoïne (NIST 08).

Il a été montré que le diacétyle pouvait être biotransformé en acétoïne par l'action de l'enzyme dicarbonyl l-xylulose reductase (DCXR) (Nakagawa et al., 2002, Zaccone et al., 2015). Tout comme pour la molécule de 2,3-pentanedione (en cours de rédaction), des inhibiteurs ont été testés afin de déterminer les enzymes intervenants dans la biotransformation de la 2-acetoxy-3-butanone. Considérant les réactions enzymatiques obtenues, la biotransformation de la 2-acetoxy-3-butanone en diacétyle pourrait provenir de l'activité de cytochromes P450. Nous avons donc essayé d'inhiber l'activité des cytochromes P450 avec le métyrapone. Par ailleurs, il a été montré que le meilleur inhibiteur de DCXR est l'acide butyrique (Nakagawa et al., 2002). Dans notre étude, la mise en contact d'une muqueuse olfactive de rat dans un flacon contenant 0,1 ppm de 2-acetoxy-3-butanone avec 100  $\mu$ L de métyrapone (100 mM) réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'article 4 n'engendre pas de diminution du diacétyle en CPG-MS. Pour des raisons de disponibilité du tissu biologique, aucun autre inhibiteur n'a été testé pour tenter d'inhiber la production de diacétyle. En revanche, la biotransformation du diacétyle en acétoïne n'est plus active en présence de 100  $\mu$ L

d'acide butyrique (100 mM) ce qui confirmerait l'activité de la réductase DCXR dans cette seconde transformation. La métabolisation de la 2-acétoxy-3-butanone dans la muqueuse olfactive du rat apparaît donc plus complexe que celle des dicétones qui semble clairement mettre en jeu une enzyme de type dicarbonyl l-xylulose reductase (DCXR), comme montré récemment dans une étude portant sur des cellules épithéliales du tissu pulmonaire exposées au diacétyl et à la 2,3-pentanedione (Zaccone et al., 2015). Concernant la production de diacétyl à partir de la 2-acétoxy-3-butanone, nous n'avons actuellement pas élucidé quelle enzyme était impliquée dans ce métabolisme mais nous avons montré que la biotransformation de ce diacétyl en acétoïne était réalisée par DCXR.

### 3.1. Conclusion

La technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse combinée à la technique d'extraction SPME a permis l'identification des composés volatils métabolisés par la muqueuse olfactive du rat observés au PTR-MS. La muqueuse olfactive du rat reste active au moins pendant 45 minutes après dissection. Ce modèle animal s'avère donc particulièrement intéressant pour étudier le métabolisme de la MO en présence d'une molécule odorante. A présent, il serait intéressant de développer une méthode pour étudier la biotransformation des molécules odorantes chez l'Homme.

## 4. Et l'homme dans tout cela ?

Un travail important a été réalisé pour adapter les techniques appliquées à la muqueuse olfactive prélevée chez le rat, à l'Homme. En effet, pour travailler chez l'Homme et pour des raisons évidentes, nous n'avons pas pu opter pour un prélèvement de la muqueuse olfactive. Aussi avons-nous été confrontés à deux difficultés majeures: (1) l'apport de l'odorant au niveau de la muqueuse des sujets et (2) la mesure de la biotransformation des molécules odorantes au niveau de cette muqueuse. L'odorant a été apporté au niveau de la MO de l'Homme en utilisant différentes approches (utilisation d'un « gas bag », d'une seringue à gros volumes ou d'un flacon en mode « headspace dynamique »). Seule la technique d'administration retenue finalement pour son caractère le plus opérationnel sera décrite dans la suite de cette thèse.

L'objectif du travail présenté par la suite est de pouvoir mesurer de manière continue et en temps réel le métabolisme d'une molécule odorante par la muqueuse olfactive de l'Homme.

## 4.1. Matériels et Méthodes

Pour apporter l'odorant au niveau de la muqueuse olfactive humaine et en mesurer la biotransformation, nous avons décidé d'utiliser un dispositif d'analyse du « nosespace » couplé au PTR-MS. Une partie du travail de thèse a donc été de participer au développement d'une nouvelle interface pour les analyses de « nosespace ».

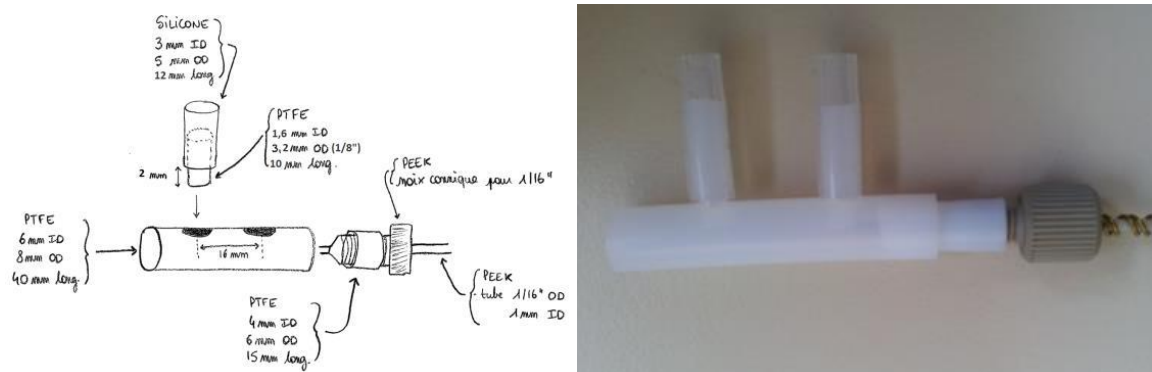
### 4.1.1. Dispositif de prélèvement de l'air expiré par le sujet

Dans des études réalisées au laboratoire qui avaient pour objectif de suivre la libération des molécules au cours de la consommation d'une matrice alimentaire (« nosespace »), les expérimentateurs ont longtemps utilisé un dispositif particulier à partir d'une ligne de transfert munie à son extrémité d'une canule en plastique. Cette canule est placée au niveau de la narine du sujet (Figure 59). Même si ce dispositif présente l'avantage de suivre les effluves nasals de manière directe et en continu, il entraîne un manque d'aisance dans les mouvements du sujet dû à la position fixe du cône. Dans certains cas, la consommation du produit par le juge sans pouvoir bouger la tête peut être problématique (consommation d'une boisson, d'un fromage etc...). Partant de ce constat, un nouvel outil de prélèvement de l'air expiré par les sujets qui pourrait être utilisé au cours de la consommation de tout produit alimentaire a été développé.



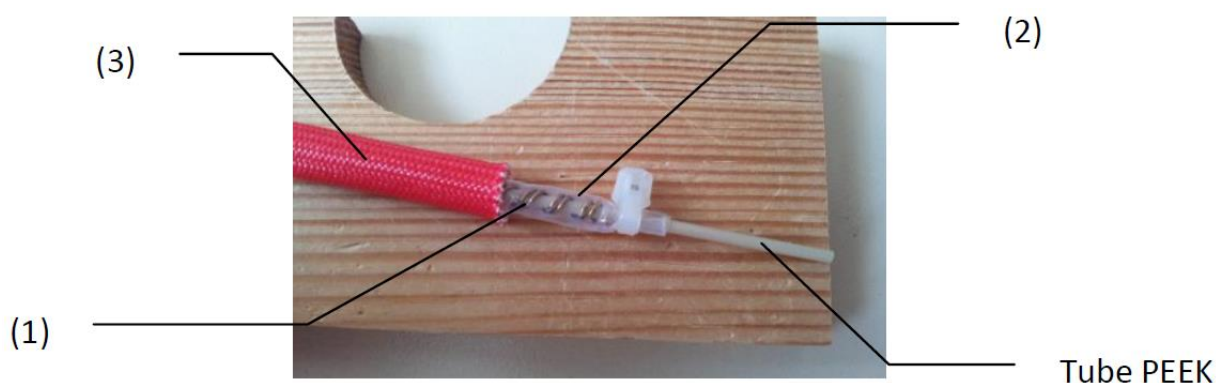
**Figure 59 : Photo du dispositif de prélèvement du « nosespace » couplé au PTR-MS utilisant une « canule » placée dans une narine d'un sujet.**

Le nouveau dispositif est composé d'un embout nasal, d'une ligne de transfert chauffée et d'un support comme présenté ci-dessous. Le tout est porté par un casque très léger qui va offrir au dégustateur un confort et une liberté de mouvements.



**Figure 60 : Schéma et photo de l'embout nasal en PTFE du nouveau dispositif de prélèvement des effluves nasals « nosespace ».**

Les effluves nasals sont prélevés sur les deux narines du sujet via l'embout nasal (Figure 60) en PolyTétraFluoroEthylène (PTFE), matériel connu pour son inertie face aux composés d'arômes. Les embouts verticaux en PTFE sont emboutis dans la pièce principale et recouvert d'une protection en silicone pour le confort du sujet. La ligne de transfert souple connectée à ce dispositif et reliée à la ligne de transfert chauffée du PTR-MS est également chauffée pour éviter la condensation de l'air expiré par le sujet tout en permettant le maintien d'un signal stable. Le système développé se compose : (1) d'un fil résistif en cupronickel (constantan)  $\varnothing$  0,08 mm, bobiné en double autour d'un tube de PEEK (L 0,75 m x  $\varnothing$  1/16", diamètre intérieur 1 mm) et permettant de le chauffer, (2) d'une gaine thermorétractable en PTFE, isolant thermiquement le système, (3) d'une seconde gaine isolante en fibres de verre recouverte de PTFE et d'une alimentation électrique réglable (4,5 à 12 V – 1,2 A max.) (Figure 61). Une tension de 6 V et un courant de 1 A sont appliqués pour obtenir une température d'environ 75°C à l'intérieur du tube PEEK. La présence d'une gaine isolante et les faibles valeurs de tension et de courant écartent tout danger pour le sujet.



**Figure 61 : Détail de la ligne de transfert souple du nouveau dispositif de prélèvement du « nosespace ».**

Un casque réglable positionné sur la tête des sujets ainsi qu'un arceau en inox permettent de maintenir l'embout nasal à l'entrée des narines (Figure 62). L'arceau fixé sur le casque est réglable en

hauteur et en profondeur. De la même manière, l'embout nasal peut pivoter sur lui-même et autour de l'axe en inox pour un positionnement optimal et confortable au niveau des narines du sujet. Ainsi, ce nouveau dispositif qui est désormais systématiquement utilisé dans les études de nosespace menées au laboratoire s'adapte parfaitement à la physionomie des sujets tout en permettant une liberté de mouvements.



**Figure 62 : Casque support avec embout nasal et système de chauffage pour prélèvement des effluves nasals en vue d'une analyse du « nosespace » d'un sujet.**

#### **4.1.2. Système d'apport des molécules odorantes dans la cavité nasale de l'Homme**

En utilisant ce système de « nosespace », il est possible d'apporter un flux de composés odorants à l'une des extrémités de l'embout nasal. Le montage suivant (Figure 63) a donc été mis au point pour (1) apporter les molécules odorantes dans la cavité nasale des sujets et (2) analyser leur métabolisme à l'aide du PTR-MS.



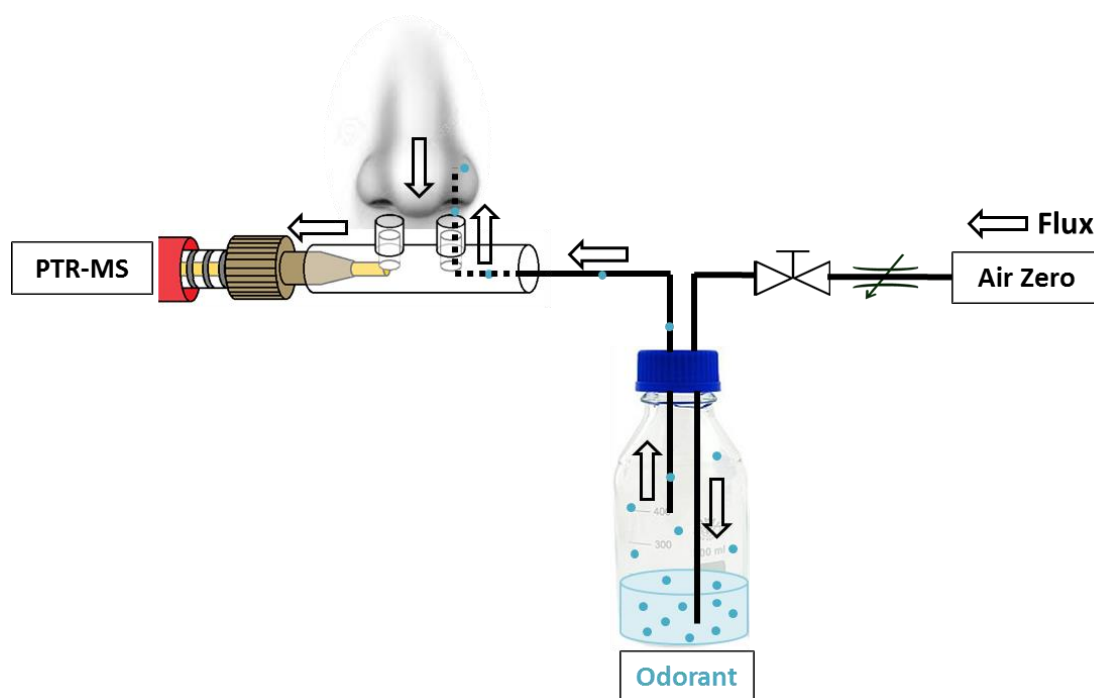


Figure 63 : Schéma du montage développé pour le suivi du métabolisme des molécules odorantes *in vivo* par PTR-MS.

Un flux d'air zéro est apporté dans un flacon (500 mL) contenant l'odorant en solution (100 mL) pour forcer le passage des molécules de la phase liquide vers la phase gazeuse. Ce dispositif permet d'obtenir une concentration importante de l'odorant sous forme gazeuse. Une vanne fine en amont du flacon permet de régler le débit de l'odorant. Une vanne d'arrêt permet d'ouvrir et de fermer le circuit. Chaque molécule odorante d'intérêt a été étudiée indépendamment. Les concentrations en phase liquide ont été de 700ppm pour la 2,3-pentanedione, la 2,3-hexanedione et la 3,4-hexanedione. La concentration délivrée dans la phase gazeuse était alors de l'ordre du ppm en régime stationnaire. Cette concentration correspondait à un niveau perceptif confortable par le sujet et donne un niveau de signal perceptible au PTR-MS. Le PTR-MS aspirait continuellement l'air présent dans la cavité nasale à un débit constant fixé à 377 mL/min.

A son arrivée, le sujet s'installait confortablement avec l'embout nasal positionné dans ses narines au plus près de la muqueuse olfactive. Il était demandé au sujet de respirer de la manière la plus naturelle possible. Chaque acquisition débutait par une mesure d'une minute au PTR-MS sans apporter d'odorant, suivie de deux minutes d'apport en continu de l'odorant puis d'une nouvelle minute sans odorant permettant au signal de revenir à son niveau de base. La vitesse de scan a été fixée à 108 ms pour cette étude réalisée chez l'Homme. Les autres paramètres de l'appareil ont été similaires à ceux décrits dans l'article 2. Les molécules odorantes étudiées et leurs métabolites de masse :  $MH^+$ ,  $m/z = 101,059$  (2,3-pentanedione) et  $MH^+$ ,  $m/z = 103,075$  (2-hydroxy-pentan-3-one et

3-hydroxy-pentan-2-one) pour l'étude de la 2,3-pentanedione ;  $MH^+$ ,  $m/z = 115,075$  (2,3-hexanedione) et  $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$  (2-hydroxy-hexan-3-one; 3-hydroxy-hexan-2-one) pour l'étude de la 2,3-hexanedione ;  $MH^+$ ,  $m/z = 115,075$  (3,4-hexanedione) et  $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$  (4-hydroxy-3-hexanone) pour l'étude de la 3,4-hexanedione, obtenus dans l'étude du métabolisme de la muqueuse olfactive du rat ont été suivis chez l'Homme. En effet, des essais préliminaires avaient montré l'absence d'autres métabolites à un niveau détectable.

#### 4.1.1. Traitement des données obtenues par PTR-MS

Les courbes représentant le profil de libération de la molécule odorante et celui du métabolite qui lui est associé ont été obtenues à partir des signaux représentant l'intensité (nCPS). Le signal observé a beaucoup fluctué à cause du cycle respiratoire du sujet que l'on arrive à suivre par le signal de l'acétone. Pour y remédier et pour lisser les courbes, chaque point expérimental du métabolite et de l'odorant étudié représente la moyenne des 20 scans qui ont précédé le maximum du pic d'acétone (marqueur de la respiration) d'un cycle respiratoire. Ainsi, il a été possible de visualiser le profil de libération de chaque odorant et de son métabolite associé sans les fluctuations dues aux cycles respiratoires. Pour l'ensemble des données, la contribution isotopique de  $^{18}O$  de l'isotopologue de chaque dicétone a été prise en compte même si elle reste très faible par rapport au signal du métabolite. Un test de Student a été utilisé pour déterminer le temps nécessaire pour produire significativement un métabolite après l'arrivée de la molécule odorante dans la cavité nasale de l'Homme.

#### 4.1.2. Identification des métabolites par CPG-MS

Les molécules odorantes et leur(s) métabolite(s) associé(s) ont d'abord été concentrés sur une fibre SPME placée dans une narine du sujet (Figure 64). Le montage permettant de véhiculer la molécule en phase gazeuse dans la cavité nasale des sujets a été similaire à celui décrit dans la partie précédente. Le temps de concentration sur la fibre a été de 1 minute, correspondant à une dizaine de cycles respiratoires. La méthode d'analyse par CPG-MS des molécules piégées sur la fibre SPME a été similaire à celle décrite dans l'article 4.

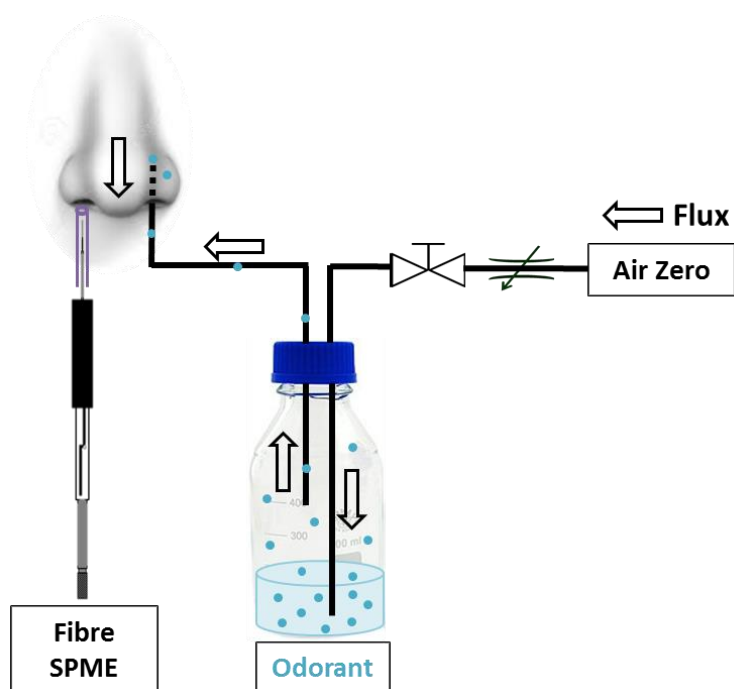
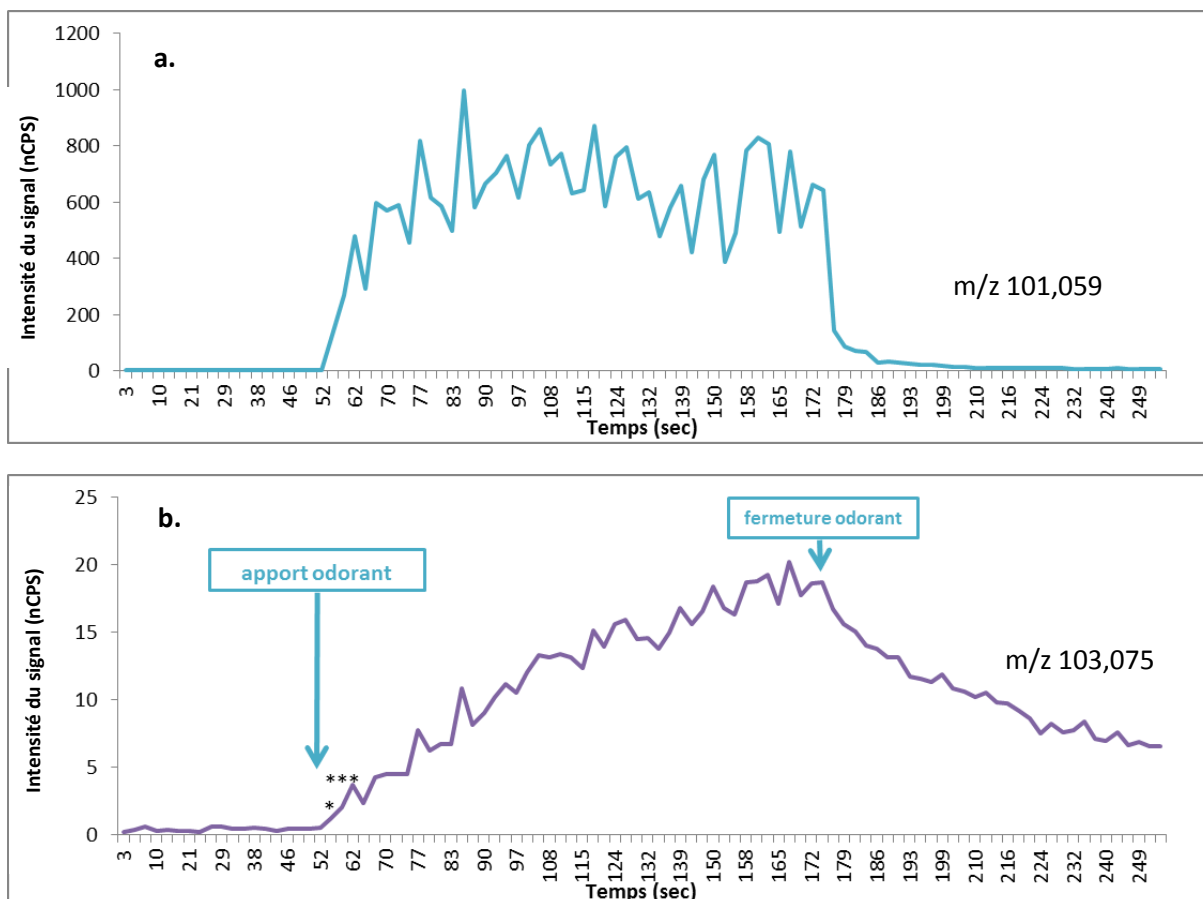


Figure 64 : Schéma du montage permettant la concentration des molécules exhalées par les sujets sur fibre SPME, après injection de l'odorant dans une narine.

## 4.2. Résultats

### 4.2.1. Suivi du métabolisme des odorants *in vivo* par PTR-MS

Après ouverture du circuit contenant la molécule odorante à 54 secondes, le signal de la 2,3-pentanedione augmente rapidement pour atteindre un plateau (Figure 65a). En effet, l'apport en continu de la molécule odorante atteint rapidement un régime stationnaire. La fermeture de la vanne d'arrêt à 175 secondes, entraîne la chute instantanée du signal de 2,3-pentanedione. En parallèle, la figure 65b, représente le profil de libération du métabolite  $MH^+$ ,  $m/z = 103,075$  provenant de la biotransformation de la 2,3-pentanedione par la muqueuse olfactive humaine. L'apport de la molécule odorante en continu se traduit par une augmentation du signal du métabolite jusqu'à fermeture de la vanne d'arrêt (Figure 65b). Après fermeture de cette vanne, la libération du métabolite diminue progressivement contrairement au signal de la 2,3-pentanedione qui chute brutalement. Ce résultat laisse supposer la poursuite de l'activité métabolique vis-à-vis des molécules de 2,3-pentanedione prises en charge par les EMOs dans la cavité nasale de l'Homme.



**Figure 65 : a. Mesure du signal en continu de la 2,3-pentanedione au PTR-MS ( $MH^+$ ,  $m/z = 101,059$ ) dans la cavité nasale d'un sujet entre 52 et 176 secondes et b. détection du métabolite de la 2,3-pentanedione ( $MH^+$ ,  $m/z = 103,075$ ) associée à l'apport en continu de l'odorant. Chaque point de la courbe représente la moyenne des 20 scans qui précèdent le maximum du pic d'acétone d'un cycle respiratoire. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  (test de Student).**

Les résultats de cette étude ont (1) révélé la production d'un métabolite volatil dans la cavité nasale humaine et (2) mis en évidence la rapidité de ce processus. En effet, 2 secondes ont été suffisantes pour observer de façon significative ( $p=0,028$ ) l'apparition du métabolite après l'arrivée de la 2,3-pentanedione dans la cavité nasale. Ce métabolite observé chez l'homme, correspond à celui obtenu chez le modèle animal, soit à la 2-hydroxy-3-pentanone ou à la 3-hydroxy-2-pentanone.

Les résultats observés sur la 2,3-pentanedione ont été confirmés avec deux autres molécules : la 2,3-hexanedione (Figure 66a) et la 3,4-hexanedione (Figure 66b). Concernant la 2,3-hexanedione, son apport en continu dans la cavité nasale atteint rapidement un plateau (Figure 66a). Tout comme pour la molécule précédente, la fermeture de la vanne d'arrêt se traduit par la chute instantanée du signal de l'odorant. En parallèle, l'apport de la 2,3-hexanedione dans la cavité nasale montre la production quasi instantanée (temps inférieur à 2 secondes,  $p=0,002$ ) de l'ion  $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$ . Cette molécule correspond au métabolite produit par la muqueuse olfactive du rat, soit la 2-hydroxy-3-hexanone ou la 3-hydroxy-2-hexanone.

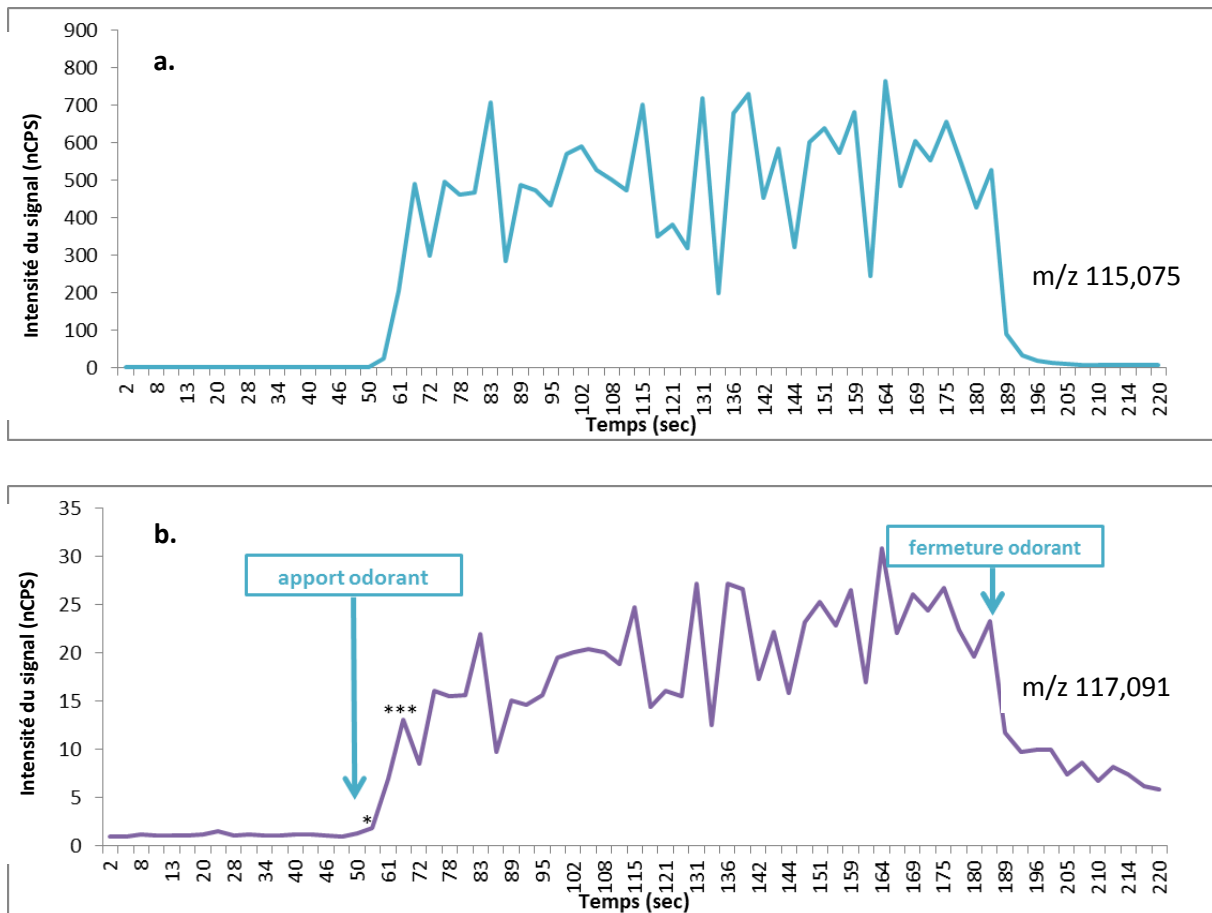


Figure 66 : a. Mesure du signal en continu de la 2,3-hexanedione au PTR-MS ( $MH^+$ ,  $m/z = 115,075$ ) dans la cavité nasale d'un sujet entre 52 et 189 secondes et b. détection du métabolite de la 2,3-hexanedione ( $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$ ) associée à l'apport en continu de l'odorant. Chaque point de la courbe représente la moyenne des 20 scans qui précèdent le maximum du pic d'acétone d'un cycle respiratoire. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  (test de Student).

Enfin, l'apport en continu de la 3,4-hexanedione dans la cavité nasale, se traduit aussi par un régime stationnaire (Figure 67a). Tout comme pour les autres molécules, la fermeture de la vanne d'arrêt se traduit par la chute instantanée du signal de l'odorant. En parallèle, l'apport de la 3,4-hexanedione dans la cavité nasale montre la production quasi instantanée (temps inférieur à 5 secondes,  $p < 0,001$ ) de l'ion  $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$  (Figure 67b). A nouveau, cette molécule correspond au métabolite produit par la muqueuse olfactive du rat, soit à la 4-hydroxy-3-hexanone.

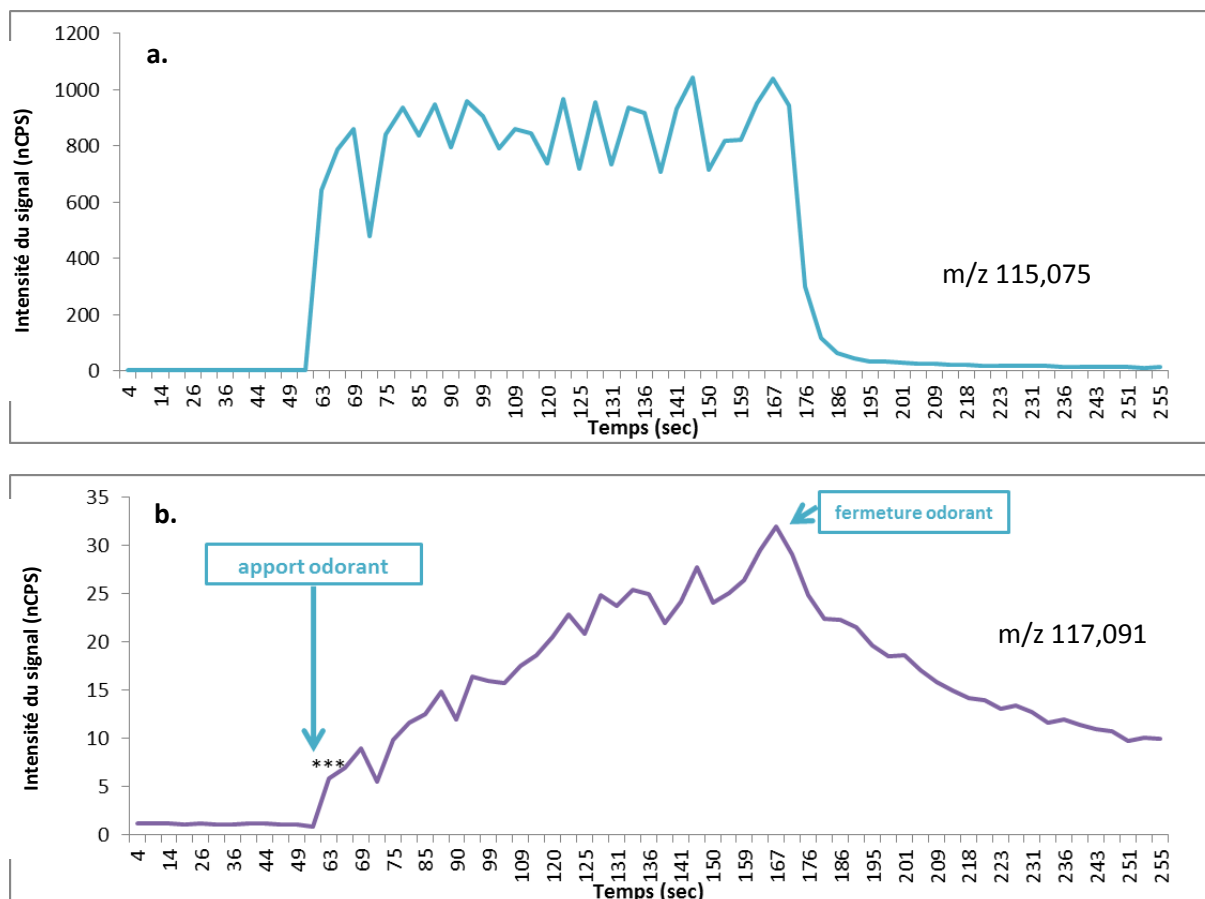


Figure 67 : a. Mesure du signal en continu de la 3,4-hexanedione au PTR ( $MH^+$ ,  $m/z = 115,075$ ) dans la cavité nasale d'un sujet entre 52 et 170 secondes et b. détection du métabolite de la 3,4-hexanedione ( $MH^+$ ,  $m/z = 117,091$ ) associée à l'apport en continu de l'odorant. Chaque point de la courbe représente la moyenne des 20 scans qui précèdent le maximum du pic d'acétone d'un cycle respiratoire. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  (test de Student).

#### 4.2.2. Identification des métabolites par CPG-MS

Le tableau 13 présente les métabolites identifiés en CPG-MS après concentration sur une fibre SPME dans la cavité nasale humaine suite à l'apport et à la biotransformation par les EMOs d'une molécule odorante d'intérêt.

Tableau 13 : Résumé des métabolites identifiés chez l'Homme par CPG-MS.

Odorant	Concentration en phase liquide	Métabolites produits en quantité notable et identifiés	
2,3-pentanedione	700 ppm	2-hydroxy-3-pentanone	3-hydroxy-2-pentanone
2,3-hexanedione	700 ppm	2-hydroxy-3-hexanone	3-hydroxy-2-hexanone
3,4-hexanedione	700 ppm	4-hydroxy-3-hexanone	
2-acetoxy-3-butanone	700 ppm	diacétyle	acétoïne

Les métabolites identifiés dans la cavité nasale de l'Homme sont les mêmes que ceux identifiés chez le rat. Pour cette raison, les chromatogrammes obtenus chez l'Homme ne seront pas présentés dans cette thèse car ils sont identiques ou très similaires, avec toutefois un pic d'odorant initial très significatif puisque ce dernier est apporté de manière continue durant tout le prélèvement.

### 4.3. Discussion et conclusion

Cette méthode, utilisant le PTR-MS en continu, a permis pour la première fois de mettre en évidence la production de métabolites par les EMOs dans la cavité nasale de l'Homme en temps réel. Les analyses par CPG-MS après SPME ont permis d'identifier les métabolites produits. Il est important de relever que les métabolites produits par la MO de l'Homme ont été similaires à ceux synthétisés chez le rat. Par conséquent, le rat semble être un modèle intéressant en pré-test, pour prédire les métabolites produits chez l'homme. Il existe cependant une différence entre les deux protocoles (utilisés chez l'Homme et le rat) qui doit être prise en considération. Chez le rat, les métabolites produits proviennent exclusivement de la muqueuse olfactive isolée par dissection alors que chez l'Homme, la MO n'étant pas été isolée, une implication des autres voies aériennes supérieures dans la biotransformation des odorants est possible. Des enzymes de type DCXR ont été mises en évidence dans les cellules épithéliales des voies respiratoires en culture (Zaccone et al., 2015). Les auteurs ont montré qu'une exposition prolongée de cellules épithéliales en culture à d'importantes concentrations de diacétylène et de 2,3-pentanedione a entraîné des lésions cellulaires et/ou la mort des cellules. Comme dans notre étude, les auteurs ont montré que ces cellules métabolisent le diacétylène en acétoïne et la 2,3-pentanedione en 2-hydroxy-3-pentanone et au moins un autre métabolite volatil non identifié, qui pourrait être la 3-hydroxy-2-pentanone sur la base de nos résultats. Toutefois, afin de limiter la contribution enzymatique des autres tissus, les molécules odorantes ont été apportées au plus près de la MO par voie orthonasale et l'air expiré par le sujet a été prélevé directement dans sa narine.

## 5. Métabolisme de la 2,3-pentanedione par la MO des sujets retenus dans le projet QualigrasPhy

### 5.1. Matériels et Méthodes

#### 5.1.1. Sujets

Seuls les sujets des groupes extrêmes (très sensibles S+ et peu sensibles S- au gras) ont participé à cette dernière étude. Sur les 7 sujets S- et 6 Sujets S+ qui ont participé à l'expérience de la mesure de

la libération des arômes en bouche (chapitre 2), 2 sujets (1 sujet S- et 1 sujet S+) ont été retirés des analyses du métabolisme de la 2,3-pentanedione dans la cavité nasale pour cause de maladie.

### 5.1.2. Suivi du métabolisme de la 2,3-pentanedione *in vivo*

Le protocole expérimental permettant de suivre en temps réel le métabolisme de la 2,3-pentanedione sur les sujets de l'étude a été similaire à celui décrit précédemment.

## 5.2. Résultats et discussion

Les résultats de cette étude mettent en évidence la production de métabolites ( $MH^+$ ,  $m/z = 103,075$  mélange de 2-hydroxy-3-pentanone et 3-hydroxy-2-pentanone) de la 2,3-pentanedione chez l'ensemble des sujets de l'étude (Figure 68). Par ailleurs, la quantité de métabolites de la 2,3-pentanedione mesurée dans l'air expiré des sujets peu sensibles est supérieure à celle des sujets sensibles (Figure 68).

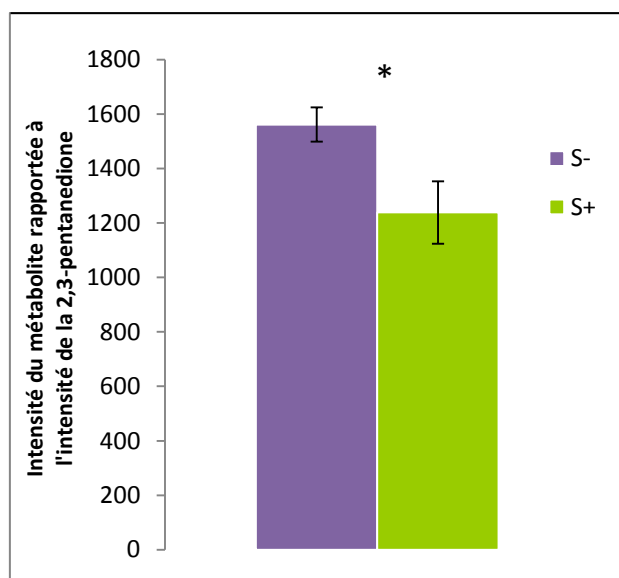


Figure 68 : Comparaison de la production du métabolite de la 2,3-pentanedione ( $MH^+$ ,  $m/z = 103,075$ ) entre les sujets sensibles (S+, n = 5) et peu sensibles (S-, n = 6) au gras, suite à un apport continu de la molécule dans le nez des sujets durant 2 minutes. Les données représentent l'intensité du métabolite et sont rapportées à l'intensité de la 2,3-pentanedione introduite dans la cavité nasale. Les histogrammes représentent les données moyennées  $\pm$  SEM. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 (test de Student).

## 5.3. Conclusion

Chez l'homme, la technique développée a permis d'observer en temps réel la production de métabolites volatils dans l'air expiré. Les sujets peu sensibles à la perception du gras libèrent significativement plus de métabolites que les sujets sensibles. Ce point sera abordé dans la discussion



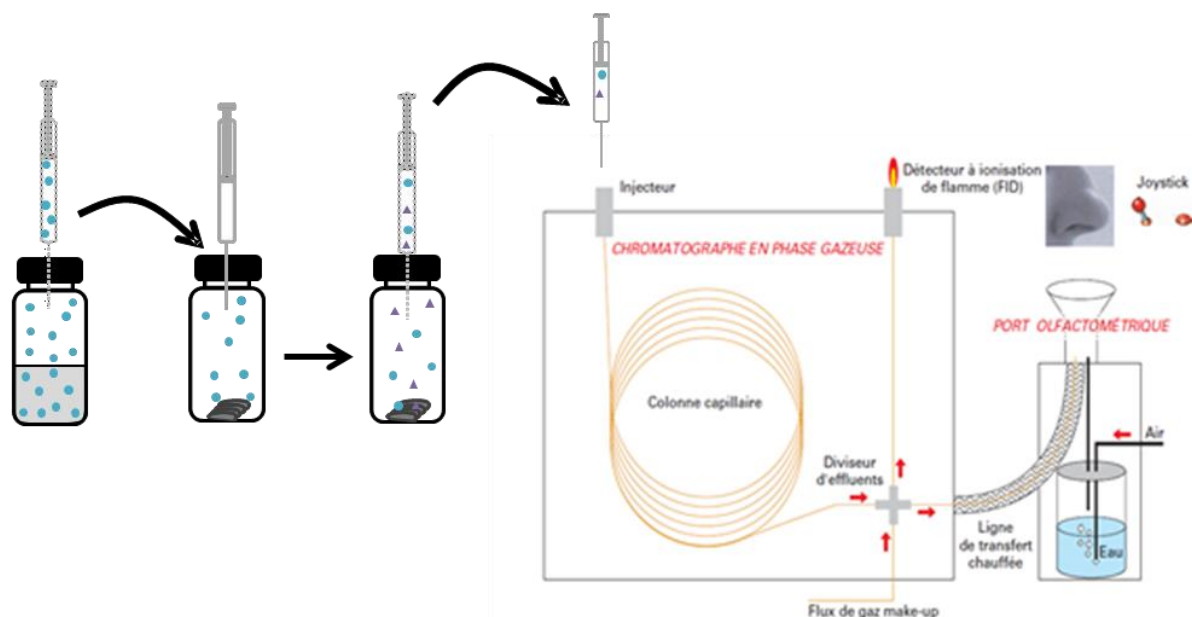
de la partie qui suit. Etant donné que ces métabolites sont volatils, nous pouvons supposer qu'ils sont également odorants. Ainsi, si les métabolites produits par la muqueuse olfactive de l'homme sont odorants, ils pourraient contribuer à la perception sensorielle d'un aliment. La partie qui suit a donc pour objectif de caractériser l'odeur des métabolites.

## **6. Identification de la qualité de l'odeur des métabolites**

Nous avons vu, au travers des études menées chez le rat, la production de métabolites volatils par la muqueuse olfactive en présence de molécules odorantes. La mise au point d'une méthode d'apport de la molécule odorante en continu dans la cavité nasale de l'homme a permis de retrouver les mêmes métabolites que dans le modèle animal. Ces métabolites volatils ont ensuite été identifiés par CPG-MS. A présent, nous émettons l'hypothèse que les métabolites produits dans la cavité nasale de l'homme sont odorants et qu'ils pourraient donc contribuer à la perception sensorielle globale. Ainsi, l'objectif de la partie suivante était de vérifier que les métabolites sont odorants puis de déterminer leur qualité odorante.

### **6.1. Matériel et Méthode : Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'évaluation olfactive CPG/O**

La CPG/O combine la séparation des composés volatils par CPG avec l'évaluation olfactive. En sortie de colonne, 50% des composés élués sont envoyés vers une ligne de transfert qui permet l'évaluation olfactive en même temps que l'enregistrement du chromatogramme obtenu par détection à ionisation de flamme (FID), (Figure 69). Cette méthode a largement été utilisée pour caractériser la fraction volatile et odorante des aliments (Schieberle et al., 1993, Preininger and Grosch, 1994, Le Quéré et al., 1996, Acena et al., 2011).



**Figure 69 : Schéma représentant l'obtention de l'échantillon odorant/métabolites sur une fibre SPME puis du CPG couplé au détecteur olfactif.**

Le chromatographe utilisé pour cette étude équipé d'une colonne capillaire de type DBWAX (Agilent Technologies, longueur = 30 m, diamètre interne = 0,32 mm et épaisseur du film = 0,5  $\mu\text{m}$ ) est initialement à 40°C puis chauffée jusqu'à 240°C à raison de 5°C/min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (vélocité 44cm/sec), avec un flux constant de 2,9 mL/min. La température dans l'injecteur a été fixée à 240°C et le détecteur FID à 250°C. La ligne de transfert olfactométrique a été maintenue à 250°C. Les chromatogrammes ont été enregistrés en utilisant le logiciel ChemStation (Agilent Technologie, Santa Clara, Californie, USA). Après attente de l'équilibre entre la phase liquide et gazeuse en 24h, 1 mL de l'espace de tête de ce premier flacon contenant la molécule odorante a été injecté dans un second flacon contenant une muqueuse olfactive de rat fraîchement disséquée, ce qui correspond à 1ppm de l'odorant en phase gazeuse. Après 30 minutes de contact entre l'odorant et la muqueuse, une fibre SPME a été placée dans le flacon durant 10 minutes. Enfin, la fibre SPME a été désorbée en CPG/O (Figure 69). Les séances ont été programmées avec des sujets internes au laboratoire en fonction de leurs disponibilités. Deux séances consécutives pour chaque sujet ont été espacées au moins de deux heures. A son arrivée, le juge a été installé dans une cabine dépourvue d'odeurs parasites et isolée des éléments perturbateurs extérieurs. Un nez en verre sélectionné en fonction de la physiologie de son nez a été placé à l'extrémité de la ligne de transfert de façon à améliorer son confort (Dussort et al., 2012). Afin d'éviter l'inconfort dû aux effluents chauds et la déshydratation de la muqueuse nasale, de l'air humidifié à un débit de 25 mL/min a été délivré au niveau de la ligne de transfert. Sur indication de l'expérimentateur, les sujets plaçaient leur nez au niveau du nez en verre environ trois minutes avant l'arrivée de chaque molécule d'intérêt. Il leur a

été demandé de respirer de la façon la plus naturelle possible et d'appuyer sur un bouton poussoir lorsqu'ils percevaient une odeur. Parallèlement, un microphone placé dans la cabine a permis d'enregistrer la description de l'odeur donnée par le juge. Les signaux de détection des odeurs et les enregistrements audio ont été obtenus simultanément et en continu à partir du temps d'injection de l'échantillon grâce au logiciel Acquisniff® (Biosens, France). Une réponse a été considérée comme positive si la personne a appuyé sur le bouton poussoir en même temps que l'apparition du signal attendu sous forme de pic en FID.

## 6.2. Résultats

Le tableau 14 résume les descripteurs générés par les sujets pour les 4 molécules étudiées ainsi que les métabolites qui leurs sont associés. L'odeur de la 2,3-pentanedione et de la 2,3-hexanedione sont décrites comme étant proche de celle du beurre. Les deux métabolites de la 2,3-pentanedione (3-hydroxy-2-pentanone puis 2-hydroxy-3-pentanone) sont également décrits comme ayant une odeur de beurre, avec une intensité supérieure pour le 2<sup>ème</sup> métabolite. Les deux métabolites de la 2,3-hexanedione (2-hydroxy-3-hexanone puis 3-hydroxy-2-hexanone) sont élués de la colonne quasiment en même temps ce qui ne permettait probablement pas aux sujets de distinguer la présence de deux métabolites. Le descripteur généré par les sujets pour les deux métabolites non différenciés est « lait fermenté ». La 3,4-hexanedione décrite comme étant « floral » est une molécule parfaitement symétrique donnant lieu à un unique métabolite décrit comme ayant une note « champignon ». Enfin, la 2-acetoxy-3-butanone n'est pas perçue par les sujets contrairement au diacétyle décrit comme ayant une odeur proche de celle du beurre. L'acétoïne, second métabolite de cette molécule est bien perçue en CPG/O mais son intensité est trop faible pour être décrite.

**Tableau 14 : descripteurs des métabolites produits par CPG/O.**

Nombres de sujets testés	Odorant	Concentration en phase gaz dans le tube	Description de l'odorant	Description du 1 <sup>er</sup> métabolite	Description du 2 <sup>ème</sup> métabolite
3	2,3-pentanedione	1 ppm	beurre	beurre léger	beurre intense
2	2,3-hexanedione	1 ppm	beurre / sucré	lait fermenté	
2	3,4-hexanedione	1 ppm	floral	champignon	
2	2-acetoxy-3-butanone	1 ppm	non buzzé = non perçu	beurre	perçu mais non identifié

Cette étude préliminaire qui a été faite avec un nombre limité de juges (3 pour la 2,3-pentanedione et 2 pour les autres molécules) devrait être complétée par une étude plus complète. Cependant, les

descripteurs cités par les juges sont souvent proche de l'univers gras. Par ailleurs, tous les sujets ont donné les mêmes descripteurs pour un odorant (ou un métabolite) donné. Ainsi, ces résultats nous semblent cohérents.

### 6.1. Discussion et conclusion

Cette étude menée par CPG/O a permis de montrer que les métabolites volatils produits par la MO sont odorants et la majorité des sujets ont pu leur attribuer un descripteur. Au vu de ces résultats, ces métabolites pourraient potentiellement intervenir dans la perception sensorielle. Il serait donc particulièrement intéressant de déterminer l'intensité olfactive de ces composés pour essayer d'évaluer leur impact sur la perception olfactive. La question qui se pose est donc de savoir si les métabolites sont produits en quantité suffisante, au-dessus de leur seuil de perception et sont donc capables de participer à la perception olfactive globale.

Une des stratégies consisterait à synthétiser les métabolites identifiés précédemment (puisque'ils ne sont pas disponibles dans les catalogues de composés chimiques) afin de déterminer leur coefficient de partage gaz/liquide qui permettra de maîtriser la concentration des métabolites en phase gazeuse et de mesurer le seuil de détection de chacun. Par exemple, il a été montré que certains métabolites odorants peuvent avoir un seuil de détection 10 à 20 fois inférieur à celui de la molécule de départ (Schilling et al., 2007). Ainsi, même si les molécules sont présentes en faible quantité, elles peuvent être intéressantes pour la perception odorante si leur seuil de détection est bas.

Dans notre étude, les sujets peu sensibles au gras ont produit plus de métabolites dans l'air expiré que les sujets sensibles. Une explication possible serait un meilleur fonctionnement du système enzymatique chez ces sujets. Ainsi, les odorants immédiatement biotransformés en leurs métabolites ne seraient plus présents dans la cavité nasale et par conséquent ne seraient donc plus perçus. Au contraire, chez les sujets sensibles, ces composés odorants s'accumuleraient dans l'espace péri-récepteur pour se fixer au niveau des récepteurs. Une autre explication pouvant expliquer ce résultat concerne les différences dans le comportement respiratoire entre les deux groupes de sensibilité. En effet, nous avons montré que les sujets peu sensibles respirent plus rapidement mais moins profondément. Ainsi, les métabolites produits seraient plus facilement expulsés de la cavité nasale chez les sujets S-.

De façon surprenante, la 2-acetoxy-3-butanone à 1 ppm n'a pas été perçue en CPG-O. Au contraire, son métabolite le diacétyle, même présent en faible quantité a été identifié et décrit. Ces résultats laissent supposer une contribution possible de ce métabolite dans la perception de l'odorant initial

même s'il est produit en faible quantité. Il est donc envisageable que les sujets les plus sensibles, qui libèrent moins de métabolites dans l'air expiré, possèdent plus de récepteurs que les sujets peu sensibles et/ou ont un meilleur fonctionnement du système enzymatique. Ainsi, les métabolites produits seraient immédiatement pris en charge par des enzymes de phase II limitant leur présence dans l'air expiré.

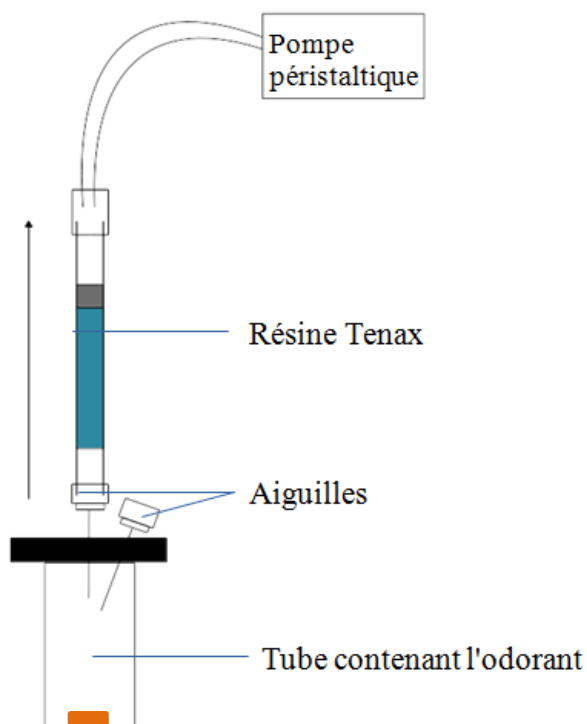
## 7. Un ou plusieurs métabolites ?

Afin de lever l'ambiguïté sur l'origine de la proportion entre la 2-hydroxy-3-pentanone et la 3-hydroxy-2-pentanone, métabolites de la 2,3-pentandione, nous avons développé une méthode d'injection de nos odorants à froid. En effet, il est connu que les hydroxycétones vicinales s'isomérisent facilement (Schröder et al., 1994). Dès lors, leur proportion constatée peut provenir d'un échange thermique lors de l'injection dans l'injecteur à chaud du chromatographe (Leal et al., 1995). De ce fait, il aurait été judicieux d'injecter notre échantillon dans un premier temps à froid sur une colonne DBWAX. Cependant, pour des raisons de disponibilité de la colonne et du matériel biologique nous avons directement travaillé à froid sur une colonne chirale. Cette méthode permet en outre d'étudier l'énantiométrie des deux métabolites qui possèdent tous deux un carbone asymétrique.

### 7.1. Matériel et Méthodes

Comme décrit dans l'état de l'art, la fibre SPME permet de concentrer les molécules. L'utilisation de cette fibre qui ne permet pas l'injection à froid a été remplacée par le Tenax en headspace dynamique. Le Tenax est un adsorbant qui peut être élué par un solvant non chloré. L'extrait dans le solvant peut ensuite être injecté dans un injecteur froid de type « on-column ». Le mode headspace dynamique nécessite une pompe pour aspirer les molécules afin qu'elles soient adsorbées sur la résine.

Après dissection d'une muqueuse de rat, celle-ci a été placée dans un flacon de 20 mL. 1 mL de la molécule d'intérêt en phase gazeuse a ensuite été injecté au-dessus de la muqueuse olfactive pour obtenir une concentration de 1 ppm dans le tube. Après 30 minutes, l'espace gazeux contenu dans le tube a été aspiré via une pompe péristaltique à un débit de 10 mL/min durant 5 min. Pour éviter la dépression dans le tube, une aiguille a permis le renouvellement de l'air (Figure 70).



**Figure 70 : Schéma du montage de headspace dynamique utilisant le Tenax permettant d'extraire un odorant et ses métabolites. Une muqueuse de rat a été placée dans le tube contenant l'odorant.**

Après séchage par un flux d'azote à contre-courant, le passage de 3 mL de solvant (ether) au travers du tube contenant la résine Tenax a permis la désorption des molécules préalablement adsorbées. Après concentration du solvant sous flux d'azote, 1  $\mu$ l de la solution a été injecté en CPG-MS en « on-column » à froid sur une colonne chirale (Macherey-Nagel Lipodex E, longueur = 25 m, diamètre interne = 0,25 mm et épaisseur du film = 0,25  $\mu$ m). Les paramètres de la CPG-MS ont été similaires à ceux décrits précédemment.

## 7.2. Résultats et discussion

La proportion entre la 2-hydroxy-3-pentanone et la 3-hydroxy-2-pentanone (4,10) obtenue par injection à froid est différente de la proportion obtenue en injection à chaud (2,30) (Figure 71 et Figure 5 de l'article 4). L'excès constaté en 2-hydroxy-3-pentanone indique que la réaction enzymatique est régiosélective. Par ailleurs, la Figure 71 montre un large excès énantiomérique sur les deux isomères indiquant la stéréosélectivité de la réaction.

A = 2-hydroxy-3-pentanone

B = 3-hydroxy-2-pentanone

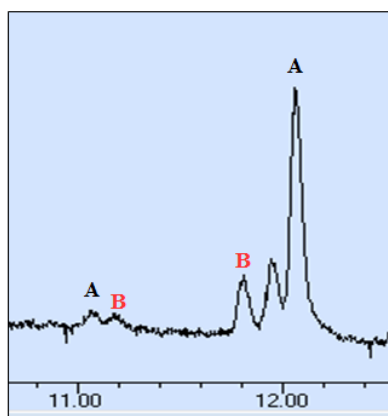


Figure 71 : Chromatogramme issu de l'injection en « on column » à froid des métabolites de la 2,3-pentanedione en CPG-MS sur une colonne chirale (Lipodex E).

## 8. Conclusion du chapitre

Comme présenté dans le chapitre 2, la perception du gras fait intervenir une dimension olfactive. De plus, nous avons émis l'hypothèse que les arômes libérés par les aliments lors de leur consommation pourraient être métabolisés par les enzymes de la muqueuse olfactive, et donner naissance à d'autres composés d'arôme qui pourraient contribuer à la perception du gras. Dans ce contexte, nous avons mis en évidence chez le rat puis chez l'Homme la production de métabolites volatils synthétisés immédiatement par la muqueuse olfactive après exposition à des composés d'arôme. Au vue de ces résultats, le rat semble être un modèle intéressant pour prédire les métabolites produits chez l'Homme, puisque les métabolites produits dans notre étude sont identiques pour les deux espèces.

En s'intéressant aux sujets QualigrasPhy, nous avons montré que les sujets peu sensibles au gras libéraient plus de métabolites dans l'air expiré que les sujets sensibles. Ces résultats laissent supposer que le système enzymatique permettant la biotransformation des odorants des sujets sensibles est plus performant que celui des sujets sensibles.

L'étude menée en CPG-O a permis de confirmer le caractère odorant des métabolites produits. L'odeur de ces métabolites a souvent été décrite par les sujets comme étant proche de l'univers gras. Cependant, cette étude préliminaire devra être complétée pour confirmer le rôle de ces métabolites dans la perception olfactive, et plus généralement dans la perception sensorielle du gras. Ainsi, la synthèse chimique des métabolites devrait permettre de déterminer l'intérêt de ceux-ci notamment par la mesure de leur seuil de perception.

Enfin, les enzymes du métabolisme des odorants semblent être régiosélectives et stéréosélectives. Il serait donc particulièrement intéressant de synthétiser les deux énantiomères de chaque métabolite, de mesurer leur seuil de perception et de définir leur qualité odorante.

Il faudrait aussi confirmer la nature de l'enzyme impliquée, même si une candidate potentielle semble être la dicarboxyl l-xylulose reductase (DCXR) dans le cas du métabolisme des dicétones.



### ***Conclusion générale et perspectives :***

Dans l'objectif général qui consistait à **étudier la capacité des sujets humains à détecter et discriminer la teneur en matière grasse dans des aliments de consommation courante, la variabilité interindividuelle de cette capacité et la ou les origine(s) de cette variabilité**, une première approche, en lien avec les objectifs du projet QualigrasPhy dans lequel s'intègre ce travail de thèse, a consisté à **tester différents moyens de compenser la réduction du niveau de gras dans un aliment sans qu'il y ait d'impact sur la perception sensorielle**. Nous avons ainsi montré, en travaillant sur des produits de consommation courante, qu'il est possible de réduire la teneur en matière grasse de saucisses de type saucisses de Strasbourg sans modifier la sensation de gras, par addition de fibres de Psyllium. Cette compensation n'a été efficace en termes d'intensité de gras perçue, que lorsque les sujets disposaient du sens de l'odorat. Au contraire, l'ajout d'arômes congruents avec la sensation de gras dans des fromages blancs à teneur réduite en matière grasse n'a pas permis de percevoir ces fromages blancs aussi gras que leurs équivalents non réduits en matière grasse. Ces résultats démontrent la difficulté d'établir des stratégies de compensation de réduction de la matière grasse dans les aliments puisqu'elles apparaissent dépendantes des produits. Ils soulignent aussi des divergences dans la prise en compte de la dimension olfactive de la perception du gras reconnue comme multimodale.

Dès lors, il est apparu nécessaire de se concentrer sur les objectifs de cette thèse. Un premier objectif consistait à **comprendre l'impact de la réduction de la teneur en matière grasse d'un produit alimentaire de consommation courante sur ses caractéristiques sensorielles**. Cette étude menée sur des fromages blancs nous a permis de confirmer le caractère multimodal de la perception du gras. En effet, la perception du gras dans la matrice laitière implique l'olfaction (augmentation de la perception de l'arôme crème avec l'augmentation de la teneur en matière grasse), la gustation (la perception de l'amertume diminue avec l'augmentation de la teneur en matière grasse), les sensations trigéminales (la perception de l'astringence diminue avec l'augmentation de la teneur en matière grasse) et la texture (la perception en bouche du film de gras augmente avec l'augmentation de la teneur en matière grasse). La diminution du film gras perçu avec la teneur en matière grasse du produit est en accord avec la diminution du tapissage en bouche mesuré instrumentalement et plus précisément avec la teneur en matière grasse de cette quantité de matière restant en bouche. L'augmentation du tapissage en bouche résulte d'une augmentation de la viscosité des produits et de la diminution des forces de frottement avec l'augmentation de la teneur en matière grasse. La diminution de la perception de l'arôme crème dans les FB moins gras est liée à la plus faible teneur en certains composants odorants à connotation grasse mais surtout à la plus faible libération de

2,3-pentanedione, de 2,5-hexanedione et de diacétyle, molécules aromatiques évoquant l'univers gras.

Principales limites et perspectives : D'un point de vue méthodologique, il aurait été pertinent d'effectuer les mesures de tribologie sur les différents FB à 7 et 15°C comme les autres mesures (sensorielles, viscosités). Par ailleurs, les sujets n'ont pas discriminé la sensation de gras de la saucisse réduite en matière grasse et contenant des fibres de Psyllium de la sensation de gras induite par la consommation de la saucisse standard, mais seulement en absence de pince-nez. Cette observation laisse donc supposer une contribution d'arômes apportés par la fibre de Psyllium. Cependant, nos résultats ont montré peu de différences de composition aromatique entre les produits. Nous pouvons donc supposer que l'addition de fibre n'apporte pas de composés aromatiques mais qu'elle modifie la libération des arômes. Il serait donc intéressant d'étudier cette libération *in vivo*. Comme pour le fromage blanc, il aurait été intéressant de caractériser sensoriellement l'effet de la réduction de la matière grasse sur la saucisse pour aller vers la généralisation des modalités sensorielles impliquées dans la perception du gras.

L'objectif suivant consistait à **étudier la sensibilité au gras de différents sujets, sa variabilité et son origine**. Ce travail confirme, sur un produit de consommation courante, la grande variabilité interindividuelle dans la perception du gras. Il met en évidence trois types de sujets : des sujets très sensibles au gras, des sujets très peu sensibles au gras et des sujets de sensibilités intermédiaires pour lesquels la dimension olfactive permettrait une amélioration nette de la sensibilité. Ces sujets très sensibles au gras diffèrent des sujets très peu sensibles par le tapissage en bouche, le volume oral, le flux respiratoire et les quantités d'arôme libérées. Par contre, le flux salivaire, la viscosité de leur salive, et le nombre de leurs papilles fongiformes ne sont pas significativement différents. Les sujets peu sensibles au gras présentent un tapissage plus important que les autres. Ils auraient donc des difficultés de rinçage et/ou de discrimination du film gras entre les différents produits. Ils ont également un volume oral plus important qui pourrait favoriser la dilution des composés dans la cavité orale et donc rendre la perception plus difficile. Leur fréquence respiratoire est plus rapide, mais leur volume respiratoire plus faible. Ce comportement respiratoire, associé à une activité enzymatique de biotransformation des odorants réduite, pourrait être à l'origine du manque de sensibilité du système olfactif des sujets peu sensibles au gras.

Principales limites et perspectives : La principale limite de cette étude concerne le pas de 1% de matière grasse entre les fromages blancs utilisés pour mesurer les seuils de perceptions des deux groupes extrêmes. Ce pas de 1% de matière grasse entre nos différents produits est sans doute un peu grand pour préciser la sensibilité des sujets les plus sensibles et pour voir l'effet de l'olfaction et

de la température de service. En effet, les sujets sensibles ont souvent été capables de discriminer les FB à 0 et 1% de matière grasse (premier échantillon de notre gamme). Pour les sujets les moins sensibles, le seuil de certains sujets atteint les 8%. Il aurait donc fallu augmenter la teneur en matière grasse dans les échantillons proposés pour pouvoir définir avec davantage de précision les seuils de perception du gras.

S'il est assez « simple » d'étudier la contribution de l'olfaction à la perception du gras par l'utilisation du pince-nez, l'étude de la contribution des saveurs et des sensations tactiles et trigéminales est plus complexe. Ces informations seraient cependant intéressantes pour déterminer l'impact de chaque sens sur la sensibilité au gras des individus. Par ailleurs, la perception du gras semblant dépendre de la matrice étudiée, il aurait été intéressant de mesurer la sensibilité au gras des sujets de l'étude sur d'autres matrices. Est-ce qu'un sujet sensible au gras d'une matrice laitière l'est aussi sur une matrice protéique par exemple ?

Les groupes extrêmes de sensibilité au gras sont composés d'un nombre très réduit de sujets (7 et 9 pour les peu et les très sensibles respectivement) ne permettant pas de généraliser nos résultats à l'ensemble de la population. Ce nombre de dégustateurs réduit n'a peut-être pas permis de mettre en évidence certains paramètres anatomiques et physiologiques qui pourraient expliquer la variabilité interindividuelle de la perception du gras. Par exemple, le flux salivaire et le nombre de papilles fongiformes tendent à être plus importants chez les sujets sensibles mais la différence n'est pas significativement différente. Quelles seraient les conclusions sur un panel plus conséquent ? Y a-t-il une différence du nombre de papilles fongiformes entre les deux groupes extrêmes qui serait à l'origine d'une différence de perception gustative du gras ?

Enfin, le dernier objectif consistait à **approfondir les connaissances actuelles sur le métabolisme de la MO du rat puis à étudier son existence chez l'Homme**. Nos résultats ont permis de montrer pour la première fois, à l'aide du PTR-MS et de la CPG-MS, la biotransformation d'un odorant en présence d'une muqueuse olfactive de rat et la production immédiate de son métabolite. Ces résultats ont également été observés sur des molécules à connotation grasse du projet QualigrasPhy. Adaptées à l'Homme, ces différentes techniques innovantes impliquant le PTR-MS et la CPG-MS ont permis de mettre en évidence la production en temps réel de métabolites volatils dans la cavité nasale humaine. Par ailleurs, nos résultats ont montré que ces métabolites sont odorants et parfois décrits comme appartenant à l'univers « gras ».

Principales limites et perspectives : La muqueuse humaine n'étant pas isolée, nous ne pouvons pas affirmer que l'intégralité des métabolites produits proviennent de la muqueuse olfactive. Il serait donc intéressant d'apporter la molécule odorante au plus près de la muqueuse olfactive pour limiter

l'implication potentielle des voies respiratoires. Ces résultats amènent d'autres questions qui seraient importantes à aborder : Quelle est l'intensité olfactive de ces composés produits et quel serait leur impact sur la perception olfactive ? Est-ce que les métabolites sont produits en quantité suffisante et au-dessus de leur seuil de perception pour participer à la perception globale ? La synthèse de l'ensemble des métabolites devrait permettre d'apporter des réponses à ces interrogations.

Au travers de différentes études mêlant physico-chimie, biologie et analyse sensorielle, les travaux de cette thèse ont permis d'approfondir les connaissances sur la perception du gras. Nous avons montré sur un produit de consommation courante l'importante variabilité de la sensibilité de l'Homme face à la matière grasse. En plus des sensations tactiles en bouche, l'olfaction semble être un sens particulièrement important dans la perception du gras. Son absence n'a d'ailleurs pas permis aux sujets de l'étude de différencier des saucisses à 15% de celles à 27% de matière grasse. L'activité respiratoire de l'Homme serait en partie responsable de la quantité de composés d'arôme apportée au niveau des enzymes du métabolisme des odorants et des récepteurs olfactifs. Enfin, l'activité de biotransformation des odorants semble être sujet dépendante et pourrait au travers de la synthèse de métabolites odorants jouer un rôle dans la perception du gras.

## **Liste des figures**

<b>Figure 1</b> : a. Nomenclature utilisée par les biologistes. Exemple de l'acide linoléique 18 :2n-6 ou $\omega 6$ et b. Nomenclature utilisée par les chimistes. Exemple de l'acide linoléique 18 :2 $\Delta$ 9c, 12c.....	9
<b>Figure 2</b> : Structure d'un triglycéride. ....	10
<b>Figure 3</b> : Répartition des papilles sur la muqueuse linguale. Le bourgeon gustatif (D) est l'organe récepteur du goût. Il est porté en plusieurs exemplaires par les papilles caliciformes (A), les papilles foliées (B) et par les papilles fongiformes (C). D'après Kettaneh et al., 2002.....	12
<b>Figure 4</b> : Récepteurs gustatifs impliqués dans la perception des différents saveurs (Maitrepierre et al., 2011).....	13
<b>Figure 5</b> : Représentation des voies orthonasale et rétronasale intervenant dans la perception des composés d'arômes. Les récepteurs olfactifs représentés sur ce schéma, se situent dans la muqueuse olfactive. ....	18
<b>Figure 6</b> : Muqueuse olfactive, localisation et structure (Reproduction d'après Thuret et al., 2006). ....	19
<b>Figure 7</b> : Fonctionnement des enzymes du métabolisme des xénobiotiques.....	21
<b>Figure 8</b> : Systèmes expérimentaux pour l'analyse de l'espace de tête en mode statique (a) et en mode dynamique (b). (Reproduction d'après Juteau et al., 2004). ....	27
<b>Figure 9</b> : Principe général d'analyse de l'air expiré par piégeage sur Tenax (Reproduction d'après Taylor et Linforth, 2000).....	28
<b>Figure 10</b> : Interface MS-Nose <sup>TM</sup> développée par Taylor et Linforth dans le but d'étudier la libération des composés d'arôme durant la consommation d'un aliment (Reproduction d'après Taylor et Linforth, 2000).....	29
<b>Figure 11</b> : Représentation d'un spectromètre de masse à source à ionisation par PTR-MS (Reproduction d'après Hansel et al., 1995). Cette méthode apporte de nouvelles opportunités concernant le suivi de la libération des composés d'arôme au cours de la consommation d'un aliment. ....	30
<b>Figure 12</b> : Analyse d'effluves nasals par nosespace APCI-MS (Reproduction d'après Harvey et Barra, 2003).....	31
<b>Figure 13</b> : Représentation du lissage d'une courbe de libération d'un arôme au cours du temps : courbe non lissée en bleue et courbe lissée en rouge. Le lissage ne modifie pas l'allure des courbes, il va minimiser les fluctuations du signal provenant des cycles respiratoires du juge. ....	34
<b>Figure 14</b> : Paramètres fréquemment extraits des courbes de libération des composés d'arômes (Dijksterhuis and Piggott, 2001). ....	35
<b>Figure 15</b> : Interactions principales entre les arômes et les polysaccharides en fonction de l'humidité relative de la matrice et du degré d'hydrolyse des polysaccharides (Delarue et al., 2006). ....	49
<b>Figure 16</b> : Fromages blancs Pâturage, 0% et 7,8% de matière grasse.....	68
<b>Figure 17</b> : Test de classement selon l'intensité de la sensation de gras, avec pince-nez. Somme des rangs calculée pour chaque produit (34 sujets). MG = matière grasse, MG = matière grasse, ■ = saucisse de référence, ■ = ajout de fibres P ou de manioc. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (PPDS). ....	71
<b>Figure 18</b> : Test de classement selon l'intensité de la sensation de gras, sans pince-nez. Somme des rangs calculée pour chaque produit (34 sujets). MG = matière grasse, ■ = saucisse de référence, ■ = ajout de fibres P ou de manioc. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (PPDS). ....	72

<b>Figure 19</b> : Somme des rangs de chaque fromage blanc suite à une épreuve de classement sur la perception du gras par environ 16 sujets. ■ FB à 0% de MG, ■ FB à 3% de MG, ■ FB à 7,8% de MG. a. du FB 0% aromatisé avec de la 2,3-pentanedione, b. du FB 3% aromatisé avec de la 2,3-pentanedione, c. du FB 0% aromatisé avec de l'acétoïne, d. du FB 3% aromatisé avec de l'acétoïne, e. du FB 0% aromatisé avec de la 2,3-hexanedione, f. du FB 3% aromatisé avec de la 2,3-hexanedione, g. du FB 0% aromatisé avec du 2-acetoxy-3-butanone. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (PPDS).....	<b>76</b>
<b>Figure 20</b> : Mesures de la viscosité des fromages blancs de 0% à 11% de matière grasse à 7°C. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).....	<b>81</b>
<b>Figure 21</b> : Mesures de la viscosité des fromages blancs de 0% à 11% de matière grasse à 15°C. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).....	<b>82</b>
<b>Figure 22</b> : Mesures de tribologie (coefficient de frottement $\mu$ ) des fromages blancs de 0% à 8% de matière grasse. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).....	<b>82</b>
<b>Figure 23</b> : Schéma du dispositif utilisé pour les extractions SAFE (Engel et al., 1999).....	<b>83</b>
<b>Figure 24</b> : Projection de la quantité d'arôme libérée des fromages blancs à différentes teneurs en MG (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.8 et 11%) sur le plan 1-2 de l'ACP (individus, points bleus). Les points rouges (variables) représentent les composés aromatiques étudiés. ....	<b>89</b>
<b>Figure 25</b> : Tapissage dans la cavité buccale après ingestion de 20g de fromage blanc à 0%, 3,2% et 7,8% de matière grasse $\pm$ SEM. ANOVA Matière sèche = % matière grasse + répétition complétée par un test de comparaison des moyennes SNK. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).....	<b>109</b>
<b>Figure 26</b> : Lipides résiduels associés au tapissage dans la cavité buccale après ingestion de 20g de fromage blanc à 0%, 3,2% et 7,8% de matière grasse $\pm$ SEM. ANOVA Lipides résiduels = % matière grasse + répétition complétée par un test de comparaison des moyennes SNK. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).....	<b>109</b>
<b>Figure 27</b> : Corrélations entre la matière sèche et les lipides résiduels en bouche pour ■ le FB à 0% de MG, ■ le FB à 3,2% de MG et ▲ le FB à 7,8% de MG. Chaque point représente un sujet consommant l'un ou l'autre des FB.....	<b>110</b>
<b>Figure 28</b> : Mesure du volume oral par un rhyno-pharyngomètre acoustique .....	<b>124</b>
<b>Figure 29</b> : Photo des plaques vibrantes du viscosimètre utilisé pour la mesure de la viscosité de la salive.....	<b>125</b>
<b>Figure 30</b> : Schéma représentant les travaux réalisés par Shahbake et al. (2005) aboutissant à la mise en évidence de la zone représentative de la densité totale de papilles fongiformes sur la langue (zone 5).....	<b>126</b>
<b>Figure 31</b> : Photo de la position à adopter lors du comptage des papilles fongiformes (à gauche) et photo de la zone située dans le disque de 6mm de diamètre après coloration de la langue au coton tige (à droite).....	<b>126</b>
<b>Figure 32</b> : Application du silicone sur la langue avec la spatule en bois pour la détermination d'une empreinte de la langue. ....	<b>127</b>
<b>Figure 33</b> : Volume oral des sujets (moyennes $\pm$ SEM) en fonction a. de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6 et b. du genre : Femmes (F) n=7, Homme (H) n=7. Modèle de l'ANOVA : Volume oral = sensibilité + répétition + genre complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK).....	<b>129</b>

**Figure 34** : Flux respiratoire des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction a. de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6 et b. du genre : Femmes (F) n=7, Homme (H) n=7. Modèle de l'ANOVA : Flux respiratoire = sensibilité + répétition + genre complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK)..... **130**

**Figure 35** : Fréquence respiratoire (a.) et Volume courant (b.) des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6. Modèle de l'ANOVA : a. Fréquence respiratoire = sensibilité + répétition et b. Volume courant = sensibilité + répétition complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK). ..... **130**

**Figure 36** : Flux salivaire des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=9, Sujets très sensibles (S+) n=7. Modèle de l'ANOVA : Flux salivaire = sensibilité complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK)..... **131**

**Figure 37** : Viscosité salivaire des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=9, Sujets très sensibles (S+) n=7. Modèle de l'ANOVA : Viscosité salivaire = sensibilité complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK). ..... **132**

**Figure 38** : Comptage des papilles fongiformes des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=9, Sujets très sensibles (S+) n=7. Modèle de l'ANOVA : papilles fongiformes = sensibilité + compteur + répétition + sujet (sensibilité) + sensibilité\*compteur + sensibilité\*répétition + compteur\*répétition complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK). ..... **132**

**Figure 39** : Matière sèche (a.) et lipides résiduels (b.) des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6. Modèle de l'ANOVA : a. Matière sèche = sensibilité + % de matière grasse + répétition + sensibilité\*%de matière grasse, b. Lipides résiduels = sensibilité + % de matière grasse + répétition + sensibilité\*%de matière grasse, complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK). ..... **133**

**Figure 40** : SDev (%) - paramètre de la surface développée des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=9, Sujets très sensibles (S+) n=7. Modèle de l'ANOVA : SDev(%) = sensibilité complété par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK). ..... **134**

**Figure 41** : Aire sous la courbe = AUC (a.), Intensité maximale = Imax (b.) et Temps pour atteindre l'intensité maximale = tmax (c.) des sujets (moyennes  $\pm$  SEM) en fonction de leur sensibilité au gras : Sujets peu sensibles (S-) n=8, Sujets très sensibles (S+) n=6. Modèle de l'ANOVA : a. Aire sous la courbe (AUC)= sensibilité + répétition, b. Intensité maximale (Imax)= sensibilité + répétition, c. Temps pour atteindre l'intensité maximale (tmax)= sensibilité + répétition, d. Imax/tmax=sensibilité + répétition, complétée par un test de comparaison des moyennes. Les groupes de sensibilités associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK). ..... **135**

**Figure 42** : Détermination de l'équation de la droite moyenne d'étalonnage obtenue à partir des injections de la 2,3-pentanedione en solution aqueuse à différentes concentrations (n = 15). ..... **151**

<b>Figure 43</b> : Représentation de l'équilibre entre la phase liquide et la phase gazeuse d'une molécule volatile après 12h d'incubation. ....	<b>151</b>
<b>Figure 44</b> : Evolution du signal de 2,3 pentanedione ( $MH^+$ , $m/z = 101,059$ ) au cours du temps, après injection de 500 $\mu L$ de la 2,3-pentanedione (0,1 mg/L en phase gaz) en l'absence (■ ; n = 5) ou présence (■ ; n = 6) de muqueuse olfactive de rat. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond et les histogrammes représentent les données moyennées $\pm$ SEM. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 (test de Student). ....	<b>153</b>
<b>Figure 45</b> : Evolution du signal de 2,3-hexanedione ( $MH^+$ , $m/z = 115,075$ ) au cours du temps, après injection de 500 $\mu L$ de la 2,3-hexanedione (0,1 mg/L en phase gaz) en l'absence (■ ; n = 5) ou présence (■ ; n = 7) de muqueuse olfactive de rat. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond et les histogrammes représentent les données moyennées $\pm$ SEM. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 (test de Student). ....	<b>154</b>
<b>Figure 46</b> : Evolution du signal de 2-acetoxy-3-butanone ( $MH^+$ , $m/z = 131,070$ ) au cours du temps, après injection de 500 $\mu L$ de la 2-acetoxy-3-butanone (0,1 mg/L en phase gaz) en l'absence (■ ; n = 4) ou présence (■ ; n = 9) de muqueuse olfactive de rat. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond et les histogrammes représentent les données moyennées $\pm$ SEM. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 (test de Student). ....	<b>155</b>
<b>Figure 47</b> : Détection de l'ion $m/z = 87,04$ après injection de 500 $\mu L$ de la de la 2-acetoxy-3-butanone (0,1 mg/L en phase gaz) en l'absence (■ ; n = 4) ou présence (■ ; n = 9) de muqueuse dans le tube. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond et les histogrammes représentent les données moyennées $\pm$ SEM. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 (test de Student). ....	<b>155</b>
<b>Figure 48</b> : a. Signal de la 2,3-hexanedione ( $MH^+$ , $m/z = 115,075$ ) et b. Signal du métabolite de la 2,3-hexanedione ( $MH^+$ , $m/z = 117,091$ ). Ces données ont été obtenues par PTR-MS suite au passage de l'odorant dans le circuit contrôle sans muqueuse (sans MO, n = 16), dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat (avec MO, n = 5) et dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat chauffée (MO chauffée, n = 3). L'odorant est apporté en continu dans l'un ou dans l'autre circuit à la concentration de 5 ppb en phase gazeuse. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond, et tiennent compte de la contribution isotopique $^{18}O$ de l'isotopologue de l'hexanedione ( $MH^+$ , $m/z = 117,080$ ) pour le calcul du métabolite. Les histogrammes représentent les données moyennées $\pm$ SEM. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 (test de Student). ....	<b>176</b>
<b>Figure 49</b> : a. Signal de la 3,4-hexanedione ( $MH^+$ , $m/z = 115,075$ ) et b. Signal du métabolite de la 3,4-hexanedione ( $MH^+$ , $m/z = 117,091$ ). Ces données ont été obtenues par PTR-MS suite au passage de l'odorant dans le circuit contrôle sans muqueuse (sans MO, n = 16), dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat (avec MO, n = 5) et dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat chauffée (MO chauffée, n = 3). L'odorant est apporté en continu dans l'un ou dans l'autre circuit à une concentration de 50 ppb en phase gazeuse. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond, et tiennent compte de la contribution isotopique $^{18}O$ de l'isotopologue de l'hexanedione ( $MH^+$ , $m/z = 117,08$ ) pour le calcul du métabolite. Les histogrammes représentent les données moyennées $\pm$ SEM. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 (test de Student). ....	<b>177</b>
<b>Figure 50</b> : a. Signal de 2-acetoxy-3-butanone ( $MH^+$ , $m/z = 131,070$ ) et b. Signal du métabolite de la 2-acetoxy-3-butanone ( $MH^+$ , $m/z = 87,04$ ). Ces données ont été obtenues par PTR-MS suite au passage de l'odorant dans le circuit contrôle sans muqueuse (sans MO, n = 16), dans le circuit expérimental	



contenant une muqueuse olfactive de rat (avec MO, n = 5) et dans le circuit expérimental contenant une muqueuse olfactive de rat chauffée (MO chauffée, n = 3). L'odorant est apporté en continu dans l'un ou dans l'autre circuit à une concentration de 1 ppb en phase gazeuse. Les données représentent l'intensité du signal (nCPS) avec soustraction du bruit de fond. Les histogrammes représentent les données moyennées $\pm$ SEM. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 (test de Student).....	178
<b>Figure 51</b> : Chromatogramme représentant le métabolisme de la 2,3-hexanedione 30 minutes après injection de l'odorant à 1ppm en phase gaz dans le flacon contenant une muqueuse olfactive de rat. ....	180
<b>Figure 52</b> : a. Spectre du métabolite M1 de la 2,3-hexanedione obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence de la 2-hydroxy-3-hexanone (INRA Mass). ....	180
<b>Figure 53</b> : a. Spectre du métabolite M2 de la 2,3-hexanedione obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence de la 3-hydroxy-2-hexanone (INRA Mass). ....	181
<b>Figure 54</b> : Chromatogramme représentant le métabolisme de la 3,4-hexanedione 30 minutes après injection de l'odorant à 1 ppm en phase gazeuse dans le flacon contenant une muqueuse olfactive de rat. ....	181
<b>Figure 55</b> : a. Spectre du métabolite de la 3,4-hexanedione obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence de la 4-hydroxy-3-hexanone (NIST 08). ....	182
<b>Figure 56</b> : Chromatogramme représentant le métabolisme de la 2-acetoxy-3-butanone 30 minutes après injection de l'odorant à 1 ppm en phase gazeuse dans le flacon contenant une muqueuse olfactive de rat. ....	182
<b>Figure 57</b> : a. Spectre du premier métabolite de la 2-acetoxy-3-butanone obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence du diacétyle (NIST 08).....	183
<b>Figure 58</b> : a. Spectre du second métabolite de la 2-acetoxy-3-butanone obtenu en CPG-MS, b. Spectre de référence de l'acétoïne (NIST 08).....	183
<b>Figure 59</b> : Photo du dispositif de prélèvement du « nosespace » couplé au PTR-MS utilisant une « canule » placée dans une narine d'un sujet.....	185
<b>Figure 60</b> : Schéma et photo de l'embout nasal en PTFE du nouveau dispositif de prélèvement des effluves nasals « nosespace ». ....	186
<b>Figure 61</b> : Détail de la ligne de transfert souple du nouveau dispositif de prélèvement du « nosespace ». ....	186
<b>Figure 62</b> : Casque support avec embout nasal et système de chauffage pour prélèvement des effluves nasals en vue d'une analyse du « nosepace » d'un sujet. ....	187
<b>Figure 63</b> : Schéma du montage développé pour le suivi du métabolisme des molécules odorantes <i>in vivo</i> par PTR-MS. ....	188
<b>Figure 64</b> : Schéma du montage permettant la concentration des molécules exhalées par les sujets sur fibre SPME, après injection de l'odorant dans une narine.....	190
<b>Figure 65</b> : a. Mesure du signal en continu de la 2,3-pentanedione au PTR-MS ( $MH^+$ , $m/z = 101,059$ ) dans la cavité nasale d'un sujet entre 52 et 176 secondes et b. détection du métabolite de la 2,3-pentanedione ( $MH^+$ , $m/z = 103,075$ ) associée à l'apport en continu de l'odorant. Chaque point de la courbe représente la moyenne des 20 scans qui précèdent le maximum du pic d'acétone d'un cycle respiratoire. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 (test de Student).....	191
<b>Figure 66</b> : a. Mesure du signal en continu de la 2,3-hexanedione au PTR-MS ( $MH^+$ , $m/z = 115,075$ ) dans la cavité nasale d'un sujet entre 52 et 189 secondes et b. détection du métabolite de la 2,3-hexanedione ( $MH^+$ , $m/z = 117,091$ ) associée à l'apport en continu de l'odorant. Chaque point de la	

courbe représente la moyenne des 20 scans qui précèdent le maximum du pic d'acétone d'un cycle respiratoire. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 (test de Student).....	192
<b>Figure 67</b> : a. Mesure du signal en continu de la 3,4-hexanedione au PTR (MH <sup>+</sup> , m/z = 115,075) dans la cavité nasale d'un sujet entre 52 et 170 secondes et b. détection du métabolite de la 3,4-hexanedione (MH <sup>+</sup> , m/z = 117,091) associée à l'apport en continu de l'odorant. Chaque point de la courbe représente la moyenne des 20 scans qui précèdent le maximum du pic d'acétone d'un cycle respiratoire. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 (test de Student).....	193
<b>Figure 68</b> : Comparaison de la production du métabolite de la 2,3-pentanedione (MH <sup>+</sup> , m/z = 103,075) entre les sujets sensibles (S+, n = 5) et peu sensibles (S-, n = 6) au gras, suite à un apport continu de la molécule dans le nez des sujets durant 2 minutes. Les données représentent l'intensité du métabolite et sont rapportées à l'intensité de la de 2,3-pentanedione introduite dans la cavité nasale. Les histogrammes représentent les données moyennées ± SEM. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 (test de Student).....	195
<b>Figure 69</b> : Schéma représentant l'obtention de l'échantillon odorant/métabolites sur une fibre SPME puis du CPG couplé au détecteur olfactif.....	197
<b>Figure 70</b> : Schéma du montage de headspace dynamique utilisant le Tenax permettant d'extraire un odorant et ses métabolites. Une muqueuse de rat a été placée dans le tube contenant l'odorant. .	201
<b>Figure 71</b> : Chromatogramme issu de l'injection en « on column » à froid des métabolites de la 2,3-pentanedione en CPG-MS sur une colonne chirale (Lipodex E).....	202

### **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Formulation des fromages blancs .....	68
<b>Tableau 2</b> : Caractéristiques (teneur en matière grasse (MG), ajout ou non de fibres) des saucisses.	68
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques des quatre composés utilisés pour l'aromatisation des fromages blancs. ....	73
<b>Tableau 4</b> : Concentrations testées pour aromatiser les fromages blancs.....	74
<b>Tableau 5</b> : Nombre de sujets par séance.....	75
<b>Tableau 6</b> : Conditions de réalisation des mesures de tribologie .....	81
<b>Tableau 7</b> : Abondance des différents composés contenus dans un fromage blanc dépourvu de matière grasse et un fromage blanc avec 7,8% de matière grasse, obtenu par extraction SAFE et CPG-MS. Les résultats représentent la moyenne des deux répétitions. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK). ....	85
<b>Tableau 8</b> : Abondance des différents ions contenus dans des saucisses à 15 et 27% de matière grasse avec ou sans fibres, obtenu par extraction SAFE et CPG-MS. Les résultats représentent la moyenne des deux répétitions. Les produits associés à des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5% (SNK). ....	86
<b>Tableau 9</b> : Données en intensité (nCPS) avec soustraction du brut de fond de l'aire sous la courbe sur 85 secondes des molécules présentes dans des fromages blancs à 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,8 et 11% de matière grasse. ....	88
<b>Tableau 10</b> : Résumé des paramètres étudiés (en gras le paramètre étudié est significativement supérieur). ....	139
<b>Tableau 11</b> : Tableau des aires de 2,3-pentanedione obtenues après incubation de différentes concentrations de 2,3-pentanedione en phase aqueuse puis injection de la phase gazeuse à	

l'équilibre en CPG et du coefficient de partage obtenu à partir de différentes concentrations de 2,3-pentanedione. ....	152
<b>Tableau 12</b> : Coefficient de partage des molécules d'intérêts. ....	152
<b>Tableau 13</b> : Résumé des métabolites identifiés chez l'Homme par CPG-MS. ....	193
<b>Tableau 14</b> : descripteurs des métabolites produits par CPG/O. ....	198



## ***Références bibliographiques***

## A

- Acena, L., L. Vera, J. Guasch, O. Busto, and M. Mestres. (2011). Determination of Roasted Pistachio (*Pistacia Vera L.*) Key Odorants by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2518-23.
- Ackroff, K., M. Vigorito, and A. Sclafani. (1990). Fat Appetite in Rats - the Response of Infant and Adult-Rats to Nutritive and Nonnutritive Oil-Emulsions. *Appetite*, 15(3), 171-88.
- Adler, E., M. A. Hoon, K. L. Mueller, J. Chandrashekar, N. J. P. Ryba, and C. S. Zuker. (2000). A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*, 100(6), 693-702.
- Ahn, N., M. B. Frost, L. W. Frandsen, G. Dijksterhuis, and M. Martens. (2002). The Effect of Some Beverages on the Perception of Succeeding Basic Tastes. *Journal of Sensory Studies*, 17(6), 571-81.
- Andriot, I., M. Harrison, N. Fournier, and E. Guichard. (2000). Interactions between Methyl Ketones and Beta-Lactoglobulin: Sensory Analysis, Headspace Analysis, and Mathematical Modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4246-51.
- Aprèa, E., F. Biasioli, F. Gasperi, T.D. Märk, and S. van Ruth. (2006). *In Vivo* Monitoring of Strawberry Flavour Release from Model Custards: Effect of Texture and Oral Processing. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(1), 53-58.
- Arancibia, C., L. Jublot, E. Costell, and S. Bayarri. (2011). Flavor Release and Sensory Characteristics of O/W Emulsions. Influence of Composition, Microstructure and Rheological Behavior. *Food Research International*, 44(6), 1632-41.
- Arvisenet, G., N. Cayot, and A. Voilley. (2003). Physicochemical Interactions between Starch and Aroma Compounds and Their Effects on Aroma Retention in Food Like Matrices. *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century*. edited by J. L. LeQuere and P. X. Etievant Paris 08: Lavoisier - Tec & Doc.
- Astorg, P., N. Arnault, S. Czernichow, N. Noisette, P. Galan, and S. Hercberg. (2004). Dietary Intakes and Food Sources of N-6 and N-3 Pufa in French Adult Men and Women. *Lipids*, 39(6), 527-35.
- Avila, M., S. Garde, E. Fernandez-Garcia, M. Medina, and M. Nunez. (2006). Effect of High-Pressure Treatment and a Bacteriocin-Producing Lactic Culture on the Odor and Aroma of Hispanico Cheese: Correlation of Volatile Compounds and Sensory Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 382-89.

## B

- Baek, I., R. S. Linforth, A. Blake, and A. J. Taylor. (1999). Sensory Perception Is Related to the Rate of Change of Volatile Concentration in-Nose During Eating of Model Gels. *Chemical Senses*, 24(2), 155-60.
- Baines, Z. V., and E. R. Morris. (1987). Flavour/Taste Perception in Thickened Systems: The Effect of Guar Gum above and Below C. *Food Hydrocolloids*, 1(3), 197-205.

- Bakker, J., N. Boudaud, and M. Harrison. (1998). Dynamic Release of Diacetyl from Liquid Gelatin in the Headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2714-20.
- Bartoshuk, L. M., K. Rennert, J. Rodin, and J. C. Stevens. (1982). Effects of Temperature on the Perceived Sweetness of Sucrose. *Physiology & Behavior*, 28(5), 905-10.
- Bayarri, S., A. J. Taylor, and J. Hort. (2006). The Role of Fat in Flavor Perception: Effect of Partition and Viscosity in Model Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8862-68.
- Bayarri, S., T. Smith, T. Hollowood, and J. Hort. (2007). The Role of Rheological Behaviour in Flavour Perception in Model Oil/Water Emulsions. *European Food Research and Technology*, 226(1-2), 161-68.
- Beaune, P. H., and M. A. Loriot. (2000). Molecular Basis of Individual Susceptibility to Xenobiotics. *M S-Medecine Sciences*, 16(10), 1051-56.
- Bellamy M., Godinot N., Mischler S., Martin N. & Hartmann C. (2009). Influence of Emulsion Composition on Lubrication Capacity and Texture Perception. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 1939-49.
- Ben-Arie, N., M. Khen, and D. Lancet. (1993). Glutathione S-Transferases in Rat Olfactory Epithelium: Purification, Molecular Properties and Odorant Biotransformation. *Biochem J*, 292, 379-84.
- Berry, B. W., R. L. Joseph, and M. S. Stanfield. (1996). Use of Electrical Stimulation, Hot Processing and Carrageenan for Processing Low-Fat Ground Beef Patties. *Meat Science*, 42(1), 111-23.
- Biasioli, F., F. Gasperi, E. Aprea, I. Endrizzi, V. Framondino, F. Marini, D. Mott, and T. D. Mark. (2006). Correlation of Ptr-Ms Spectral Fingerprints with Sensory Characterisation of Flavour and Odour Profile of "Trentingrana" Cheese. *Food Quality and Preference*, 17(1-2), 63-75.
- Biguzzi, C., P. Schlich, and C. Lange. (2014). The Impact of Sugar and Fat Reduction on Perception and Liking of Biscuits. *Food Quality and Preference*, 35, 41-47.
- Blee, N., R. Linforth, N. Yang, K. Brown, and A. Taylor. (2011). Variation in Aroma Release between Panellists Consuming Different Types of Confectionary. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(3), 186-91.
- Boesveldt, S., and J. N. Lundstrom. (2014). Detecting Fat Content of Food from a Distance: Olfactory-Based Fat Discrimination in Humans. *Plos One*, 9(1).
- Bogdanffy, M. S. (1990). Biotransformation Enzymes in the Rodent Nasal Mucosa: The Value of a Histochemical Approach. *Environ Health Perspect*, 85, 177-86.
- Bogdanffy, M. S., and M. L. Taylor. (1993). Kinetics of Nasal Carboxylesterase-Mediated Metabolism of Vinyl Acetate. *Drug Metab Dispos*, 21(6), 1107-11.
- Bogdanffy, M. S., R. Sarangapani, J. S. Kimbell, S. R. Frame, and D. R. Plowchalk. (1998). Analysis of Vinyl Acetate Metabolism in Rat and Human Nasal Tissues by an in Vitro Gas Uptake Technique." *Toxicol Sci*, 46(2), 235-46.

- Bogdanffy, M. S., R. Sarangapani, D. R. Plowchalk, A. Jarabek, and M. E. Andersen. (1999). A Biologically Based Risk Assessment for Vinyl Acetate-Induced Cancer and Noncancer Inhalation Toxicity. *Toxicol Sci*, 51(1),19-35.
- Boland, A. B., K. Buhr, P. Giannouli, and S. M. van Ruth. (2004). Influence of Gelatin, Starch, Pectin and Artificial Saliva on the Release of 11 Flavour Compounds from Model Gel Systems. *Food Chemistry*, 86(3), 401-11.
- Boland, A. B., C. M. Delahunty, and S. M. van Ruth. (2006). Influence of the Texture of Gelatin Gels and Pectin Gels on Strawberry Flavour Release and Perception. *Food Chemistry*, 96(3), 452-60.
- Bowen, D., P. Green, N. Vizenor, C. Vu, P. Kreuter, and B. Rolls. (2003). Effects of Fat Content on Fat Hedonics: Cognition or Taste?. *Physiology & Behavior*, 78(2), 247-53.
- Brauss, M.S., R.S.T. Linforth, I. Cayeux, B. Harvey, and A.J. Taylor. (1999a). Altering the Fat Content Affects Flavor Release in a Model Yogurt System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2055-59.
- Brauss, M. S., B. Balders, R. S. T. Linforth, S. Avison, and A. J. Taylor. (1999b). Fat Content, Baking Time, Hydration and Temperature Affect Flavour Release from Biscuits in Model-Mouth and Real Systems. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(6), 351-57.
- Buck, L., and R. Axel. (1991). A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors - a Molecular-Basis for Odor Recognition. *Cell*, 65(1), 175-87.
- Buettner, A., A. Beer, C. Hannig, and M. Settles. (2001). Observation of the Swallowing Process by Application of Videofluoroscopy and Real-Time Magnetic Resonance Imaging-Consequences for Retronasal Aroma Stimulation. *Chemical Senses*, 26(9), 1211-19.
- Buettner, A., A. Beer, C. Hannig, M. Settles, and P. Schieberle. (2002). Physiological and Analytical Studies on Flavor Perception Dynamics as Induced by the Eating and Swallowing Process. *Food Quality and Preference*, 13(7-8), 497-504.
- Buffo, R. A., J. A. Rapp, T. Krick, and G. A. Reineccius. (2005). Persistence of Aroma Compounds in Human Breath after Consuming an Aqueous Model Aroma Mixture. *Food Chemistry*, 89(1),103-08.
- Bult, J. H. F., R. A. De Wijk, and T. Hummel. (2007). Investigations on Multimodal Sensory Integration: Texture, Taste, and Ortho- and Retronasal Olfactory Stimuli in Concert. *Neuroscience Letters*, 411(1)6-10.
- Burseg, K., R. S. T. Linforth, J. Hort, and A. J. Taylor. (2009). Flavor Perception in Biscuits; Correlating Sensory Properties with Composition, Aroma Release, and Texture. *Chemosensory Perception*, 2(2), 70-78.

## C

- Calvino, A. M. (1986). Perception of Sweetness - the Effects of Concentration and Temperature.. *Physiology & Behavior*, 36(6), 1021-28.



- Camacho, S., E. den Hollander, F. van de Velde, and M. Stieger. (2015). Properties of Oil/Water Emulsions Affecting the Deposition, Clearance, and after-Feel Sensory Perception of Oral Coatings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(8), 2145-53.
- Campbell, J. L., M. E. Andersen, and H. J. Clewell. (2014). A Hybrid Cfd-Pbpbk Model for Naphthalene in Rat and Human with Ivive for Nasal Tissue Metabolism and Cross-Species Dosimetry. *Inhal Toxicol*, 26(6), 333-44.
- Cardello, A. V. (1996). The Role of the Human Senses in Food Behavior .2. Texture. *Cereal Foods World*, 41(6), 469-70.
- Carr, J., C. Baloga, X. Guinard, L. Lawter, C. Marty, and C. Squire. (1996). The Effect of Gelling Agent Type and Concentration on Flavor Release in Model Systems. In *Flavor-Food Interactions*, 98-108, ACS symposium.
- Carrapiso, A. I. (2007). Effect of Fat Content on Flavour Release from Sausages. *Food Chemistry*, 103(2), 396-403.
- Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya, and S. Damak. (2010). Taste Preference for Fatty Acids Is Mediated by Gpr40 and Gpr120. *Journal of Neuroscience*, 30(25), 8376-82.
- Cayot, N., F. Pretot, J. L. Doublier, J. M. Meunier, and E. Guichard. (2004). Release of Isoamyl Acetate from Starch Pastes of Various Structures: Thermodynamic and Kinetic Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5436-42.
- Chale-Rush, A., J. R. Burgess, and R. D. Mattes. (2007). Evidence for Human Orosensory (Taste ?) Sensitivity to Free Fatty Acids. *Chemical Senses*, 32(5), 423-31.
- Chen, J. (2009). Food Oral Processing. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 1-25.
- Chertemps, T., A. Francois, N. Durand, G. Rosell, T. Dekker, P. Lucas, and M. Maibeche-Coisne. (2012). A Carboxylesterase, Esterase-6, Modulates Sensory Physiological and Behavioral Response Dynamics to Pheromone in *Drosophila*. *BMC Biol*, 10,56.
- Chertemps, T., F. Younus, C. Steiner, N. Durand, C. W. Coppin, G. Pandey, J. G. Oakeshott, and M. Maibeche. (2015). An Antennal Carboxylesterase from *Drosophila Melanogaster*, Esterase 6, Is a Candidate Odorant-Degrading Enzyme toward Food Odorants. *Front Physiol*, 6, 315.
- Chobpattana, W., I. J. Jeon, J. S. Smith, and T. M. Loughin. (2002). Mechanisms of Interaction between Vanillin and Milk Proteins in Model Systems. *Journal of Food Science*, 67(3), 973-77.
- Clark, C. C., and H. T. Lawless. (1994). Limiting Response Alternatives in Time-Intensity Scaling - an Examination of the Halo-Dumping Effect. *Chemical Senses*, 19(6), 583-94.
- Cliff, M., and A. C. Noble. (1990). Time-Intensity Evaluation of Sweetness and Fruitiness and Their Interaction in a Model Solution. *Journal of Food Science*, 55(2), 450-54.
- Colmenero, F. J. (2000). Relevant Factors in Strategies for Fat Reduction in Meat Products. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2),56-66.

- Cook, D. J., T. A. Hollowood, R. S. T. Linforth, and A. J. Taylor. (2002). Perception of Taste Intensity in Solutions of Random-Coil Polysaccharides above and Below C. *Food Quality and Preference*, 13(7-8), 473-80.
- Cook, D.J., R.S.T. Linforth, and A.J. Taylor. (2003). Effects of Hydrocolloid Thickeners on the Perception of Savory Flavors.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3067-72.
- Cook, D. J., T. A. Hollowood, R. S. T Linforth, and A. J. Taylor. (2005). Correlating Instrumental Measurements of Texture and Flavour Release with Human Perception. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(6), 631-41.
- Costell, E., M. Peyrolon, and L. Duran. (2000). Influence of Texture and Type of Hydrocolloid on Perception of Basic Tastes in Carrageenan and Gellan Gels. *Food Science and Technology International*, 6(6), 495-98.
- Cross, H. R., B. W. Berry, and L. H. Wells. (1980). Effects of Fat Level and Source on the Chemical, Sensory and Cooking Properties of Ground-Beef Patties. *Journal of Food Science*, 45(4), 791-93.

## D

- Davidson, J.M., R.S.T. Linforth, T.A. Hollowood, and A.J. Taylor. (1999). Effect of Sucrose on the Perceived Flavor Intensity of Chewing Gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4336-40.
- De Wijk, R. A., L. J. van Gemert, M. E. J. Terpstra, and C. L. Wilkinson. "Texture of Semi-Solids; Sensory and Instrumental Measurements on Vanilla Custard Desserts." [In English]. *Food Quality and Preference* 14, no. 4 (Jun 2003): 305-17.
- De Wijk, R. A., and J. F. Prinz. (2006). Mechanisms Underlying the Role of Friction in Oral Texture. *Journal of Texture Studies*, 37(4), 413-27.
- De Wijk, R. A., C. Kapper, P. Borsboom, and J. F. Prinz. (2009). Persistence of Oral Coatings of Cmc and Starch-Based Custard Desserts. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 896-900.
- Debat, H., C. Eloit, F. Blon, B. Sarazin, C. Henry, J. C. Huet, D. Trotier, and J. C. Pernollet. (2007). Identification of Human Olfactory Cleft Mucus Proteins Using Proteomic Analysis. *Journal of Proteome Research*, 6(5), 1985-96.
- Delahunty, C. M., J. R. Piggott, J. M. Conner, and A. Paterson. (1996). Comparative Volatile Release from Traditional and Reduced-Fat Cheddar Cheeses Upon Mastication in the Mouth. *Italian Journal of Food Science*, 8(2), 89-98.
- Delarue, J. and Giampaoli, P. (2006). Carbohydrate-Flavour Interactions. *In Flavour in Food*. 208-28.
- Deleris, I., I. Andriot, M. Gobet, C. Moreau, I. Souchon, and E. Guichard. (2010). Determination of Aroma Compound Diffusion in Model Food Systems: Comparison of Macroscopic and Microscopic Methodologies. *Journal of Food Engineering*, 100(3), 557-66.

- Deleris, I., A. Saint-Eve, F. Dakowski, E. Semon, J. L. Le Quere, H. Guillemin, and I. Souchon. (2011a). The Dynamics of Aroma Release During Consumption of Candies of Different Structures, and Relationship with Temporal Perception. *Food Chemistry*, 127(4), 1615-24.
- Délérís, I., A. Saint-Eve, E. Sémon, J.L. Le Quere, H. Guillemin, and I. Souchon. (2011b). The Dynamics of Aroma Release During the Consumption of Candies with Different Structures. Relationship with Temporal Perception. In *The 5th International Conference on Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry and its Applications*, 4 p. Obergurgl (Autriche).
- Delwiche, J. F., Z. Buletic, and P. A. S. Breslin. (2001). Relationship of Papillae Number to Bitter Intensity of Quinine and Prop within and between Individuals. *Physiology & Behavior*, 74(3), 329-37.
- Denker, M., M. Parat-Wilhelms, G. Drichelt, J. Paucke, A. Luger, K. Borcharding, W. Hoffmann, and H. Steinhart. (2006). Investigation of the Retronasal Flavour Release During the Consumption of Coffee with Additions of Milk Constituents by Oral Breath Sampling. *Food Chemistry*, 98(2), 201-08.
- Depled, F. (1998). Evaluation Sensorielle : Manuel Méthodologique, Paris, Tec&Doc Lavoisier.
- Doyennette, M., I. Deleris, G. Feron, E. Guichard, I. Souchon, and I. C. Trelea. (2014). Main Individual and Product Characteristics Influencing in-Mouth Flavour Release During Eating Masticated Food Products with Different Textures: Mechanistic Modelling and Experimental Validation. *Journal of Theoretical Biology*, 340, 209-21.
- Drewnowski, A. (1995). Energy Intake and Sensory Properties of Food. *The American journal of clinical nutrition*, 62(5), 1081S-85S.
- Drewnowski, A., B.M. Popkin. (1997). Why Do We Like Fat? *Journal of the American Dietetic Association*, 97(7), S58-S62.
- Drewnowski, A., E. E. Shrager, C. Lipsky, E. Stellar, and M. R. C. Greenwood. (1989). Sugar and Fat - Sensory and Hedonic Evaluation of Liquid and Solid Foods. *Physiology & Behavior*, 45(1), 177-83.
- Drewnowski, A. (2005). Concept of a Nutritious Food: Toward a Nutrient Density Score. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(4), 721-32.
- Dussort, P., N. Depretre, E. Bou-Maroun, C. Fant, E. Guichard, P. Brunerie, Y. Le Fur, and J. L. Le Quere. (2012). An Original Approach for Gas Chromatography-Olfactometry Detection Frequency Analysis: Application to Gin. *Food Research International*, 49(1), 253-62.

## E

- Engel, W., W. Bahr, and P. Schieberle. (1999). Solvent Assisted Flavour Evaporation - a New and Versatile Technique for the Careful and Direct Isolation of Aroma Compounds from Complex Food Matrices. *European Food Research and Technology*, 209(3-4), 237-41.
- Engelen, L., R. A. de Wijk, J. F. Prinz, A. M. Janssen, H. Weenen, and F. Bosman. (2003). The Effect of Oral and Product Temperature on the Perception of Flavor and Texture Attributes of Semi-Solids. *Appetite*, 41(3), 273-81.

Engelen, L., A. Fontijn-Tekamp, and A. van der Bilt. (2005). The Influence of Product and Oral Characteristics on Swallowing. *Archives of Oral Biology*, 50(8), 739-46.

## F

Faure, P., A. Legendre, H. I. Hanser, I. Andriot, Y. Artur, E. Guichard, G. Coureaud, and J. M. Heydel. (2016). Odorant Metabolism Analysis by an Automated Ex Vivo Headspace Gas-Chromatography Method. *Chemical Senses*, 41(1), 15-23.

Ferry, A. L., J. Hort, J. R. Mitchell, D. J. Cook, S. Lagarrigue, and B. V. Pamies. (2006). Viscosity and Flavour Perception: Why Is Starch Different from Hydrocolloids?. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 855-62.

Folch, J., M. Lees, and G. H. S. Stanley. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.

Foster, K. D., J. M. V. Grigor, J. N. Cheong, M. J. Y. Yoo, J. E. Bronlund, and M. P. Morgenstern. (2011). The Role of Oral Processing in Dynamic Sensory Perception. *Journal of Food Science*, 76(2) R49-R61.

Frank, R. A., and J. Byram. (1988). Taste Smell Interactions Are Tastant and Odorant Dependent. *Chemical Senses*, 13(3), 445-55.

Frank, D., I. Appelqvist, U. Piyasiri, and C. Delahunty. (2012). In Vitro Measurement of Volatile Release in Model Lipid Emulsions Using Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(9), 2264-73.

Frost, M. B., G. Dijksterhuis, and M. Martens. (2001). Sensory Perception of Fat in Milk. *Food Quality and Preference*, 12(5-7), 327-36.

Fuentes, V., J. Ventanas, D. Morcuende, and S. Ventanas. (2013). Effect of Intramuscular Fat Content and Serving Temperature on Temporal Sensory Perception of Sliced and Vacuum Packaged Dry-Cured Ham. *Meat Science*, 93(3), 621-29.

Fukuwatari, T., T. Kawada, M. Tsuruta, T. Hiraoka, T. Iwanaga, E. Sugimoto, and T. Fushiki. (1997). Expression of the Putative Membrane Fatty Acid Transporter (Fat) in Taste Buds of the Circumvallate Papillae in Rats. *Febs Letters* 414(2), 461-64.

## G

Gallardo-Escamilla, F. J., A. L. Kelly, and C. M. Delahunty. (2007). Mouthfeel and Flavour of Fermented Whey with Added Hydrocolloids. *International Dairy Journal*, 17(4), 308-15.

Genovese, A., P. Piombino, A. Gambuti, and L. Moio. (2009). Simulation of Retronasal Aroma of White and Red Wine in a Model Mouth System. Investigating the Influence of Saliva on Volatile Compound Concentrations. *Food Chemistry*, 114(1), 100-07.

Gervasi, P. G., V. Longo, F. Naldi, G. Panattoni, and F. Ursino. (1991). Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Human Respiratory Nasal Mucosa. *Biochem Pharmacol*, 41(2), 177-84.

- Getchell, T. V., F. L. Margolis, and M. L. Getchell. (1984). Perireceptor and Receptor Events in Vertebrate Olfaction. *Progress in Neurobiology*, 23(4), 317-330
- Gierczynski, I., H. Laboure, and E. Guichard. (2006). In Vivo Aroma Release Measurements and Sensory Perception of Flavoured Milk Proteins Gels. Paper presented at the IUFOST 13th World Congress of Food Science & Technology, Nantes (France).
- Gierczynski, I., H. Laboure, E. Semon, and E. Guichard. (2007). Impact of Hardness of Model Fresh Cheese on Aroma Release: In Vivo and in Vitro Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3066-73.
- Gierczynski, I., H. Laboure, and E. Guichard. (2008). In Vivo Aroma Release of Milk Gels of Different Hardnesses: Inter-Individual Differences and Their Consequences on Aroma Perception." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1697-703.
- Gierczynski, I., E. Guichard, and H. Laboure. (2011). Aroma Perception in Dairy Products: The Roles of Texture, Aroma Release and Consumer Physiology. A Review. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(3), 141-52.
- Gilbertson, T. A., and N. A. Khan. (2014). Cell Signaling Mechanisms of Oro-Gustatory Detection of Dietary Fat: Advances and Challenges. *Progress in Lipid Research*, 53,82-92.
- Gonzalez-Tomas, L., S. Bayarri, A. J. Taylor, and E. Costell. (2007). Flavour Release and Perception from Model Dairy Custards. *Food Research International*, 40(4) 520-28.
- Gonzalez-Tomas, L., S. Bayarri, A. J. Taylor, and E. Costell. 2008). Rheology, Flavour Release and Perception of Low-Fat Dairy Desserts. *International Dairy Journal*, 18 (8)858-66.
- Green, N., M. Weech, and E. Walters. (2005). Localization and Characterization of Glutathione-S-Transferase Isozymes Alpha, Mu, and Pi within the Mouse Vomeronasal Organ. *Neurosci Lett*, 375(3), 198-202.
- Grote, C., and J. Pawliszyn. (1997). Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Human Breath. *Analytical Chemistry* 69(4), 587-96.
- Gu, J., T. Su, Y. Chen, Q. Y. Zhang, and X. Ding. (2000). Expression of Biotransformation Enzymes in Human Fetal Olfactory Mucosa: Potential Roles in Developmental Toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 165(2), 158-62.
- Guenette, J. A., J. D. Witt, D. C. McKenzie, J. D. Road, and A. W. Sheel. (2007). Respiratory Mechanics During Exercise in Endurance-Trained Men and Women. *Journal of Physiology-London*, 581(3)1309-22.
- Guerrier, Y.; Uziel, A. (1983). Physiologie Neuro-Sensorielle En Orl. In Mac Leod, P. ,Sauvageot, F., Cahiers De L'ensbana : Bases Neurophysiologiques De L'evaluation Sensorielle Des Produits Alimentaires, Lavoisier.
- Guinard, J. X., and C. Marty. (1995). Time-Intensity Measurement of Flavor Release from a Model Gel System - Effect of Gelling Agent Type and Concentration. *Journal of Food Science*, 60(4), 727-30.

Guichard, E., E. Sémon, I. Gierczynski, C. Tournier, A. Saint-Eve, I. Souchon, C. Sulmont-Rossé, and H. Labouré. (2010). Texture-Aroma Interactions in Dairy Products: Do *in-Vivo* and *in-Vitro* Aroma Release Explain Sensory Perception?". Chap. 3. In-vivo measurements in flavour release In *Expression of Multidisciplinary Flavour Science. Proceedings of the 12th Weurman Symposium. Interlaken, Switzerland, 2008 (607 P.)*, edited by Imre Blank, Matthias Wüst and Chahan Yeretzyan. 117-20. Winterthur (Switzerland): ZHAW Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften.

## H

Haahr, A. M., A. Bardow, C. E. Thomsen, S. B. Jensen, B. Nauntofte, M. Bakke, J. Adler-Nissen, and W. L. P. Bredie. (2004). Release of Peppermint Flavour Compounds from Chewing Gum: Effect of Oral Functions. *Physiology & Behavior*, 82(2-3), 531-40.

Hadnadev, M., T. D. Hadnadev, L. Dokic, B. Pajin, A. Torbica, L. Saric, and P. Ikonc. (2014). Physical and Sensory Aspects of Maltodextrin Gel Addition Used as Fat Replacers in Confectionery Filling Systems. *Lwt-Food Science and Technology*, 59( 1),495-503.

Hanaoka, K., N. Vallet, P. Giampaoli, B. Heyd, and P. MacLeod. (2001). Possible Influence of Breathing on Detection Frequency and Intensity Rating in Gas Chromatography-Olfactometry. *Food Chemistry*, 72(1), 97-103.

Hansel, A., A. Jordan, R. Holzinger, P. Prazeller, W. Vogel, and W. Lindinger. (1995). Proton-Transfer Reaction Mass-Spectrometry - Online Trace Gas-Analysis at the Ppb Level. *International Journal of Mass Spectrometry*, 149, 609-19.

Hansson, A., P. Giannouli, and S. Van Ruth. (2003). The Influence of Gel Strength on Aroma Release from Pectin Gels in a Model Mouth and in Vivo, Monitored with Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4732-40.

Heinze, J. M., H. Preissl, A. Fritsche, and S. Frank. (2015). Controversies in Fat Perception. *Physiology & Behavior*, 152, 479-93.

Helleman, U. (1992). Perceived Taste of Nacl and Acid Mixtures in Water and Bread. *International Journal of Food Science and Technology*, 27(2), 201-11.

Heydel, J. M., E. J. Holsztynska, A. Legendre, N. Thiebaud, Y. Artur, and A. M. Le Bon. (2010). Udp-Glucuronosyltransferases (Ugts) in Neuro-Olfactory Tissues: Expression, Regulation, and Function. *Drug Metab Rev*, 42(1),71-94.

Heydel, J. M., A. Coelho, N. Thiebaud, A. Legendre, A. M. Le Bon, P. Faure, F. Neiers *et al.* (2013). Odorant-Binding Proteins and Xenobiotic Metabolizing Enzymes: Implications in Olfactory Perireceptor Events. *Anat Rec (Hoboken)*, 296(9), 1333-45.

Hill, S. E., and K. J. Prusa. (1989). Physical and Sensory Properties of Lean Ground-Beef Patties Containing Methylcellulose and Hydroxypropylmethylcellulose. *Journal of Food Quality*, 11(4), 331-37.

Hodgson, M., R. S. T. Linforth, and A. J. Taylor. (2003). Simultaneous Real-Time Measurements of Mastication, Swallowing, Nasal Airflow, and Aroma Release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5052-57.

Hollowood, T.A., R.S.T. Linforth, and A.J. Taylor. (2000). The Relationship between Carvone Release and the Perception of Mintyness in Gelatine Gels. In *Flavor Release*, edited by D.D. Roberts and A.J. Taylor. Acs Symposium Series 763, 370-80. Washington DC (USA): American Chemical Society.

Hollowood, T. A., R. S. T. Linforth, and A. J. Taylor. (2002). The Effect of Viscosity on the Perception of Flavour. *Chemical Senses*, 27(7),583-91.

Hoon, M. A., E. Adler, J. Lindemeier, J. F. Battey, N. J. P. Ryba, and C. S. Zuker. (1999). Putative Mammalian Taste Receptors: A Class of Taste-Specific Gpcrs with Distinct Topographic Selectivity. *Cell*, 96(4), 541-51.

Hoppert, K., S. Zahn, A. Puschmann, I. Ullmann, and H. Rohm. (2012). Quantification of Sensory Difference Thresholds for Fat and Sweetness in Dairy-Based Emulsions. *Food Quality and Preference*, 26(1) 52-57.

Hort, J., and T. A. Hollowood. (2004). Controlled Continuous Flow Delivery System for Investigating Taste-Aroma Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4834-43.

Hubbs, A. F., A. M. Cumpston, W. T. Goldsmith, L. A. Battelli, M. L. Kashon, M. C. Jackson, D. G. Frazer, *et al.* (2012). Respiratory and Olfactory Cytotoxicity of Inhaled 2,3-Pentanedione in Sprague-Dawley Rats. *Am J Pathol*, 181(3), 829-44.

Hwang, I. Y., K. F. Reardon, J. D. Tessari, and R. S. Yang. (1996). A Gas-Liquid System for Enzyme Kinetic Studies of Volatile Organic Chemicals. Determination of Enzyme Kinetic Constants and Partition Coefficients of Trichloroethylene. *Drug Metab Dispos*, 24(4), 377-82.

## I

Ingham, K. E., R. S. T. Linforth, and A. J. Taylor. (1995). The Effect of Eating on the Rate of Aroma Release from Mint-Flavored Sweets. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(1), 105-10.

Iyanagi, T. (2007). Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. *Int Rev Cytol*, 260, 35-112.

## J

Jimenez-Colmenero, F., S. Cofrades, I. Lopez-Lopez, C. Ruiz-Capillas, T. Pintado, and M. T. Solas. (2010). Technological and Sensory Characteristics of Reduced/Low-Fat, Low-Salt Frankfurters as Affected by the Addition of Konjac and Seaweed. *Meat Science*, 84(3),356-63.

Jones, P. M., and A. M. George. (2004). The Abc Transporter Structure and Mechanism: Perspectives on Recent Research. *Cell Mol Life Sci*, 61(6), 682-99.

Jouquand, C., Y. Aguni, C. Malhiac, and M. Grisel. (2008). Influence of Chemical Composition of Polysaccharides on Aroma Retention. *Food Hydrocolloids*, 22(6), 1097-104.

Juteau, A., N. Cayot, C. Chabanet, J. L. Doublier, and E. Guichard. (2004a). Flavour Release from Polysaccharide Gels: Different Approaches for the Determination of Kinetic Parameters. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 394-402.

Juteau, A., C. Tournier, and E. Guichard. (2004b). Influence of Type and Amount of Gelling Agent on Flavour Perception: Physiochemical Effect or Interaction between Senses?. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6)483-90.

## K

Kamphuis, M., M. S. Westerterp-Plantenga, and W. H. M. Saris. (2001). Fat-Specific Satiety in Humans for Fat High in Linoleic Acid Vs Fat High in Oleic Acid. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(6), 499-508.

Kawai, T., and T. Fushiki. (2003). Importance of Lipolysis in Oral Cavity for Orosensory Detection of Fat. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 285(2), R447-R54.

Kersiene, M., A. Adams, A. Dubra, N. De Kimpe, and D. Leskauskaite. (2008). Interactions between Flavour Release and Rheological Properties in Model Custard Desserts: Effect of Starch Concentration and Milk Fat. *Food Chemistry*, 108(4), 1183-91.

Kettaneh, A., O. Fain, J. Stirnemann, and M. Thomas. (2002). Taste Disorders. *Revue De Medecine Interne*, 23(7), 622-31.

Kilbride, E., P. McLoughlin, C. G. Gallagher, and H. R. Harty. (2003). Do Gender Differences Exist in the Ventilatory Response to Progressive Exercise in Males and Females of Average Fitness? *European Journal of Applied Physiology*, 89(6)595-602.

Kim, J. W., S. S. Samant, Y. Seo, and H. S. Seo. (2015). Variation in Saltiness Perception of Soup with Respect to Soup Serving Temperature and Consumer Dietary Habits. *Appetite*, 84, 73-78.

Kopjar, M., I. Andriot, A. Saint-Eve, I. Souchon, and E. Guichard. (2010). Retention of Aroma Compounds: An Interlaboratory Study on the Effect of the Composition of Food Matrices on Thermodynamic Parameters in Comparison with Water. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(8), 1285-92.

Kuhn, J., C. M. Delahunty, T. Considine, and H. Singh. (2009). In-Mouth Flavour Release from Milk Proteins. *International Dairy Journal*, 19(5),307-13.

Kuo, Y. L., R. M. Pangborn, and A. C. Noble. (1993). Temporal Patterns of Nasal, Oral, and Retronasal Perception of Citral and Vanillin and Interaction of These Odorants with Selected Tastants. *International Journal of Food Science and Technology*, 28(2), 127-37.

Kurihara, K., and M. Kashiwayanagi. (1998). Introductory Remarks on Umami Taste. In *Olfaction and Taste Xii: An International Symposium*, edited by C. Murphy. Annals of the New York Academy of Sciences, 393-97. New York: New York Acad Sciences.

## L



- Lafarge, C., M. H. Bard, A. Breuvert, J. L. Doublier, and N. Cayot. (2008). Influence of the Structure of Cornstarch Dispersions on Kinetics of Aroma Release. *Journal of Food Science*, 73(2), S104-S09.
- Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayer, and P. Besnard. (2005). Cd36 Involvement in Orosensory Detection of Dietary Lipids, Spontaneous Fat Preference, and Digestive Secretions. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3177-84.
- Lauwerys, R. (2007). Toxicologie Industrielle Et Intoxications Professionnelles. *Elsevier Masson SAS*.
- Lawrence, G., C. Salles, C. Septier, J. Busch, and T. Thomas-Danguin. (2009). Odour-Taste Interactions: A Way to Enhance Saltiness in Low-Salt Content Solutions. *Food Quality and Preference*, 20(3), 241-48.
- Lawrence, G., C. Salles, O. Palicki, C. Septier, J. Busch, and T. Thomas-Danguin. (2011). Using Cross-Modal Interactions to Counterbalance Salt Reduction in Solid Foods. *International Dairy Journal*, 21(2), 103-10.
- Lazard, D., K. Zupko, Y. Poria, P. Nef, J. Lazarovits, S. Horn, M. Khen, and D. Lancet. (1991). Odorant Signal Termination by Olfactory Udp Glucuronosyl Transferase. *Nature*, 349(6312), 790-3.
- Le Calve, B., C. Saint-Leger, R. Babas, J. L. Gelin, A. Parker, P. Erni, and I. Cayeux. (2015). Fat Perception: How Sensitive Are We?. *Journal of Texture Studies*, 46(3), 200-11.
- Le Quéré, J.L., C. Septier, D. Demaizieres, and C. Salles. (1996). Identification and Sensory Evaluation of the Character-Impact Compounds of Goat Cheese Flavour. Paper presented at the The 8th Weurman Flavour Research Symposium, Reading (Great Britain).
- Le Quéré, J.L., I. Gierczynski, D. Langlois, and E. Sémon. (2006). Nosespace with an Ion Trap Mass Spectrometer: Quantitative Aspects. In *Flavour Science: Recent Advances and Trends*, edited by W. L. P. Bredie and M. A. Petersen. 589-92: Elsevier, Oxford (GBR).
- Le Quéré, J.L., I. Délérís, E. Sémon, A.Saint-Eve, and I. Souchon. (2009). Aroma Release with Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Apci) and Proton Transfer Reaction (Ptr) Mass Spectrometry: Competition and Quantitative Aspects. Paper presented at the The 4<sup>th</sup> International Conference on Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry and its Applications, Obergurgl (Autriche).
- Leal, W. S., X. W. Shi, K. Nakamuta, M. Ono, and J. Meinwald. (1995). Structure, Stereochemistry, and Thermal-Isomerization of the Male Sex-Pheromone of the Longhorn Beetle *Anaglyptus-Subfasciatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), 1038-42.
- Leclerc, S., J. M. Heydel, V. Amosse, D. Gradinaru, M. Cattarelli, Y. Artur, H. Goudonnet, *et al.* (2002). Glucuronidation of Odorant Molecules in the Rat Olfactory System: Activity, Expression and Age-Linked Modifications of Udp-Glucuronosyltransferase Isoforms, Ugt1a6 and Ugt2a1, and Relation to Mitral Cell Activity. *Brain Res Mol Brain Res*, 107(2), 201-13.
- Lee, W. E., and R. M. Pangborn. (1986). Time-Intensity - the Temporal Aspects of Sensory Perception. *Food Technology*, 40(11), 71-92.

- Legendre, A., P. Faure, H. Tiesset, C. Potin, I. Jakob, G. Sicard, B. Schaal, *et al.* (2014). When the Nose Must Remain Responsive: Glutathione Conjugation of the Mammary Pheromone in the Newborn Rabbit. *Chem Senses*, 39(5), 425-37.
- Lethuaut, L., C. Brossard, F. Rousseau, B. Bousseau, and C. Genot. (2003). Sweetness-Texture Interactions in Model Dairy Desserts: Effect of Sucrose Concentration and the Carrageenan Type. *International Dairy Journal*, 13(8), 631-41.
- Lethuaut, L., K. G. C. Weel, A. E. M. Boelrijk, and C. D. Brossard. (2004). Flavor Perception and Aroma Release from Model Dairy Desserts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(11), 3478-85.
- Lethuaut, L., C. Brossard, A. Meynier, F. Rousseau, G. Llamas, B. Bousseau, and C. Genot. (2005). Sweetness and Aroma Perceptions in Dairy Desserts Varying in Sucrose and Aroma Levels and in Textural Agent. *International Dairy Journal*, 15(5), 485-93.
- Lewis, J. L., K. J. Nikula, R. Novak, and A. R. Dahl. (1994). Comparative Localization of Carboxylesterase in F344 Rat, Beagle Dog, and Human Nasal Tissue. *Anat Rec*, 239(1), 55-64.
- Lindemann, B. (2001). Receptors and Transduction in Taste. *Nature* 413(6852), 219-25.
- Linforth, R. S. T., I. Savary, B. Pattenden, and A. J. Taylor. (1994). Volatile Compounds Found in Expired Air During Eating of Fresh Tomatoes and in the Headspace above Tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65(2), 241-47.
- Linforth, R., F. Martin, M. Carey, J. Davidson, and A. J. Taylor. (2002). Retronasal Transport of Aroma Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1111-17.
- Linforth, R. S. T., K. S. K. Pearson, and A. J. Taylor. (2007). In Vivo Flavor Release from Gelatin-Sucrose Gels Containing Droplets of Flavor Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7859-63.
- Louis, B., G. M. Glass, and J. J. Fredberg. (1994). Pulmonary Airway Area by the 2-Microphone Acoustic Reflection Method. *Journal of Applied Physiology*, 76(5), 2234-40.
- Lubbers, S., and E. Guichard. (2003). The Effects of Sugars and Pectin on Flavour Release from a Fruit Pastille Model System. *Food Chemistry*, 81(2), 269-73.
- Lubbers, S., and E. Butler. (2010). Effects of Texture and Temperature on the Kinetic of Aroma Release from Model Dairy Custards. *Food Chemistry*, 123(2), 345-50.

## M

- Madrigal-Galan, B., and H. Heymann. (2006). Sensory Effects of Consuming Cheese Prior to Evaluating Red Wine Flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(1), 12-22.
- Maibeche-Coisne, M., A. A. Nikonov, Y. Ishida, E. Jacquin-Joly, and W. S. Leal. (2004). Pheromone Anosmia in a Scarab Beetle Induced by in Vivo Inhibition of a Pheromone-Degrading Enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31), 11459-64.
- Maîtrepierre, E., M. Sigoillot, and L. Briand. (2011). Des Saveurs Aux Récepteurs. *Biofutur*, 30(320), 24-27.

- Martin, C., M. Chevrot, H. Poirier, P. Passilly-Degrace, I. Niot, and P. Besnard. (2011). Cd36 as a Lipid Sensor. *Physiology & Behavior*, 105(1), 36-42.
- Martuscelli, M., G. Savary, P. Pittia, and N. Cayot. (2008). Vapour Partition of Aroma Compounds in Strawberry Flavoured Custard Cream and Effect of Fat Content. *Food Chemistry*, 108(4), 1200-07.
- Mattes, R. D. (2009). Is There a Fatty Acid Taste?. In *Annual Review of Nutrition*. Annual Review of Nutrition, 305-2.
- Mattes, R. D. (2011). Accumulating Evidence Supports a Taste Component for Free Fatty Acids in Humans. *Physiology & Behavior*, 104(4), 624-31.
- Mayer, U., A. Kuller, P. C. Daiber, I. Neudorf, U. Warnken, M. Schnolzer, S. Frings, and F. Mohrlen. (2009). The Proteome of Rat Olfactory Sensory Cilia. *Proteomics*, 9(2), 322-34.
- McClaran, S. R., C. A. Harms, D. F. Pegelow, and J. A. Dempsey. (1998). Smaller Lungs in Women Affect Exercise Hyperpnea. *Journal of Applied Physiology*, 84(6), 1872-81.
- Mei, J. B., G. A. Reineccius, W. B. Knighton, and E. P. Grimsrud. (2004). Influence of Strawberry Yogurt Composition on Aroma Release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6267-70.
- Mejean, C., M. Morzel, E. Neyraud, S. Issanchou, C. Martin, S. Bozonnet, C. Urbano, *et al.* (2015). Salivary Composition Is Associated with Liking and Usual Nutrient Intake. *Plos One*, 10(9).
- Mela, D. J., K. R. Langley, and A. Martin. (1994). No Effect of Oral or Sample Temperature on Sensory Assessment of Fat-Content. *Physiology & Behavior*, 56(4), 655-58.
- Mestres, M., N. Moran, A. Jordan, and A. Buettner. (2005). Aroma Release and Retronasal Perception During and after Consumption of Flavored Whey Protein Gels with Different Textures. 1. In Vivo Release Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 403-09.
- Mestres, M., R. Kieffer, and A. Buettner. (2006). Release and Perception of Ethyl Butanoate During and after Consumption of Whey Protein Gels: Relation between Textural and Physiological Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1814 -21.
- Mesurolle, J., A. Saint-Eve, I. Deleris, and I. Souchon. (2013). Impact of Fruit Piece Structure in Yogurts on the Dynamics of Aroma Release and Sensory Perception. *Molecules* 18(5), 6035-56.
- Miettinen, S. M., L. Hyvönen, R. S. T. Linforth, A. J. Taylor, and H. Tuorila. (2004). Temporal Aroma Delivery from Milk Systems Containing 0-5% Added Fat, Observed by Free Choice Profiling, Time Intensity and Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8111-18.
- Minn, A. L., H. Pelczar, C. Denizot, M. Martinet, J. M. Heydel, B. Walther, A. Minn, H. Goudonnet, and Y. Artur. (2005). Characterization of Microsomal Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases in the Rat Olfactory Mucosa. *Drug Metab Dispos*, 33(8), 1229-37.

- Mishellany-Dutour, A., A. Woda, H. Laboure, P. Bourdiol, P. Lachaze, E. Guichard, and G. Feron. (2012). Retro-Nasal Aroma Release Is Correlated with Variations in the in-Mouth Air Cavity Volume after Empty Deglutition. *Plos One* 7(7).
- Mitchell, M., N. P. Brunton, and M. G. Wilkinson. (2011). Impact of Salt Reduction on the Instrumental and Sensory Flavor Profile of Vegetable Soup. *Food Research International*, 44(4), 1036-43.
- Morris, J. B. (2013). Nasal Dosimetry of Inspired Naphthalene Vapor in the Male and Female B6c3f1 Mouse. *Toxicology*, 309(5) 66-72.
- Mosca, A. C., J. A. Rocha, G. Sala, F. van de Velde, and M. Stieger. (2012). Inhomogeneous Distribution of Fat Enhances the Perception of Fat-Related Sensory Attributes in Gelled Foods. *Food Hydrocolloids* 27(2), 448-55.

## N

- Nachtsheim, R., and E. Schlich. (2013). The Influence of 6-N-Propylthiouracil Bitterness, Fungiform Papilla Count and Saliva Flow on the Perception of Pressure and Fat. *Food Quality and Preference*, 29(2), 137-45.
- Nachtsheim, R., and E. Schlich. (2014). "The Influence of Oral Phenotypic Markers and Fat Perception on Fat Intake During a Breakfast Buffet and in a 4-Day Food Record. *Food Quality and Preference*, 32, 173-83.
- Nagashima, A., and K. Touhara. (2010). Enzymatic Conversion of Odorants in Nasal Mucus Affects Olfactory Glomerular Activation Patterns and Odor Perception. *J Neurosci*, 30(48), 16391-8.
- Nahon, D. F., Pany Koren, J. P. Roozen, and M. A. Posthumus. (1998). Flavor Release from Mixtures of Sodium Cyclamate, Sucrose, and an Orange Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4963-68.
- Nakagawa, J., S. Ishikura, J. Asami, T. Isaji, N. Usami, A. Hara, T. Sakurai, *et al.* (2002). Molecular Characterization of Mammalian Dicarbonyl/L-Xylulose Reductase and Its Localization in Kidney. *Journal of Biological Chemistry* 277(20), 17883-91.
- Nara, K., L. R. Saraiva, X. Ye, and L. B. Buck. (2011). A Large-Scale Analysis of Odor Coding in the Olfactory Epithelium. *J Neurosci*, 31(25), 9179-91.
- Nef, P., J. Heldman, D. Lazard, T. Margalit, M. Jaye, I. Hanukoglu, and D. Lancet. (1989). Olfactory-Specific Cytochrome P-450. Cdna Cloning of a Novel Neuroepithelial Enzyme Possibly Involved in Chemoreception. *J Biol Chem*, 264(12), 6780-5.
- Neyraud, E., J. Prinz, and E. Dransfield. (2003). Nacl and Sugar Release, Salivation and Taste During Mastication of Salted Chewing Gum. *Physiology & Behavior*, 79(4-5), 731-37.

## O

- Oka, Y., Y. Takai, and K. Touhara. (2009). Nasal Airflow Rate Affects the Sensitivity and Pattern of Glomerular Odorant Responses in the Mouse Olfactory Bulb. *J Neurosci*, 29(39), 12070-8.

Oppermann, U. C. T., and E. Maser. (2000). Molecular and Structural Aspects of Xenobiotic Carbonyl Metabolizing Enzymes. Role of Reductases and Dehydrogenases in Xenobiotic Phase I Reactions. *Toxicology* 144(1-3), 71-81.

Ovejero-López, I., A. M. Haahr, F. van den Berg, and W. L. P. Bredie. (2004). Flavor Release Measurement from Gum Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8119 - 26.

Overbosch, P., W. G. M. Afterof, and P. G. M. Haring. (1991). Flavor Release in the Mouth. *Food Reviews International* 7(2), 137-84.

## P

Paixao, J. A., J. B. Rodrigues, E. A. Esmerino, A. G. Cruz, and H. M. A. Bolini. (2014). Influence of Temperature and Fat Content on Ideal Sucrose Concentration, Sweetening Power, and Sweetness Equivalence of Different Sweeteners in Chocolate Milk Beverage. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7344-53.

Pangborn, R. M., I. M. Trabue, and A. S. Szczesniak. (1973). Effect of Hydrocolloids on Oral Viscosity and Basic Taste Intensities. *Journal of Texture Studies*, 4(2), 224-41.

Pedersen, A. M., A. Bardow, S. B. Jensen, and B. Nauntofte. (2002). Saliva and Gastrointestinal Functions of Taste, Mastication, Swallowing and Digestion. *Oral Diseases*, 8(3), 117-29.

Pepino, M. Y., L. Love-Gregory, S. Klein, and N. A. Abumrad. (2012). The Fatty Acid Translocase Gene Cd36 and Lingual Lipase Influence Oral Sensitivity to Fat in Obese Subjects. *Journal of Lipid Research*, 53(3), 561-66.

Perrin Blin, C. (2002). Etude Comparative Du Catabolisme De L'acide Ricinoléique Chez Les Levures Du Genre *Sporidiobolus* : Mise En Évidence Et Caractérisation Du Système Béta-Oxydant Impliqué. Université de Bourgogne.

Peyron, M.A., and L. Mioche. (1993). Rôle De La Force De Morsure Dans La Perception De La Dureté De Produits Visco-Élastiques. *Sciences des Aliments*, 13,359-65.

Peyron, A. , C. Lassauzay, and A. Woda. (2002). Effects of Increased Hardness on Jaw Movement and Muscle Activity During Chewing of Visco-Elastic Model Foods. *Experimental Brain Research*, 142(1), 41-51.

Pfeiffer, J. C., J. Hort, T. A. Hollowood, and A. J. Taylor. (2006) Taste-Aroma Interactions in a Ternary System: A Model of Fruitiness Perception in Sucrose/Acid Solutions. *Perception & Psychophysics*, 68(2), 216-27.

Pineau, N., S. Cordelle, and P. Schlich. (2004). Méthodes D'acquisition, De Codage Et D'analyse De Profils Sensoriels Temporels. In *8èmes Journées Agro-Industries et Méthodes Statistiques (congrès AGROSTAT)*, 7 p. (87-93). Rennes (France).

Pinero, M. P., K. Parra, N. Huerta-Leidenz, L. A. de Moreno, M. Ferrer, S. Araujo, and Y. Barboza. (2008). Effect of Oat's Soluble Fibre (Beta-Glucan) as a Fat Replacer on Physical, Chemical, Microbiological and Sensory Properties of Low-Fat Beef Patties. *Meat Science* 80(3), 675-80.

- Pingel, J., J. Ostwald, H. W. Pau, T. Hummel, and T. Just. (2010). Normative Data for a Solution-Based Taste Test. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 267(12), 1911-17.
- Pionnier, E., C. Chabanet, L. Mioche, J.L. Le Quéré, and C. Salles. (2004a). 1. In Vivo Aroma Release During Eating of a Model Cheese: Relationships with Oral Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 557-64.
- Pionnier, E., S. Nicklaus, C. Chabanet, L. Mioche, A. J. Taylor, J.L. Le Quéré, and C. Salles. (2004b). Flavor Perception of a Model Cheese: Relationships with Oral and Physico-Chemical Parameters. *Food Quality and Preference*, 15(7-8), 843-52.
- Pionnier, E., J.L. Le Quéré, and C. Salles. (2004c). Real Time Release of Flavor Compounds and Flavor Perception. An Application to Cheese. Paper presented at the The 11th International Flavor Conference: Recent advances in food flavor, Samos (Grece).
- Pionnier, E., E. Semon, C. Chabanet, and C. Salles. (2005). Evaluation of the Solid Phase Microextraction (Spme) Technique for the Analysis of Human Breath During Eating. *Sciences Des Aliments*, 25(3), 193-206.
- Pivk, U., N. Godinot, C. Keller, N. Antille, M. A. Juillerat, and P. Raspor. (2008). Lipid Deposition on the Tongue after Oral Processing of Medium-Chain Triglycerides and Impact on the Perception of Mouthfeel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 1058-64.
- Poette, J., J. Mekoue, E. Neyraud, O. Berdeaux, A. Renault, E. Guichard, C. Genot, and G. Feron. (2014). Fat Sensitivity in Humans: Oleic Acid Detection Threshold Is Linked to Saliva Composition and Oral Volume. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(1), 39-49.
- Poinot, P., G. Arvisenet, J. Grua-Priol, C. Fillonneau, and C. Prost. (2009). Use of an Artificial Mouth to Study Bread Aroma. *Food Research International*, 42(5-6), 717-26.
- Preininger, M., and W. Grosch. (1994). Evaluation of Key Odorants of the Neutral Volatiles of Emmentaler Cheese by the Calculation of Odor Activity Values. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 27(3), 237-44.
- Prinz, J. F., R. A. de Wijk, L. A. H. Huntjens, L. Engelen, and I. A. Polet. (2007). Is Fat Perception a Thermal Effect?. *Perceptual and Motor Skills*, 104(2), 381-86.

## R

- Rabe, S., U. Krings, and R. G. Berger. (2003). Dynamic Flavor Release from Sucrose Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5058-66.
- Rayne, S., and K. Forest. (2011). Estimated Carboxylic Acid Ester Hydrolysis Rate Constants for Food and Beverage Aroma Compounds. *Nature precedings* doi:10.1038/npre.2011.6471.1
- Repoux, M., E. Semon, G. Feron, E. Guichard, and H. Laboure. (2012a). Inter-Individual Variability in Aroma Release During Sweet Mint Consumption. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 40-46.

- Repoux, M. (2012b). Rôle Des Caractéristiques De L'aliment (Composition, Texture) Et De L'individu (Flux Salivaire, Mastication...) Sur La Libération Des Composés D'arôme Et Ébauche Du Lien Libération Perception. Thesis
- Roberts, D. D., P. Pollien, and C. Milo. (2000). Solid-Phase Microextraction Method Development for Headspace Analysis of Volatile Flavor Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2430-37.
- Roberts, D. D., P. Pollien, N. Antille, C. Lindinger, and C. Yeretjian. (2003). Comparison of Nosespace, Headspace, and Sensory Intensity Ratings for the Evaluation of Flavor Absorption by Fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3636-42.
- Robinson, D. A., M. S. Bogdanffy, and C. J. Reed. (2002). Histochemical Localisation of Carboxylesterase Activity in Rat and Mouse Oral Cavity Mucosa. *Toxicology*, 180(3), 209-20.
- Rolls, E. T. (2005). Taste, Olfactory, and Food Texture Processing in the Brain, and the Control of Food Intake. *Physiology & Behavior*, 85(1), 45-56.
- Ross, C. F., K. M. Weller, and J. R. Alldredge. (2012). Impact of Serving Temperature on Sensory Properties of Red Wine as Evaluated Using Projective Mapping by a Trained Panel. *Journal of Sensory Studies*, 27(6), 463-70.
- Ruijschop, Rmaj, M. J. M. Burgering, M. A. Jacobs, and A. E. M. Boelrijk. (2009). Retro-Nasal Aroma Release Depends on Both Subject and Product Differences: A Link to Food Intake Regulation?. *Chemical Senses*, 34(5), 395-403.
- Running, C. A., R. D. Mattes, and R. M. Tucker. (2013). Fat Taste in Humans: Sources of within- and between-Subject Variability. *Progress in Lipid Research*, 52(4) 438-45.
- Running, C. A., B. A. Craig, and R. D. Mattes. (2015a). Oleogustus: The Unique Taste of Fat. *Chemical Senses*, 40(7), 507-16.
- Running, C. A., and R. D. Mattes. (2015b). Humans Are More Sensitive to the Taste of Linoleic and Alpha-Linolenic Than Oleic Acid. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(5), G442-G49.

## S

- Saint-Eve, A., E. P. Kora, and N. Martin. (2004). Impact of the Olfactory Quality and Chemical Complexity of the Flavouring Agent on the Texture of Low Fat Stirred Yogurts Assessed by Three Different Sensory Methodologies. *Food Quality and Preference*, 15(7-8), 655-68.
- Saint-Eve, A., A. Juteau, S. Atlan, N. Martin, and I. Souchon. (2006a). Complex Viscosity Induced by Protein Composition Variation Influences the Aroma Release of Flavored Stirred Yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3997-4004.
- Saint-Eve, A., N. Martin, H. Guillemin, E. Sémon, E. Guichard, and I. Souchon. (2006b). Flavored Yogurt Complex Viscosity Influences Real-Time Aroma Release in the Mouth and Sensory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7794-803.

- Saint-Eve, Anne, Isabelle Dél  ris, Elodie Aubin, Etienne S  mon, Gilles Feron, Jean-Marc Rabillier, Dominique Ibarra, Elisabeth Guichard, and Isabelle Souchon. (2009). Influence of Composition (Co<sub>2</sub> and Sugar) on Aroma Release and Perception of Mint-Flavored Carbonated Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(13), 5891-98.
- Savary, G., C. Lafarge, J. L. Doublier, and N. Cayot. (2007). Distribution of Aroma in a Starch-Polysaccharide Composite Gel. *Food Research International*, 40(6), 709-16.
- Schieberle, P., K. Gassenmeier, H. Guth, A. Sen, and W. Grosch. (1993). Character Impact Odor Compounds of Different Kinds of Butter. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 26(4), 347-56.
- Schiffman, S. S., B. G. Graham, E. A. Sattely-Miller, and Z. S. Warwick. (1998). Orosensory Perception of Dietary Fat. *Current Directions in Psychological Science*, 7(5), 137-43.
- Schilling, B.; Gfeller, H.; Koch, H.; Granier, T.; Ding, X.; Locher, E. (2007). Inhibitors of Nasal Enzymes Influence the Perceived Quality of Odorants. *A ChemS XXIX, Sarasota, USA* Poster 350.
- Schilling, B., R. Kaiser, A. Natsch, and M. Gautschi (2010). Investigation of Odors in the Fragrance Industry. *Chemoecology*, 20(2), 135-47.
- Schober, A.L., and D.G. Peterson. (2004). Flavor Release and Perception in Hard Candy: Influence of Flavor Compound-Flavor Solvent Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2628-31.
- Schroder, F., R. Fettkoether, U. Noldt, K. Dettner, W. A. Konig, and W. Francke. (1994) Synthesis of (3r)-3-Hydroxy-2-Hexanone, (2r,3r)-2,3-Hexanediol and (2s,3r)-2,3-Hexanediol, the Male Sex-Pheromone of *Hylotrupes-Bajulus* and *Pyrrhidium-Sanguineum* (Cerambycidae). *Liebigs Annalen Der Chemie*, 12, 1211-18.
- Secouard, S., C. Malhiac, M. Grisel, and B. Decroix. (2003). Release of Limonene from Polysaccharide Matrices: Viscosity and Synergy Effect. *Food Chemistry*, 82(2), 227-34.
- Segovia, Carolina, Ian Hutchinson, David G. Laing, and Anthony L. Jinks. (2002). A Quantitative Study of Fungiform Papillae and Taste Pore Density in Adults and Children. *Brain research. Developmental brain research*, 138(2), 135-46.
- Shahbake, M., I. Hutchinson, D. G. Laing, and A. L. Jinks. (2005). Rapid Quantitative Assessment of Fungiform Papillae Density in the Human Tongue. *Brain Res Mol Brain Res*, 1052(2), 196-201.
- Sherman P., et Boyd J.V. (1975). A Study of Force-Compression Conditions Associated with Hardness Evaluation in Several Foods. *Journal of Texture Studies*, 6, 507-22.
- Shojaei, ZA, RST Linforth, J Hort, T Hollowood, and AJ Taylor. (2006). Measurement and Manipulation of Aroma Delivery Allows Control of Perceived Fruit Flavour in Low- and Regular-Fat Milks. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(10), 1192-96.
- Siefarth, C., O. Tyapkova, J. Beauchamp, U. Schweiggert, A. Buettner, and S. Bader. (2011). Influence of Polyols and Bulking Agents on Flavour Release from Low-Viscosity Solutions. *Food Chemistry*, 129(4), 1462-68.



- Simons, P. J., J. A. Kummer, Jjfp Luiken, and L. Boon. (2011). Apical Cd36 Immunolocalization in Human and Porcine Taste Buds from Circumvallate and Foliate Papillae. *Acta Histochemica*, 113(8), 839-43.
- Sonne, A., M. Busch-Stockfish, J. Weiss, and J. Hinrichs. (2014). Improved Mapping of in-Mouth Creaminess of Semi-Solid Dairy Products by Combining Rheology, Particle Size, and Tribology Data. *Lwt-Food Science and Technology*, 59(1), 342-47.
- Stevenson, R. J., J. Prescott, and R. A. Boakes. (1999). Confusing Tastes and Smells: How Odours Can Influence the Perception of Sweet and Sour Tastes. *Chemical Senses*, 24(6), 627-35.
- Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset, M. Golding, C. Delahunty, P. M. Clifton, and R. S. J. Keast. (2010). Oral Sensitivity to Fatty Acids, Food Consumption and Bmi in Human Subjects. *British Journal of Nutrition*, 104(1), 145-52.
- Stewart, J. E., L. R. Newman, and R. S. J. Keast. (2011). Oral Sensitivity to Oleic Acid Is Associated with Fat Intake and Body Mass Index. *Clinical Nutrition*, 30(6), 838-44.
- Syarifuddin, A. , C. Septier, C. Salles, and T. Thomas-Danguin. (2016). Reducing Salt and Fat While Maintaining Taste: An Approach on a Model Food System. *Food Quality and Preference*, 48, 59-69.
- Szczesniak, A. S. (1998). Sensory Texture Profiling - Historical and Scientific Perspectives. *Food Technology* 52(8), 54-57.
- T**
- Tan, Y., and K. J. Siebert. (2008). Modeling Bovine Serum Albumin Binding of Flavor Compounds (Alcohols, Aldehydes, Esters, and Ketones) as a Function of Molecular Properties. *Journal of Food Science*, 73(1), S56-S63.
- Tarrega, Amparo, Claude Yven, Etienne Semon, and Christian Salles. "Aroma Release and Chewing Activity During Eating Different Model Cheeses. *International Dairy Journal* 16, no. 8 (August 2008 2007): 849-57.
- Taylor, A. J., R. S. T. Linforth, B. A. Harvey, and B. Blake. (2000). Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry for in Vivo Analysis of Volatile Flavour Release. *Food Chemistry*, 71(3), 327-38.
- Taylor, J., Linforth.R. S. T. (2010). On-Line Monitoring of Flavour Processes in Food Flavour Technology. *Wiley-Blackwell, Chichester*, 266-95.
- Tepper, B.J.; Shaffer, S.E.; Shearer, C.M. (1994). Sensory Perception of Fat in Common Foods Using Two Scaling Methods. *Food Quality and Preference*, 245-251.
- Tepper, B. J., and R. J. Nurse. (1997). Fat Perception Is Related to Prop Taster Status. *Physiology & Behavior* 61(6), 949-54.
- Terta, Markela, Georgios Blekas, and Adamantini Paraskevopoulou. (2006). Retention of Selected Aroma Compounds by Polysaccharide Solutions: A Thermodynamic and Kinetic Approach. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 863-71.

- Thebaudin, J. Y., A. C. Lefebvre, M. Harrington, and C. M. Bourgeois. (1997). Dietary Fibres: Nutritional and Technological Interest. *Trends in Food Science & Technology*, 8(2), 41-48.
- Thiebaud, N., S. Veloso Da Silva, I. Jakob, G. Sicard, J. Chevalier, F. Menetrier, O. Berdeaux, *et al.* (2013). Odorant Metabolism Catalyzed by Olfactory Mucosal Enzymes Influences Peripheral Olfactory Responses in Rats. *PLoS One*, 8(3): e59547.
- ThorntonManning, J. R., and A. R. Dahl. (1997). Metabolic Capacity of Nasal Tissue Interspecies Comparisons of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 380(1-2), 43-59.
- Thuret, S., L. D. F. Moon, and F. H. Gage. (2006). Therapeutic Interventions after Spinal Cord Injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 628-43.
- Tournier, C., C. Sulmont-Rosse, E. Semon, S. Issanchou, and E. Guichard. (2009). A Study on Texture - Taste - Aroma Interactions: Physico-Chemical and Cognitive Mechanisms. *International Dairy Journal*, 19(8), 450-58.
- Tournier, C., M. Grass, C. Septier, D. Bertrand, and C. Salles. (2014). The Impact of Mastication, Salivation and Food Bolus Formation on Salt Release During Bread Consumption. *Food & Function*, 5(11), 2969-80.
- Trelea, I. C., S. Atlan, I. Deleris, A. Saint-Eve, M. Marin, and I. Souchon. (2008). Mechanistic Mathematical Model for in Vivo Aroma Release During Eating of Semiliquid Foods. *Chemical Senses* 33(2), 181-92.
- Troutt, E. S., M. C. Hunt, D. E. Johnson, J. R. Claus, C. L. Kastner, and D. H. Kropf. (1992). Characteristics of Low-Fat Ground-Beef Containing Texture-Modifying Ingredients. *Journal of Food Science*, 57(1), 19-24.
- Tucker, R. M., L. Laguna, R. Quinn, and R. D. Mattes. (2013). The Effect of Short, Daily Oral Exposure on Non-Esterified Fatty Acid Sensitivity. *Chemosensory Perception*, 6(2)78-85.
- Tucker, R. M., R. D. Mattes, and C. A. Running. (2014). Mechanisms and Effects of "Fat Taste" in Humans. *Biofactors*, 40(3), 313-26.

## V

- Van Ruth, S. M., and J. P. Roozen. (2000). Influence of Mastication and Saliva on Aroma Release in a Model Mouth System. *Food Chemistry*, 71(3), 339-45.
- Van Ruth, S. M., and C. King. (2003). Effect of Starch and Amylopectin Concentrations on Volatile Flavour Release from Aqueous Model Food Systems. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(5), 407-16.
- Van Ruth, S. M., L. de Witte, and A. R. Uriarte. (2004). Volatile Flavor Analysis and Sensory Evaluation of Custard Desserts Varying in Type and Concentration of Carboxymethyl Cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8105-10.

Ventanas, S., E. Puolanne, and H. Tuorila. (2010). Temporal Changes of Flavour and Texture in Cooked Bologna Type Sausages as Affected by Fat and Salt Content. *Meat Science*, 85(3), 410-19.

Visschers, R. W., M. A. Jacobs, J. Frasnelli, T. Hummel, M. Burgering, and A. E. M. Boelrijk. (2006). Cross-Modality of Texture and Aroma Perception Is Independent of Orthonasal or Retronasal Stimulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5509-15.

## W

Warner, K., and G. E. Inglett. (1997). Flavor and Texture Characteristics of Foods Containing Z-Trim Corn and Oat Fibers as Fat and Flour Replacers. *Cereal Foods World*, 42(10), 821-25.

Weel, K. G. C., A. E. M. Boelrijk, A. C. Alting, P. J. J. M. vanMil, J. J. Burger, H. Gruppen, A. G. J. Voragen, and G. Smit. (2002). Flavor Release and Perception of Flavored Whey Protein Gels: Perception Is Determined by Texture Rather Than by Release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5149-55.

Weenen, H., L. J. Van Gemert, J. M. Van Doorn, G. B. Duksterhuis, and R. A. De Wijk. (2003). Texture and Mouthfeel of Semisolid Foods: Commercial Mayonnaises, Dressings, Custard Desserts and Warm Sauces. *Journal of Texture Studies*, 34(2), 159-79.

Wei, Z., Z. Xu, B. Li, and F. Xu. (2013). Numerical Simulation of Airway Dimension Effects on Airflow Patterns and Odorant Deposition Patterns in the Rat Nasal Cavity. *PLoS One*, 8(10), e77570.

Wilson, C.E., and W.E. Brown. (1997). Influence of Food Matrix Structure and Oral Breakdown During Mastication on Temporal Perception of Flavor. *Journal of Sensory Studies*, 12(1), 69-86.

Woda, A., K. Foster, A. Mishellany, and M. A. Peyron. (2006). Adaptation of Healthy Mastication to Factors Pertaining to the Individual or to the Food. *Physiology & Behavior*, 89(1), 28-35.

## Y

Yackinous, C., and J.-X. Guinard. (2000). Flavor Manipulation Can Enhance the Impression of Fat in Some Foods. *Journal of Food Science*, 65(5), 909-14.

Yu, L.L., H. Lutterodt, and Z. Cheng. (2009). Beneficial Health Properties of Psyllium and Approaches to Improve Its Functionalities. *Advances in food and nutrition research*, 55,193-220.

Yven, C., E. Guichard, A. Giboreau, and D. D. Roberts. (1998). Assessment of Interactions between Hydrocolloids and Flavor Compounds by Sensory, Headspace, and Binding Methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1510-14.

## Z

Zaccone, E. J., W. T. Goldsmith, M. J. Shimko, J. R. Wells, D. Schwegler-Berry, P. A. Willard, S. L. Case, J. A. Thompson, and J. S. Fedan. (2015). Diacetyl and 2,3-Pentanedione Exposure of Human Cultured Airway Epithelial Cells: Ion Transport Effects and Metabolism of Butter Flavoring Agents. *Toxicol Appl Pharmacol*, 289(3), 542-49.

- Zafeiropoulou, T., V. Evageliou, C. Gardeli, S. Yanniotis, and M. Komaitis. (2012). Retention of Selected Aroma Compounds by Gelatine Matrices. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 105-09.
- Zahn, S.;Hoppert, K.; Ullrich, F.; Rohm, H. (2013). Dairy-Based Emulsions: Viscosity Affects Fat Difference Thresholds and Sweetness Perception. *Foods*, (2), 521-33.
- Zhao, K., P. W. Scherer, S. A. Hajiloo, and P. Dalton. (2004). Effect of Anatomy on Human Nasal Air Flow and Odorant Transport Patterns: Implications for Olfaction. *Chem Senses*, 29(5) 365-79.
- Zhao, K., P. Dalton, G. C. Yang, and P. W. Scherer. (2006). Numerical Modeling of Turbulent and Laminar Airflow and Odorant Transport During Sniffing in the Human and Rat Nose. *Chem Senses*, 31(2), 107-18.

## **Résumé**

Pour réduire la teneur en matière grasse des aliments, et suivre en cela les recommandations du Plan National Nutrition Santé, il est nécessaire de bien comprendre les mécanismes de la perception du gras. Dans ce contexte, ce travail de thèse avait pour objectif de contribuer à la compréhension de la perception du gras au travers de l'étude de la variabilité interindividuelle de la perception du gras et de la recherche de son origine.

Pour cela, une approche pluridisciplinaire mêlant physico-chimie de molécules aromatiques à connotation grasse, physiologie orale des sujets, processus en bouche et perception sensorielle au cours de la consommation a été mise en place. Une attention toute particulière a été portée sur la composante olfactive de la perception du gras et en particulier sur la potentielle contribution des métabolites produits dans la cavité nasale de l'Homme à partir de composés volatils odorants.

Ce travail montre que la réduction du taux de matière grasse dans un fromage blanc diminue la perception de l'arôme crème, augmente l'amertume et l'astringence et diminue le film gras perçu, confirmant ainsi le caractère multidimensionnel de la perception du gras. Il montre également que la perception du gras est liée à la teneur en lipide du tapissage en bouche ainsi qu'à la composition de la matrice en composés d'arômes.

Il met en évidence trois groupes de sujets de sensibilité au gras significativement différents. Ces groupes présentent également des différences pour plusieurs paramètres physiologiques et anatomiques pouvant intervenir sur les sensations tactiles, gustatives et olfactives et donc potentiellement sur la perception du gras.

Enfin, ce travail prouve l'existence, dans la muqueuse olfactive de l'Homme, d'enzymes capables de métaboliser les composés odorants en métabolites volatils eux-mêmes odorants susceptibles d'intervenir dans la perception du gras ou de la moduler.

## **Abstract**

To reduce the fat content in food products as recommended by the National Nutrition and Health Plan, it is necessary to understand the fat perception mechanisms. In this context, this thesis work aimed to contribute to the understanding of fat perception through the study of interindividual variability in fat perception and the research of its origin.

For this purpose, a multidisciplinary approach combining physico-chemistry of "fatty" aroma molecules, subjects' oral physiology, food oral processing and sensory perception during food consumption has been established. A particular focus has been done on the olfactory component of fat perception, especially on the potential contribution of the metabolites produced in the human nasal cavity from odorous volatile compounds.

This work shows that reducing fat content in cottage cheese decreases the perception of the cream aroma, increases bitterness and astringency and decreases the perceived greasy film. The results confirmed the multidimensional nature of fat perception. This work also shows that fat perception is related to the lipid content of the mouth coating as well as the aroma compounds composition of the food matrix.

It highlights three groups of subjects with significant difference in fat sensitivity. These groups also differ in several physiological and anatomical parameters which can impact tactile, taste and smell sensations and therefore potentially fat perception.

Finally, this work proves the existence in the human olfactory mucosa of enzymes capable of metabolizing odorous compounds in volatile metabolites. These metabolites proved to be themselves odorants could be involved in fat perception or its modulation.