



Caractérisation des voies métaboliques et des marqueurs précoces de l'altération microbiologique des ovoproduits au cours de leurs procédés de fabrication

Rémy Coat

► To cite this version:

Rémy Coat. Caractérisation des voies métaboliques et des marqueurs précoces de l'altération microbiologique des ovoproduits au cours de leurs procédés de fabrication. Génie des procédés. Université de Nantes, 2018. Français. <NNT : 2018NANT4038>. <tel-05575582>

HAL Id: tel-05575582

<https://theses.hal.science/tel-05575582v1>

Submitted on 1 Apr 2026

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 602
Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : « Génie des procédés »

Par

« Rémy COAT »

**« Caractérisation des voies métaboliques et des marqueurs
précoces de l'altération microbiologique des ovoproduits »**

Thèse présentée et soutenue à « Saint-Nazaire », le « 10 Juillet 2018 »

Unité de recherche : GEPEA, Génie des procédés – Environnement – Agroalimentaire – UMRCNRS 6144

Rapporteurs avant soutenance :

Françoise Nau, Professeur, Agrocampus Ouest, Université Rennes
Jean-Hugues Renault, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne

Composition du Jury :

Président :	Jean-Hugues Renault, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne
Examineurs :	Françoise Nau, Professeur, INRA - Agrocampus Ouest Sophie Jan, Maître de conférences HDR, INRA - Agrocampus Ouest
Dir. de thèse :	Abdellah Arhaliass Professeur. Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	Olivier Gonçalves, Maître de conférences, Université de Nantes

Invité(s)

Jack Legrand, Professeur. Université de Nantes
Henry Freulon
Olivier Galet

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants de thèse, mon directeur Abdellah Arhaliass pour son soutien au cours de ces travaux, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont aidés à tenir le cap pendant ces trois ans ; ainsi que mon co-directeur Olivier Gonçalves pour sa présence au quotidien, les enseignements qu'il m'a transmis, les bon moments partagés et son soutien pendant les périodes difficiles.

Je tiens à remercier mon laboratoire d'accueil, le GEPEA de Saint-Nazaire, son directeur de l'époque Jack Legrand et actuel Jérémy Pruvost pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de doctorat au sein de leur unité. Tous mes collègues chercheurs, ingénieurs, doctorants, stagiaires et du personnel technique qui m'ont accompagnés au cours de ces trois ans. Et plus particulièrement l'équipe de chimie analytique avec qui j'ai travaillé plus directement, notamment Delphine Drouin, Laurence Lavenant, Laurène Perrochaud et Myriam Phélippe.

Je remercie également les régions Bretagne et Pays de la Loire ainsi que l'ADRO Ouest sans qui ce projet de recherche n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie les collègues des départements de l'IUT de Saint-Nazaire et de Polytech Nantes avec qui j'ai eu l'occasion de partager du temps lors de mes enseignements de travaux pratiques et ma participation au conseil scientifique de l'IUT.

Je remercie mes amis pour m'avoir soutenu au cours de mon parcours, plus particulièrement Simon Martin pour les soirées passées à discuter du traitement de mes données et les scripts développés à façon pour m'aider dans cette tâche.

Je remercie enfin ma famille, ma mère Dominique et son mari Alain, mon père Pascal et sa compagne Patricia, mes grands parents Denise, François, Geneviève et Yves pour m'avoir soutenu tout au long de mes études, mon frère Gaël pour ses conseils dans les moments de doute, et ma compagne Maëva pour m'avoir supporté dans les bons et les mauvais moments de ces années de travail. Je n'aurais pas pu réussir cela sans vous.

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	4
Liste des figures :	11
Liste des tableaux.....	24
Table des abréviations.....	31
Introduction Générale	34
Chapitre I – Bibliographie.....	36
1 Structure et composition de l’œuf.....	36
1.1 Structure interne de l’œuf.....	36
1.2 Composition de l’œuf.....	37
1.2.1 Blanc d’œuf	37
1.2.2 Jaune d’œuf	39
1.2.3 Coquille et membranes coquillères.....	41
2 Les ovoproduits.....	42
2.1 Production des ovoproduits	42
2.2 Utilisation des ovoproduits	43
2.3 Marché des œufs et des ovoproduits	45
3 Analyse de l’altération de l’Entier Liquide	47
3.1 Etude de l’altération des ovoproduits – approche physico-chimique	48
3.1.1 Altération physico-chimique	48
3.1.2 Altération biologique.....	52
3.2 Etude de l’altération des ovoproduits – approche microbiologique	57
3.2.1 Groupe <i>Bacillus cereus</i>	58
3.2.2 Genres <i>Streptococcus</i> et <i>Enterococcus</i>	63
3.2.3 Rôle du Quorum Sensing dans les phénomènes d’altération.....	66
3.3 Analyses réglementaires de l’Entier Liquide	67
3.3.1 Critères physico-chimiques	68
3.3.2 Critères microbiologiques.....	70

3.3.3 Limitations des analyses actuelles et importance de trouver des approches complémentaires.....	71
3.4 Marqueurs d'altération identifiés	73
3.4.1 Approche physico-chimique.....	73
3.4.2 Approche microbiologique	74
3.4.3 Vers l'identification et la quantification des marqueurs d'altération.....	75
4 Approche métabolomique.....	75
4.1 Prétraitements des échantillons	79
4.1.1 Déprotéination des échantillons.....	80
4.1.2 Séparation / Extraction dans un mélange ternaire de solvants organiques	81
4.2 Principales techniques analytiques employées en métabolomique	82
4.2.1 La spectroscopie vibrationnelle	82
4.2.2 La spectrométrie de masse.....	96
4.2.3 La résonance magnétique nucléaire.....	102
5 Analyse critique des marqueurs d'altération identifiés et sélection des techniques à employer	106
6 Conclusion du chapitre et rappel des objectifs.....	111
Chapitre 2 – Matériels et méthodes.....	112
1 Produits chimiques et réactifs	112
2 Origine des échantillons d'EL	112
2.1 Echantillons industriels	112
2.2 Echantillons préparés en laboratoire	112
2.2.1 Préparation d'EL au laboratoire	112
2.2.2 Contrôle de stérilité des EL	113
3 Cultures microbiologiques.....	113
3.1 Origine des souches bactériennes.....	113
3.2 Conservation des souches bactériennes.....	114
3.3 Milieux de culture	114
3.4 Précultures.....	114
3.5 Ensemencement	114
3.6 Contrôle des paramètres de culture	115
3.6.1 Contrôle de la stérilité des souches.....	115

3.6.2	Croissance des souches.....	115
4	Méthodes de préparation des échantillons	116
4.1	Prétraitements.....	116
4.1.1	Déprotéination des échantillons.....	116
4.1.2	Séparation en fractions métaboliques	118
4.1.3	Séchage des échantillons	119
4.2	Conservation des échantillons	124
5	Techniques d'analyses employées	124
5.1	Approche macroscopique.....	124
5.1.1	Mesure du pH	124
5.1.2	Colorimétrie CIE L*a*b*	124
5.1.3	Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	125
5.2	Analyses métabolomiques.....	126
5.2.1	GC-MS	126
5.2.2	RMN ¹ H.....	130
6	Analyses statistiques des données.....	131
6.1	Statistiques descriptives	132
6.1.1	Mesure du coefficient de variation	132
6.1.2	Mesure du Fold Change.....	133
6.1.3	Calcul de l'Ecart Interquartile (EI).....	133
6.2	Statistiques univariées	133
6.2.1	Explication d'une variable quantitative en fonction d'une variable qualitative 133	
6.2.2	Détermination des matrices de corrélation	134
6.3	Statistiques multivariées.....	135
Chapitre 3 – Mise en place des outils de caractérisation physico-chimique de l'altération des entiers liquides.....		136
1	Mise en place des approches de phénotypage et de chémotypage des entiers liquides.....	136
1.1	Introduction.....	136
1.2	Objectifs	137
1.3	Approches phénotypiques proposées par les partenaires du projet ALTOVOP.....	137

2	Adaptation des protocoles de caractérisation des propriétés physico-chimiques (macroscopiques) des œufs : vers le phénotypage de l'altération des EL	139
2.1	Introduction	139
2.2	Préparation des EL	140
2.3	pHmétrie	140
2.4	Colorimétrie en référentiel CIE lab	141
3	Développement des approches de chénotypage des EL : vers des études par métabolomique ciblée et non-ciblée de l'altération des EL	143
3.1	Introduction	143
3.2	Profilage biochimique des EL par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)	144
3.2.1	Choix du mode d'échantillonnage des EL	144
3.2.2	Variabilité associée à la matrice EL et à la mesure IRTF	145
3.2.3	Impact de la congélation sur la variabilité des mesures IRTF	148
3.3	Profilage métabolique et prise d'empreinte métabolique des EL par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	151
3.3.1	Introduction	151
3.3.2	Optimisation de l'analyse des composés ciblés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	154
3.3.3	Echantillonnage des EL pour le profilage de ses métabolites	160
3.3.4	Evaporation des extraits métaboliques obtenus après déprotéination et séparation en fractions métaboliques	164
3.3.5	Protocole complet de prise d'empreintes métaboliques optimisé pour la matrice EL	167
3.4	Traitement des données de prise d'empreinte et de profilage métabolique par GC-MS ..	169
3.4.1	Les données des empreintes métaboliques sont filtrées avant interprétation .	170
3.4.2	Les données des empreintes métaboliques sont ensuite normalisées après l'étape de filtration	174
3.4.3	Protocole complet de traitement des données brutes extraites des empreintes métaboliques	176
3.5	Effet de la « variabilité interne » de la matrice EL et du mode de conservation (congélation à -20°C) sur les prises d'empreinte métabolique	178

3.5.1	Préparation des échantillons d'EL pour l'étude de la variabilité interne de la matrice et de l'impact du protocole de congélation.....	178
3.5.2	Analyse de la variabilité interne des échantillons d'EL et choix des seuils de significativité des biomarqueurs de l'altération.....	179
3.5.3	Analyse de l'Impact de la congélation sur la variabilité des échantillons d'EL et choix des seuils de significativité des biomarqueurs de l'altération	180
3.5.4	Conclusion – analyse de la variabilité interne et de l'impact de la congélation sur la prise d'empreinte métabolique	181
3.6	Analyse de la complémentarité des fractions métaboliques	183
3.6.1	Complémentarité des fractions métaboliques obtenues pour des échantillons frais	183
3.6.2	Complémentarité des fractions métaboliques obtenues pour les échantillons après 7 jours de congélation à -20 °C.....	187
3.6.3	Impact de la congélation sur les composés détectés dans chacune des fractions métaboliques	192
4	Conclusion du chapitre	196
Chapitre 4 – Investigation des mécanismes physico-chimiques impliqués dans l'altération microbiologique des EL		198
1	Introduction.....	198
2	Analyse des échantillons industriels	199
2.1	Protocole d'étude des échantillons industriels	199
2.2	Phénotype physico-chimique des EL industriels.....	200
2.2.1	Résultats des analyses réalisées par le consortium ALTOVOP	200
2.2.2	Conclusion.....	204
2.3	Métabotypage des EL industriels	205
2.3.1	Prise d'empreinte métabolique par GC-MS	205
2.3.2	Profilage métabolique par GC-MS	213
2.4	Prise d'empreinte métabolique par HR-RMN.....	213
2.4.1	Visualisation des résultats	213
2.5	Analyse croisée des résultats de prise d'empreinte par GC-MS et RMN.....	217
2.6	Interprétation des résultats	218
2.7	Conclusion	221

3	Etude cinétique de l'altération de type 2 avec la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	221
3.1	Protocole développé pour l'étude cinétique de l'altération des EL	221
3.2	Phénotype physico-chimique	222
3.2.1	Inter-calibration des partenaires	222
3.2.1	Résultats des analyses complémentaires réalisées par les partenaires du consortium ALTOVOP	224
3.3	Phénotype chimique	230
3.4	Métabotype.....	230
3.4.1	Prise d'empreinte métabolique	230
3.5	Marqueurs d'altération potentiels identifiés	239
3.5.1	Sélection des marqueurs d'altération.....	239
3.6	Conclusion	241
4	Etude cinétique de l'altération de type 1 avec la souche <i>Enterococcus faecium</i>	243
4.1	Protocole développé pour l'étude cinétique de l'altération des EL	243
4.2	Phénotype physico-chimique	243
4.2.1	Inter-calibration des partenaires	243
4.2.2	Résultats des analyses complémentaires réalisées par les partenaires du consortium ALTOVOP	246
4.3	Phénotype chimique	250
4.4	Métabotype.....	250
4.4.1	Prise d'empreinte métabolique et profilage métabolique par GC-MS	250
4.4.2	Prise d'empreinte métabolique par RMN-HR	264
4.4.3	Résultats croisés des analyses.....	266
4.5	Conclusion sur les marqueurs d'altération	271
5	Discussion des marqueurs identifiés	274
5.1	Marqueurs d'altération identifiés	274
5.2	Origine et mécanismes potentiels.....	277
5.2.1	Etude cinétique de l'altération de type 2 avec la souche modèle <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	277
5.2.2	Etude cinétique de l'altération de type 1 avec la souche modèle <i>Enterococcus faecium</i>	285

5.3 Conclusion du chapitre - perspectives.....	292
Conclusion générale.....	295
Bibliographie.....	297
Annexes	314

Liste des figures :

Figure 1 : Structure interne de l'œuf (Sauveur 1988)	37
Figure 2 : Schéma de séparation et composition des fractions plasma et granules du jaune d'œuf (Guérin-Dubiard <i>et al.</i> 2010)	40
Figure 3. Représentation schématique du procédé de production des ovoproduits.....	44
Figure 4. Acide pyroglutamique.....	49
Figure 5. Etapes initiales de la réaction de Maillard avec la formation de furosine et de Nε-carboxymethyllysine (Erbersdobler et Somoza 2007)	51
Figure 6. 13-Cis-rétinol, All-trans-rétinol, α-tocophérol, δ-tocophérol.....	52
Figure 7. Cholestérol, 7-Cétocholestérol et 7-Alpha,25-dihydroxycholestérol.....	53
Figure 8. Uridine et Uracile.....	54
Figure 9. Acide acétique et acide lactique.....	54
Figure 10. Acide succinique	55
Figure 11. Acide gras Iso-c15:0	56
Figure 12. Autoinducer-2 et N-acyl-Homosérine Lactone	56
Figure 13. Glucose.....	57
Figure 14. Acide 3-Hydroxybutyrique	57
Figure 15. Schéma du catabolisme du glucose chez <i>B.cereus</i> (PFL : pyruvate formate lyase, LDH : lactate déshydrogénase, MDH : malate déshydrogénase, SDH : succinate déshydrogénase, PTA : phosphotransacétylase, ACK : acétate kinase (figure inspirée de la figure originale Zigha <i>et al.</i> 2006a).....	60
Figure 16. Techniques de métabolomique : technologies utilisées en fonction des approches et des échantillons (Inspiré par les travaux de Dunn et Ellis 2005).	80
Figure 17. Schéma d'un interféromètre comme utilisé en IRTF (Figure originale dans Blum et John 2012).....	86
Figure 18. Spectre IRTF enregistré sur un entier liquide stérile dilué au 1/10ème séché dans un dessiccateur sous vide (dépôt de 5µl). Les principales bandes de vibration d'intérêt sont assignées sur le spectre. Seule la région la plus informative est représentée. Les bandes Amide I et II (≈ 1600 - 1690 cm^{-1} et ≈ 1480 - 1575 cm^{-1}) correspondent au signal des protéines, les bandes situées entre 2800 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} et près de 1740 cm^{-1} correspondent aux signaux lipidiques (lipoprotéines et triacylglycérols), les bandes situées entre 1000 et 1200 cm^{-1} correspondent aux signaux glucidiques (glucose libre, osamines).....	88
Figure 19. Schéma des modes transmission, « transflexion » et réflexion diffuse (inspirée de la figure originale de Hansen, Pedersen-Bjergaard, et Rasmussen (2011)).	90

Figure 20. Diagramme de Jablonski des processus de diffusion de Rayleigh, Raman Stokes et Raman anti Stokes, E = niveau énergétique, V = niveau vibrationnel (Coat <i>et al.</i> 2018).....	94
Figure 21. Schéma de principe d'un spectromètre Raman confocal (Coat <i>et al.</i> 2018).....	95
Figure 22. Schéma de principe général d'un spectromètre de masse, des exemples de technologies courantes sont données pour les différents éléments.....	98
Figure 23. Mécanismes des réactions de dérivation, (A) silylation et formation de dérivés triméthylsilyl (TMS) sur un alcool avec $-X-O-C(CF_3)=N-Si(CH_3)_3$ pour le BSTFA, $X=-(CH_3)_N-CO-CF_3$ pour le MSTFA (Orata 2012), b) oximation de l'acétaldéhyde par l'hydroxylamine (Rosenberg <i>et al.</i> 1974) c) alkylation avec le méthyl chloroformate sur une amine primaire et un acide carboxylique avec formation d'un carbamate et d'un ester (Smart <i>et al.</i> 2010).	100
Figure 24. MSTFA, BSTFA et MTBSTFA.....	101
Figure 25. Catalyseurs TMIS et TMCS.....	101
Figure 26. Illustration du principe de la RMN. a) Orientation des moments magnétiques de spin ; b) niveaux d'énergies des états α et β ; c) Egalisation des populations des états α et β sous l'influence du champ magnétique B1 et retour à l'état d'équilibre induisant l'émission du FID (en vert) (Coat <i>et al.</i> 2018).....	105
Figure 27. Illustration du principe de la RMN a) Représentation d'un spectre (ici l'éthanol) après réalisation d'une transformée de Fourier sur le FID ; b) Exemple de spectromètre RMN à haut champ à 16,4 Teslas (au laboratoire Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation, à l'Université de Nantes)(Coat <i>et al.</i> 2018).....	106
Figure 28. Evaporateur sous flux d'azote.....	121
Figure 29. Evaporateur de type SpeedVac	122
Figure 30. Distribution des valeurs de pH mesurées sur des échantillons d'EL frais et congelés (n=6).....	141
Figure 31. Distribution des valeurs de colorimétrie par composante mesurées sur des échantillons d'EL frais (haut) et décongelés après 7 jours (bas). (n=5)	143
Figure 32. Platine de lecture ATR-platinum (à gauche) et microplaque 384 puits en silicium utilisée pour les lectures en transmission (à droite).....	146
Figure 33. Exemple de spectres bruts enregistrés pour 10 dépôts d'un échantillon d'EL. Une correction de ligne de base a été appliquée sous le logiciel OPUS 7 (Bruker, France). Seule la zone d'intérêt représentative de la composition biochimique est représentée ($800 - 1800\text{ cm}^{-1}$).....	146
Figure 34. Exemple de spectres enregistrés sur 10 dépôts d'un échantillon d'EL. Une correction de ligne de base a été appliquée et les signaux normalisés sur l'intensité du vibreur présent à 1740 cm^{-1}	147
Figure 35. Distribution des coefficients de corrélations de Pearson pour lesquels les échantillons ont été analysés par paires (gauche) et des coefficients de variation (droite) sur l'ensemble	

des données spectrales (groupe J1) et sur la zone d'intérêt des signatures biochimiques situées entre 800 et 1800 cm^{-1} (groupe J1 800-1800). 148

Figure 36. Profils IRTF d'échantillons d'EL frais (bleu) et congelés (noir) réalisés sur 5 répliques et déposés sur microplaque 384. Seule la zone de la signature biochimique est représentée (800-1800 cm^{-1}). 149

Figure 37. Distribution des coefficients de corrélation de Spearman (gauche) et des coefficients de variation (CV %) calculés sur les données spectrales d'IRTf. Les échantillons ont été analysés par paires, uniquement les échantillons frais pour le premier groupe (Frais), les échantillons congelés pour le deuxième groupe (Congelé) puis un mélange des deux lots pour le troisième groupe (Frais et congelé). 150

Figure 38. Distributions des coefficients de variation calculés sur les données spectrales de la signature biochimique (800-1800 cm^{-1}). Les données sont présentées par groupes, uniquement les échantillons frais pour le premier groupe (Frais), les échantillons congelés pour le deuxième groupe (Congelé) puis un mélange des deux lots pour le troisième groupe (Frais et congelés). 151

Figure 39. Courant ionique total obtenu pour un mélange de 32 standards. Les classes de composés analysées pour cet exemple sont les monosaccharides, les acides aminés et les acides organiques. 156

Figure 40. Exemples de courbes de calibration pour les glucose, fucose, acide lactique, acide hydroxybutyrique, acide pyroglutamique, alanine, valine et sérine après dérivation au MSTFA et analyse en mode Full Scan. La réponse (trait noir) suit une courbe sigmoïdale d'équation $y=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$. Lorsque les tracés des courbes sigmoïdales théoriques ne sont pas confondus avec les intervalles de confiance et de prédiction à 95% ceux-ci sont respectivement représentés en bleu et en rouge. 159

Figure 41. Distribution des intensités normalisées correspondant au signal du ribitol/squalane en fonction de la méthode de séchage employée, calculée sur 6 répliques 166

Figure 42. Schéma du protocole de prise d'empreintes métaboliques par GC-MS présentant les étapes ayant fait l'objet d'une démarche d'optimisation (blocs noirs) et les paramètres optimisés sélectionnés à l'issue de cette démarche (blocs bleus). 168

Figure 43. Exemple de TIC présentés en miroir pour les fractions polaires d'échantillons d'EL industriels sains en positif et altérés en négatif. 170

Figure 44. Distribution des coefficients de corrélation de Spearman calculés sur les données spectrales (obtenues via l'outil MetaMSrun.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions acétone apolaire obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les échantillons ont été analysés par paire, sans étapes préalables de filtration pour le premier groupe (MCF 0.1) et après une étape de filtration des données selon le paramètre MCF 0.5 pour le second groupe (MCF 0.5). 172

Figure 45. Coefficients de variations calculés par pseudo-composé pour les données spectrales (obtenues via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions acétone apolaires

obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées sans étape préalable de filtration (A) et après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 (B). 173

Figure 46. Distribution des coefficients de variations calculées sur les données spectrales (obtenues via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions acétone apolaire obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées sans étapes préalables de filtration pour le premier groupe (MCF 0.1) et après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 pour le deuxième groupe (MCF 0.5). 174

Figure 47. Coefficients de variations calculés par pseudo-composé pour les données spectrales (obtenues via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire acétone obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 sans normalisation (A) et après normalisation sur l'intensité du standard interne (B). 175

Figure 48. Distribution des coefficients de variations calculés pour les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire acétone obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 sans normalisation (Non normalisé) et après normalisation sur l'intensité du standard interne (Normalisé). 176

Figure 49. Schéma récapitulatif du traitement des données spectrales après analyse par GC-MS 178

Figure 50. Diagrammes de Venn présentant la complémentarité des fractions étudiées en termes de composés détectés pour les échantillons frais. Entre les deux fractions polaires (A), entre les deux fractions apolaires (B), entre l'ensemble des fractions polaire et l'ensemble des fractions apolaires (C), et entre les fractions déprotéinées à l'éthanol et l'ensemble des fractions déprotéinées à l'acétone (D). 186

Figure 51. Diagramme de Venn à quatre groupes présentant la variabilité des fractions polaire éthanol (Pol Eth), polaire acétone (Pol Ace), apolaire éthanol (Apo Eth) et apolaire acétone (Apo Ace). Les valeurs correspondantes à des composés uniquement présents dans une fraction sont entourées de pointillés orange. 187

Figure 52. Diagrammes de Venn présentant la complémentarité des fractions étudiées en termes de composés détectés pour les échantillons congelés. Entre les deux fractions polaires (A), entre les deux fractions apolaires (B), entre l'ensemble des fractions polaire et l'ensemble des fractions apolaires (C), et entre les fractions déprotéinées à l'éthanol et l'ensemble des fractions déprotéinées à l'acétone (D). 190

Figure 53. Diagramme de Venn à quatre groupes présentant la variabilité des fractions polaire éthanol (Pol Eth), polaire acétone (Pol Ace), apolaire éthanol (Apo Eth) et apolaire acétone (Apo Ace). Les valeurs correspondant à des composés uniquement présents dans une fraction sont entourées de pointillés orange. 192

Figure 54. Diagrammes de Venn présentant la différence entre les échantillons frais et congelés en termes de composés détectés pour chacune des fractions explorées, polaire éthanol (A) polaire acétone (B), apolaire éthanol (C), apolaire acétone (D) et pour l'ensemble des fractions (E).	194
Figure 55. Mesures de pH effectuées sur les échantillons industriels contrastés (témoin, type 1 et type 2). Les mesures ont été effectuées sur deux répliques prélevés séparément dans le pot d'origine après homogénéisation.	202
Figure 56. Résultats des analyses de la capacité gélifiante pour les échantillons type 1, témoin et type 2.	203
Figure 57. Résultats des analyses de la capacité émulsifiante pour les échantillons témoin, type 1 et type 2.	204
Figure 58. Résultats des analyses des propriétés moussantes pour les échantillons témoin, type 1 et type 2.	205
Figure 59. Représentation des analyses ACP et PLS-DA pour les métabotypes des fractions polaire éthanol et apolaire acétone dans le cadre de l'étude des échantillons industriels.	207
Figure 60 Dendrogrammes des fractions polaire éthanol et apolaire acétone	208
Figure 61. Carte de chaleur (HM pour Heat Map) des fractions polaire éthanol et apolaire acétone.	209
Figure 62. Résultats d'ACP réalisées sur les données de profilage en RMN ^1H sur les échantillons industriels sain, altéré type 1 et altéré type 2.	215
Figure 63. Carte de chaleur des données de profilage mesurées en RMN ^1H pour la fraction polaire éthanol	216
Figure 64. Schéma récapitulatif des analyses réalisées sur les échantillons industriels et des mécanismes proposés pour les altérations de type 1 et 2	221
Figure 65. Valeurs de pH (normalisées) enregistrées pour les différents temps d'analyse au cours de l'altération à 8°C par la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> par chacun des partenaires.	224
Figure 66. Résultats de croissance de la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> inoculée à $3 \log \text{UFC.ml}^{-1}$ dans l'EL à 8°C	226
Figure 67. Résultats de caractérisation des activités enzymatiques de la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> inoculée à $3 \log \text{UFC.ml}^{-1}$ en milieu inducteur.	227
Figure 68. Résultats de caractérisation des propriétés de gélification de l'EL au cours de l'altération par la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> inoculée à $3 \log \text{UFC.ml}^{-1}$ à 8°C .	228
Figure 69. Résultats de caractérisation des capacités émulsifiantes de l'EL au cours de l'altération par la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> inoculée à $3 \log \text{UFC.ml}^{-1}$ à 8°C .	229
Figure 70. Résultats de caractérisation des propriétés moussantes de l'EL au cours de l'altération par la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> inoculée à $3 \log \text{UFC.ml}^{-1}$ à 8°C .	230
Figure 71. Résultats de suivi du pH au cours de la cinétique d'altération avec la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> pour la plage d'analyse sélectionnée. Les points correspondant au début	

de la cinétique (24h et 48h) sont entourés en rouge, ceux correspondant au milieu de la cinétique (120h et 144h) en vert et ceux correspondant à la fin de la cinétique (216h et 240h) en bleu.	233
Figure 72. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération (ED : Echantillons Début, EM : Echantillon Milieu, EF : Echantillon Fin, TD : Témoin Début, TM : Témoin Milieu, TF : Témoin Fin).	235
Figure 73. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération.....	236
Figure 74. Carte de chaleur obtenue sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés.	237
Figure 75. Schéma représentant les FC calculés pour l'identification des signaux d'intérêt .	238
Figure 76. Schéma récapitulatif des mécanismes d'altération potentiels mis en évidence pour l'altération de type 2 avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i>	243
Figure 77. Valeurs de pH (centrées) enregistrées par chacun des partenaires pour les différents temps d'analyse au cours de l'altération à 8°C par la souche <i>E. faecium</i>	245
Figure 78. Résultats des dénombrements effectués par les différents partenaires au cours de la croissance de la souche <i>E. faecium</i> inoculée à 3 log UFC.mL-1 dans l'EL à 8°C à chaque temps d'analyse.....	247
Figure 79. Résultats des analyses des propriétés de gélification au cours de l'altération par la souche <i>E. faecium</i>	248
Figure 80. Résultats des analyses de la capacité émulsifiante des EL à chaque temps d'analyse pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	249
Figure 81. Résultats des analyses des propriétés moussantes et de stabilité moussante (temps de demi-vie) des EL à chaque temps d'analyse pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	250
Figure 82. Résultats de suivi du pH au cours de la cinétique d'altération pour la plage d'analyse sélectionnée. Les points correspondant au début de plage d'étude (24h et 48h) sont entourés en rouge, ceux correspondant au milieu de la plage (72h et 96h) en vert et ceux correspondant à la fin de la plage (120h et 144h) en bleu.	253
Figure 83. Schéma représentant les FC calculés pour l'identification des signaux d'intérêt .	254

Figure 84. Résultats des ACP réalisées sur les données de prise d’empreinte par GC-MS correspondant aux témoins seuls et aux échantillons seuls aux temps d’analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l’étude de l’altération avec la souche <i>E. faecium</i> .	259
Figure 85. Résultats de PLS-DA pour les données de prise d’empreinte par GC-MS des échantillons seuls de la fraction polaire éthanol au temps d’analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l’étude de l’altération avec la souche <i>E. faecium</i> .	260
Figure 86. Résultats de classification hiérarchique ascendante pour les données de prise d’empreinte par GC-MS des échantillons seuls de la fraction polaire éthanol au temps d’analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l’étude de l’altération avec la souche <i>E. faecium</i> .	260
Figure 87. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l’analyse des échantillons seuls au temps d’analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l’étude de l’altération avec la souche <i>E. faecium</i> . L’ordre des échantillons n’est pas réorganisé.	261
Figure 88. Schéma récapitulatif des mécanismes d’altération potentiels mis en évidence pour l’altération de type 1 avec la souche <i>E. faecium</i> .	273
Figure 89. Métabolisme fermentatif de <i>B. cereus</i> (De Sarrau <i>et al.</i> 2012).	279
Figure 90. Carte du métabolisme de l’acide aspartique pour la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4.	283
Figure 91. Schéma récapitulatif des mécanismes identifiés comme potentiellement impliqués dans l’altération de type 2 par la souche <i>B. weihenstephanensis</i> .	285
Figure 92. Schéma récapitulatif du métabolisme du pyruvate présentant les potentiels substrats pour sa synthèse (entourés d’un cercle) (Ramsey, Hartke, et Huycke 2014).	287
Figure 93. Schéma récapitulatif des mécanismes identifiés comme potentiellement impliqués dans l’altération de type 1 par la souche <i>E. faecium</i> .	292
Figure 94. Mécanismes proposés comme impliqués dans les altérations de type 1 et 2 et tendance d’évolution des marqueurs.	293
Figure 95. Schéma récapitulatif des différences de profils physico-chimiques et métaboliques enregistrées au cours des altérations de type 1 et 2 avec les souches <i>B. weihenstephanensis</i> et <i>E. faecium</i> .	294
Figure 96. Matière sèche obtenue après déprotéination des échantillons d’EL en fonction du taux de solvant pour un temps de contact de 30 min.	326
Figure 97. Matière sèche obtenue après déprotéination en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et du temps de contact.	327
Figure 98. Spectres IRTF enregistrés sur les surnageants de déprotéination d’échantillons d’EL en fonction du taux solvant de déprotéination / échantillon pour un temps de contact de 30 min. Seule la zone spectrale de la signature biochimique de l’échantillon (800-1800cm ⁻¹) est représentée.	328
Figure 99. Matière sèche obtenue dans les surnageants de déprotéination en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon.	331

Figure 100. Spectres FTIR de surnageants de déprotéination d'échantillons d'EL en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon pour un temps de contact de 30 min. Seule la zone spectrale de la signature biochimique de l'échantillon est représentée (800 – 1800cm ⁻¹).....	332
Figure 101. Distribution des sommes des aires des signaux détectés dans la fraction polaire en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et de la composition du mélange ternaire utilisé (A). Coefficients de variation associés à la distribution des sommes des aires des signaux détectés dans la fraction polaire en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et de la composition du mélange ternaire utilisé (B).	335
Figure 102. Distribution des sommes des aires des signaux détectés dans la fraction apolaire en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et de la composition du mélange ternaire utilisé(A). Coefficients de variation associés à la distribution des sommes des aires des signaux détectés dans la fraction apolaire en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et de la composition du mélange ternaire utilisé (B).	336
Figure 103. Distribution des coefficients de corrélation de Spearman calculés sur les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire éthanol (Apo Eth), apolaire acétone (Apo Ace), polaire acétone (Pol Ace) et polaire éthanol (Pol Eth) obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les échantillons ont été analysés par paire après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 et de normalisation sur l'intensité du standard interne.	339
Figure 104. Distribution des coefficients de variations calculés par pseudo composés pour les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire éthanol (Apo Eth), apolaire acétone (Apo Ace), polaire acétone (Pol Ace) et polaire éthanol (Pol Eth) obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 et de normalisation sur l'intensité du standard interne.	340
Figure 105. Distribution des coefficients de corrélation de Spearman calculés sur les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire éthanol (Apo Eth), apolaire acétone (Apo Ace), polaire acétone (Pol Ace) et polaire éthanol (Pol Eth) obtenues sur un échantillon congelé d'EL. Les données ont été analysées par paire après une étape de filtration des signaux selon le paramètre MCF 0.5 et une étape de normalisation sur l'intensité du standard interne.	341
Figure 106. Distribution des coefficients de variations calculés pour les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire éthanol (Apo Eth), apolaire acétone (Apo Ace), polaire acétone (Pol Ace) et polaire éthanol (Pol Eth) obtenues sur un échantillon congelé d'EL. Les données ont été analysées après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 et une étape de normalisation sur l'intensité du standard interne.	342

Figure 107. Mesures de colorimétrie en référentiel CIE Lab effectuées sur les échantillons industriels contrastés (témoin, type 1 et type 2). Les mesures ont été effectuées sur deux répliques prélevés séparément dans le pot d'origine après homogénéisation.	345
Figure 108. Diagramme de Venn présentant les composés d'intérêt identifiés dans les fractions polaire éthanol et apolaire acétone pour les altérations de type 1 (A) et 2 (B) et pour les altérations de type 1 et 2 dans les fractions polaire éthanol (C) et apolaire acétone (D).	347
Figure 109. Histogrammes représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux identifiés et retenus pour les fractions polaire éthanol et apolaire acétone.	352
Figure 110. Histogrammes représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux non identifiés / non retenus pour les fractions polaire éthanol et apolaire acétone.	360
Figure 111. Histogrammes représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux identifiés pour les fractions polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone.	363
Figure 112. Histogrammes représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux non identifiés/ non retenus ou trop complexes pour être identifiés pour les fractions polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone.	371
Figure 113. Planning de lancement d'une étude cinétique de l'altération des EL.....	372
Figure 114. Schéma d'une journée type d'analyse pour l'étude de l'altération avec la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	373
Figure 115. Résultats de colorimétrie (normalisés) par composante L, a et b à chaque temps d'analyse pour les différents partenaires pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	375
Figure 116. Spectres IRTF moyennés sur 10 répliques correspondant à des échantillons issus de l'étude cinétique de l'altération des EL avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i> , la ligne continue correspond au premier jour d'analyse (0h d'incubation) et la ligne discontinue au dernier jour d'analyse (336h d'incubation) (axe de gauche). La ligne rouge correspond à la valeur de p-value d'un test de Wilcoxon (t-test pour distribution non normale) réalisé sur les valeurs de chaque vibreur (axe de droite). Seule la zone d'intérêt (800-1800cm ⁻¹) est représentée.	377
Figure 117. Distribution des scores de corrélation calculés sur les données spectrales correspondant à l'analyse par IRTF d'échantillons issus de l'étude cinétique de l'altération des EL avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i> , le premier groupe correspond au premier jour d'analyse (0h d'incubation), le deuxième groupe au dernier jour d'analyse (336h d'incubation), le dernier groupe (J1-J14) correspond à l'ensemble des échantillons contenus dans les deux premiers groupes.	378
Figure 118 Intensités normalisées des signaux par fraction pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins à des temps d'analyse sélectionnés au cours de l'altération par la souche <i>B. weihenstephanensis</i> . Le seuil de coupure à 0,01 d'intensité relative est représenté par la barre orange.	380

Figure 119. Résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse des échantillons seuls. Les données sont soumises à une transformation log et Pareto (centrées sur la moyenne et divisées par l'écart type de chaque variable).	381
Figure 120. Résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse des témoins seuls. Les données sont soumises à une transformation log et Pareto (centrées sur la moyenne et divisées par l'écart type de chaque variable).	382
Figure 121. Représentation des résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins à des temps d'analyse sélectionnés	383
Figure 122. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h au cours de l'altération avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i>	384
Figure 123. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h au cours de l'altération avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i>	385
Figure 124. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.	386
Figure 125. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.	387
Figure 126. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.	387
Figure 127. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.	388
Figure 128. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.	388
Figure 129. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.	388
Figure 130. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération	389

Figure 131. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération.....	390
Figure 132. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.	391
Figure 133. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération	392
Figure 134. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération.....	392
Figure 135. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.	393
Figure 136. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération	394
Figure 137. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération.....	394
Figure 138. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.	395
Figure 139. Diagramme de Venn présentant les composés d'intérêt identifiés dans les quatre fractions étudiées (polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone) pour l'étude de l'altération avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i>	396

Figure 140. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h, 240h dans les quatre fractions étudiées. Les valeurs correspondant aux échantillons sains (témoins) sont indiquées en gris, celles correspondant aux échantillons en cours d'altération sont indiquées en orange. Les barres d'erreur correspondent à plus et moins l'écart type enregistré sur les trois réplicats pour chaque condition.....	401
Figure 141. Schéma d'une journée type d'analyse pour l'étude de l'altération avec la souche <i>Enterococcus faecium</i>	413
Figure 142. Résultats de colorimétrie (centrés) par composante L, a et b à chaque temps d'analyse pour les différents partenaires pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	415
Figure 143. Spectres IRTF moyennés sur 10 réplicas correspondant à des échantillons issus de l'étude cinétique de l'altération des EL. La ligne continue correspond au premier jour d'analyse (24h d'incubation) et la ligne discontinue au temps d'analyse 336h (axe de gauche). La ligne rouge correspond à la valeur de p-value d'un t-test réalisé sur les valeurs moyennes de chaque vibrateur (axe de droite). Seule la zone d'intérêt (800-1800cm ⁻¹) est représentée.	417
Figure 144. Distribution des scores de corrélation calculés sur les données spectrales correspondant à l'analyse par IRTF d'échantillons issus de l'étude cinétique de l'altération des EL avec la souche <i>E. faecium</i> , le premier groupe correspond au temps d'analyse 24h, le deuxième groupe au temps d'analyse 336h, le dernier groupe correspond à l'ensemble des échantillons contenus dans les deux premiers groupes.....	418
Figure 145. Résultats des ACP effectuées sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls (A) et des témoins seuls (B).	420
Figure 146. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.	421
Figure 147. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (distance euclidienne-Ward) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. Les temps d'analyse regroupés « début » « milieu » et « fin » sont signalés par les accolades de droite (Ed, Em, et Ef)...	422
Figure 148. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.....	423
Figure 149. Résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse des échantillons seuls.....	424
Figure 150. Résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse des témoins seuls.....	425

Figure 151. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. 426

Figure 152. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h..... 426

Figure 153. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé. 427

Figure 154. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. 428

Figure 155. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h..... 428

Figure 156. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé. 429

Figure 157. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. 430

Figure 158. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h..... 430

Figure 159. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé. 431

Figure 160. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération 432

Figure 161. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse simultanée des

échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération.....	432
Figure 162. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération	433
Figure 163. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération.....	433
Figure 164. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération	434
Figure 165. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération.....	434
Figure 166. Diagramme de Venn présentant les composés d'intérêt identifiés dans les quatre fractions étudiées (polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone).....	435
Figure 167. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés aux temps d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h dans les différentes fractions. Les valeurs correspondant aux échantillons sains (témoins) sont indiquées en gris, celles correspondant aux échantillons en cours d'altération sont indiquées en orange. Les barres d'erreur correspondent à plus et moins l'écart type enregistré sur les trois réplicats pour chaque condition. Le code couleur pour l'identification est le même que précédemment (Identification en violet, annotation niveau 1 en vert et niveau 2 en orange).	440
Figure 168. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés lors de la prise d'empreinte par GC-MS aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i> . Les différents niveaux d'identifications sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1 et orange pour ceux annotés au niveau 2).	451
Figure 169. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés non identifiés lors de la prise d'empreinte par GC-MS aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	454
Figure 170. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés lors de la prise d'empreinte par RMN aux temps d'analyse 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	459

Figure 171. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés non identifiés lors de la prise d'empreinte par RMN aux temps d'analyse 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*. 463

Liste des tableaux

Tableau 1 : Proportion des différentes parties de l'œuf de poule (Sauveur 1988)	37
Tableau 2 : Proportion et teneur en eau des différentes couches du blanc d'œuf (Stadelman, Newkirk, et Newby 1995)	37
Tableau 3 : Composition moyenne du blanc d'œuf en % et % de matière sèche (Thapon et Bourgeois, W.G 1994).....	38
Tableau 4. Composition en minéraux et vitamines du blanc d'œuf (Guérin-Dubiard <i>et al.</i> 2010).....	38
Tableau 5 : Composition moyenne du jaune d'œuf en % et % de matière sèche (Thapon et Bourgeois, W.G 1994).....	39
Tableau 6. Répartition des constituants du jaune d'œuf (d'après Powrie et Nakai 1986)	40
Tableau 7. Composition en minéraux et vitamines du jaune d'œuf (Guérin-Dubiard <i>et al.</i> 2010).....	41
Tableau 8. Propriétés fonctionnelles des ovoproduits ((Sauveur 1988), liste en partie basé sur les travaux de (Delmer 1978). La mention X signifie que la fraction correspondante est utilisée pour la propriété correspondante dans différents produits.	44
Tableau 9. Composés présents dans les œufs présentant une activité antibactérienne (résumé d'après les travaux (Baron et Rehault 2007).	45
Tableau 10. Production d'œufs de consommation et production commercialisée d'ovoproduits en France pour les années 2009 à 2013 (Barry 2015)	46
Tableau 11. Solde du commerce extérieur français en produits d'œuf (2013-2015) (FranceAgriMer 2016)	47
Tableau 12. Principales protéines du protéome extracellulaire de la souche <i>B.cereus</i> ATCC 14579 (données d'après Jan <i>et al.</i> 2018)	60
Tableau 13. Indicateurs physiques et chimiques des ovoproduits classiques.....	69
Tableau 14. Critères de sécurité des denrées alimentaires	70
Tableau 15. Critères d'hygiène des procédés – Ovoproduits.....	71
Tableau 16. Liste des méthodes disponibles pour la détection ou la prédiction de l'altération d'ovoproduits entiers liquides ((Jan <i>et al.</i> 2018), compilé depuis différentes sources : Alamprese 2004;	

Brown <i>et al.</i> 1986; Correa <i>et al.</i> 2008; Hidalgo <i>et al.</i> 2008; Hidalgo <i>et al.</i> 2004; Postollec <i>et al.</i> 2010; Riva <i>et al.</i> 2001.	72

Tableau 17. Marqueurs d'altération des EL potentiels (en bleu) et confirmés (en noir), identifiés dans la bibliographie. Les marqueurs sont classés par catégories (biotiques et abiotiques) dans le tableau de gauche et par famille chimique dans le tableau de droite. Les cases grisées correspondent aux marqueurs dont l'analyse est aujourd'hui comprise dans les critères législatifs relatifs à la production (matières premières), la transformation ou la mise sur le marché des ovoproduits. 73

Tableau 18. Marqueurs d'altération des EL potentiels, identifiés dans la bibliographie pour les bactéries du genre *Enterococcus* et du groupe *B.cereus*. Les marqueurs sont classés par type de catabolisme (sucres ou acides aminés), le type de matrice alimentaire étudié dans les travaux cités est précisé (données d'après Jan *et al.* 2018). 74

Tableau 19. Composition des mélanges MCW référencés dans la littérature et leurs applications spécifiques. 82

Tableau 20. Gamme spectrale du moyen infrarouge 83

Tableau 21. Gamme spectrale du proche infrarouge 83

Tableau 22. Bandes de vibration du domaine du PIR utilisées dans l'analyse quantitative des principaux composants de produits alimentaires. Données d'après Li-Chan *et al.* (2002), annotation selon les travaux de Osborne *et al.* (1993). 90

Tableau 23. Attribution des principales bandes Raman (Schuster, Urlaub, et Gapes 2000; Maquelin *et al.* 2002). 95

Tableau 24. Récapitulatif des avantages et inconvénients présentés dans la littérature pour les principaux marqueurs identifiés comme représentatifs de l'altération des œufs ou des ovoproduits. 107

Tableau 25. Marqueurs potentiels de l'altération des EL 108

Tableau 26. Avantages et inconvénients des principales techniques de métabolomique pour l'étude de l'altération des EL 109

Tableau 27. Composition des milieux de culture modifiés ou préparés au laboratoire 114

Tableau 28. Ratios de solvants de déprotéination 118

Tableau 29. Composition initiale des mélanges MCW (donnée pour 100ml de mélange) 118

Tableau 30. Quantité d'eau ajoutée pour déphasage des mélanges MCW 119

Tableau 31. Composition finale des mélanges MCW (données pour 100 mL de mélange) .. 119

Tableau 32. Paramétrage des cycles d'évaporation à l'aide de l'évaporateur rotatif 122

Tableau 33. Paramétrage des rampes de pression 123

Tableau 34. Liste des composés d'intérêt par famille chimique pour l'analyse par GC-MS .. 127

Tableau 35. Récapitulatif des données de centrage et de dispersion. 142

Tableau 36. Récapitulatif des données de dispersion des coefficients de variation (CV en %) 147

Tableau 37. Récapitulatif des données de dispersion des coefficients de variation (CV)	149
Tableau 38. Récapitulatif des données de dispersion des coefficients de variation (CV)	151
Tableau 39. Liste des composés d'intérêt par famille chimique pour l'analyse par GC-MS. Les composés détectables par GC-MS sont en bleu, les composés non détectables par GC-MS sont en noir, les composés détectables mais non quantifiables sont en violet, les composés pour lesquels les standards ne sont pas disponibles sont en rouge.	153
Tableau 40. Liste des marqueurs potentiels de l'altération des EL qui n'ont pas été intégrés au développement de l'approche analytique ciblée.....	154
Tableau 41. Résumé des temps de rétention, aires, annotation et identifiants des pics identifiés dans l'exemple de chromatogramme obtenu pour un mélange de 32 standards.	155
Tableau 42. Valeur des indicateurs de performance de la dérivation des composés cible pour le MSTFA.....	157
Tableau 43. Limites de détection et quantification, coefficient de variation et temps de rétention des composés cibles. Les valeurs de R^2 et de R^2 ajusté correspondent à une régression sigmoïdale à 4 paramètres d'équation $f = y_0 + a/(1 + \exp(-(x-x_0)/b))$. Les limites de détection (LOD) de quantification (LOQ) et de saturation (LOS) sont exprimées en ng de composés injectés dans le système analytique.	159
Tableau 44. Composition des mélanges MCW exprimées pour 100mL (v/v)	161
Tableau 45. Bilan des indicateurs de qualité pour la sélection de paramètres de déprotéination et de fragmentation MCW optimisés.....	162
Tableau 46. Liste des métabolites annotés dans l'ensemble des fractions polaires et apolaires	163
Tableau 47. Nombre de composés détectés et identifiés dans chaque fraction en fonction des paramètres de déprotéination et de fractionnement métabolique	164
Tableau 48. Bilan des scores de corrélation de Spearman et des coefficients de variation calculés sur l'ensemble des fractions métaboliques générées pour des échantillons d'EL frais et congelés.....	181
Tableau 49. Liste des métabolites annotés dans l'ensemble des fractions polaires et apolaires	183
Tableau 50. Nombre de composés identifiés détectés dans chaque fraction en fonction des paramètres de déprotéination et de fractionnement métabolique	184
Tableau 51. Liste des composés détectés uniquement dans l'une des quatre fractions explorées par fraction.	186
Tableau 52. Liste des métabolites annotés dans l'ensemble des fractions polaires et apolaires des échantillons congelés	188
Tableau 53. Nombre de composés identifiés détectés dans chaque fraction en fonction des paramètres de déprotéination et de fractionnement métabolique	188

Tableau 54. Liste des composés détectés uniquement dans l'une des quatre fractions explorés par fraction.	191
Tableau 55. Liste des composés identifiés pour l'ensemble des fractions analysées dans les échantillons frais, congelés et dans les deux à la fois.....	194
Tableau 56. Nombre de composés retenus pour chaque fraction	209
Tableau 57. Marqueurs potentiels identifiés dans les deux fractions analysées pour chaque type d'altération, les différents niveaux d'identifications sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés considérés comme identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1 et orange pour ceux annotés au niveau 2).....	210
Tableau 58. Nombre de composés d'intérêt non identifié pour chaque fraction.....	211
Tableau 59. Données d'intensité relatives dans les échantillons industriels sains et altérés de type 1 et 2 pour chaque marqueur d'altération identifié par GC-MS.....	212
Tableau 60. Nombre de composés retenus pour chaque fraction pour l'analyse des échantillons industriels par RMN ¹ H.....	216
Tableau 61. Nombre de composés d'intérêt non identifiés pour chaque fraction	216
Tableau 62. Données d'intensités relatives dans les échantillons industriels sains et altérés de type 1 et 2 pour chaque marqueur d'altération identifié dans les quatre fractions étudiées par RMN ¹ H.	217
Tableau 63. Valeurs d'intensité enregistrées pour les marqueurs détectés à la fois par GC-MS et par RMN dans la fraction polaire éthanol des échantillons industriels.	218
Tableau 64. Valeur de correction appliquée aux mesures de pH pour chaque distribution pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche ad 2528.	222
Tableau 65. Liste des réplicats aberrants par fraction pour les données correspondant aux groupes contenant à la fois les échantillons et les témoins pour des temps d'analyse sélectionnés (24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h) au cours de l'altération par la souche <i>B. weihenstephanensis</i>	233
Tableau 66. Nombre de composés retenus pour chaque fraction	237
Tableau 67. Marqueurs potentiels identifiés dans chacune des fractions pour l'étude de l'altération avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i> . Les différents niveaux d'identifications sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1 et orange pour ceux annotés au niveau 2).	238
Tableau 68. Nombre de composés d'intérêt non identifiés pour chaque fraction pour l'étude de l'altération avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i>	239
Tableau 69. Valeur de correction appliquée aux mesures de pH pour chaque distribution pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	244
Tableau 70. Nombre de composés retenus pour chaque fraction	253
Tableau 71. Marqueurs potentiels identifiés dans chacune des fractions pour les temps d'analyse 24h, 48h et 72h dans le cadre de l'étude cinétique de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i> .	

Les différents niveaux d'identifications sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1 et orange pour ceux annotés au niveau 2).	254
Tableau 72. Nombre de composés d'intérêt non identifiés pour chaque fraction	254
Tableau 73. Marqueurs potentiels identifiés dans les données de prise d'empreinte GC-MS de la fraction polaire acétone aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i> . Les différents niveaux d'identification sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1, et orange pour ceux annotés au niveau 2).	261
Tableau 74. Marqueurs potentiels identifiés dans les données de prise d'empreinte RMN ¹ H de la fraction polaire acétone aux temps d'analyses 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	264
Tableau 75. Profils observés pour chaque marqueur d'altération identifié pour les échantillons filtrés et non filtrés dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	270
Tableau 76. Intensité de variation des marqueurs de l'altération de type 2 avec la souche <i>B. weihenstephanensis</i> . Les cases grisées correspondent à des valeurs aberrantes présentant des écarts type importants (CV>50% pour les échantillons ou les témoins). Avec « NA » : non détecté dans les échantillons et les témoins, et « -1 » : non détecté dans les échantillons seulement. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation.	276
Tableau 77. Intensité de variation des marqueurs de l'altération de type 1 avec la souche <i>E. faecium</i> , les cases grisées correspondent à des valeurs aberrantes présentant des écarts type importants (CV>50% pour les échantillons ou les témoins). Avec « NA » : non détecté dans les échantillons et les témoins. Les valeurs en vert correspondent au jeu de données 1 (analyse de la phase précoce), les valeurs en violet correspondent au jeu de données 2 (analyse complète). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation.	276
Tableau 78. Coefficients de corrélations de Pearson obtenus en comparant les échantillons par paires.	328
Tableau 79. Coefficients de corrélations de Pearson obtenus par comparaison des échantillons par paires.	332
Tableau 80. Coefficients de variation moyens, médians et nombre de composés analysés pour le calcul pour chacune des fractions métaboliques étudiées.....	337
Tableau 81. Concentration moyenne de chaque marqueur en fonction du type d'échantillon pour l'étude des échantillons industriels par GC-MS.....	347
Tableau 82. Valeur de correction appliquée aux mesures de colorimétrie pour chaque distribution pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	373
Tableau 83. Données d'intensité relatives dans les échantillons sains (témoins) et altérés au cours de l'altération par la souche <i>B. weihenstephanensis</i> (type2) pour chaque marqueur d'altération identifié dans les différentes fractions.....	404

Tableau 84. Evolution de la concentration des composés quantifiables dans les différentes fractions des échantillons altérés et témoins analysés à chaque temps d'analyse dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche <i>Bacillus weihenstephanensis</i> . Certains composés notés « Hors gamme » présentaient des intensités trop importantes pour être quantifiés, d'autres notés NQ présentaient des intensités trop faibles pour être quantifiés (hors de la gamme de calibration).....	405
Tableau 85. Valeur de correction appliquée aux mesures de colorimétrie pour chaque distribution pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	413
Tableau 86. Liste des réplicats aberrants par fraction pour l'analyse des données correspondant aux groupes contenant à la fois les échantillons et les témoins pour les six premiers temps d'analyse (24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h) dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	418
Tableau 87. Données d'intensité relatives dans les échantillons sains (témoins) et altérés au cours de l'altération par la souche <i>E. faecium</i> pour chaque marqueur d'altération identifié dans les différentes fractions.....	440
Tableau 88. Evolution de l'abondance absolue des composés identifiés aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h, 240h dans des données de prise d'empreinte par GC-MS de la fraction apolaire acétone. Certains composés notés « Hors gamme » présentaient des intensités trop importantes pour être quantifiés (hors de la gamme de calibration)	443
Tableau 89. Données d'intensité relatives dans les échantillons sains (témoins) et altérés au cours de l'altération par la souche <i>E. faecium</i> pour chaque marqueur d'altération identifié dans les différentes fractions.....	454
Tableau 90. Concentration moyenne de chaque composé identifié quantifiable dans les données de prise d'empreinte par GC-MS aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche <i>E. faecium</i>	455
Tableau 91. Données d'intensité relatives dans les échantillons sains (témoins) et altérés au cours de l'altération par la souche <i>E. faecium</i> pour chaque marqueur d'altération identifié dans la fraction polaire éthanol.....	463

Table des abréviations

UE : Union Européenne

PAO : Pôle Agronomique Ouest

ADRO : Association pour le développement de la recherche sur les ovoproduits dans l'ouest

STLO : UMR Science et technologie du lait et de l'œuf

LUBEM : Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne

GEPEA : Laboratoire de Génie des Procédés Environnement Agroalimentaire

SP : Sous projet

UMR : Unité mixte de recherche

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

LDL : Lipoprotéines de basse densité

HDL : Lipoprotéines de haute densité

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

LC-MS : Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse

MSTFA : N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

BSTFA, : N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

BSA : N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide

HDMS : 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane

TBDMS : tert-butyldimethylsilyl

MTBSTFA : N-(t-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide

TMCS : trimethylchlorosilane

TMS : tri methyl silyl

TIC : Courants ioniques totaux

EL : Entier liquide

PDH : pyruvate déshydrogénase

PLC : phospholipases C

QS : Quorum sensing

AHL's : N-acyl homosérine lactones

AI : Auto inducer

AIP : Auto inducer peptides

CE : Commission européenne

CEE : Communauté économique européenne

ONU : Organisation des nations unies

DMS : Dimethylsulfide

SSP : Service de la statistique et de la prospective du ministère de l'agriculture

RMN : Résonnance magnétique nucléaire

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

MS : spectrométrie de masse

RI : Index de rétention

UV : Ultraviolet

ESI : Ionisation par electronebuliseur

DIESI : Injection directe et ionisation par electronebuliseur

FTIR : Infra rouge à transformée de fourrier

CE : électrophorèse capillaire

glu : Glutamine

asp : Asparagine

lys : Lysine

arg : Arginine

ser : Sérine

thr : Threonine

phe : Phenylalanine

trp : Tryptophane

tyr : Tyrosine

MCW : Méthanol / Chloroforme / Eau

IR : Infra rouge à transformée de fourrier

MIR : Moyen infra rouge

PIR : Proche infra rouge

SPIR : Spectroscopie proche infra rouge

SPIR-TF : Spectroscopie proche infrarouge à transformée de Fourier

SERS : spectroscopie Raman exaltée de surface

CCD : Dispositif a transfert de charge

COV : composés organiques volatils

API : l'ionisation à pression atmosphérique

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique

APPI : Photoionisation à pression atmosphérique

APLI : ionisation laser à pression atmosphérique

EI : Impact électronique

SMB : Faisceau moléculaire supersonique

FID : Signal de précession libre

CEISAM : Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation

RPM : Tours par min

BHI-YE : Milieu de culture cerveau cœur additionné d'extrait de levures

TS : Tryptone Sel

pH : potentiel hydrogène

ATR : Réflectance totale atténuée

RT-DLaTGS : Détecteurs Pyroélectriques DLaTGS (Deuterated, L-alanine doped tryglycine sulfate) à température ambiante

W4M : Workflow4Metabolomics

ANOVA : Analyse de variance

ACP : Analyse en composante principale

PLSDA : analyse discriminante des moindres carrés partiels

CV : Coefficient de variation

FC : Fold Change

EI : Ecart interquartile

HC : Classification ascendante hiérarchique

F&C : Frais et congelé

Pol : Polaire

Apo : Apolaire

Eth : Ethanol

Ace : Acétone

Introduction Générale

L'industrie des œufs représente aujourd'hui un secteur de première importance. En 2014, la production mondiale d'œufs atteignait 69,8 millions de tonnes. L'union européenne à 28 en était le deuxième producteur mondial (10% de la production), derrière la Chine (36% de la production). La France est en 2016, le premier pays producteur de l'UE avec 14,3 milliards d'œufs produits. Une proportion importante et croissante de cette production est aujourd'hui transformée en ovoproduits (environ 40% en 2010). Ces derniers présentent de nombreux avantages notamment sur les plans économiques, logistiques et microbiologiques. La production et l'échange de volumes croissants d'ovoproduits a fait naître la nécessité de mieux comprendre et maîtriser l'apparition en milieu industriel de phénomènes d'altération des produits au cours de leur procédé de fabrication et de leur stockage. Ces phénomènes d'altération microbiologique non maîtrisés induisent de régulières pertes de produits pour les producteurs. C'est dans ce cadre international compétitif que prend place le projet ALTOVOP financé par les régions Bretagne et Pays de la Loire. Lancé à l'initiative du PAO (Pôle agronomique ouest) et de l'ADRO (Association pour le Développement de la Recherche sur les Ovoproduits dans l'ouest), le projet ALTOVOP a pour but de caractériser et de comprendre plus avant les mécanismes biochimiques impliqués dans l'altération microbiologique des ovoproduits entiers liquides, ces derniers représentant le plus grand volume d'échange parmi les ovoproduits, et de chercher des marqueurs précoces de cette altération. Ces marqueurs pourraient à terme permettre aux industriels de mieux identifier les risques d'altération, et ainsi éviter des pertes régulières de produits, en orientant la production et la destination de ces derniers selon leur risque d'altération.

Le projet ALTOVOP regroupe différents acteurs de la filière (industriels, laboratoires académiques et structures de recherches privées). Les partenaires scientifiques du projet sont la société ADRIA développement, l'UMR STLO⁴, le laboratoire LUBEM⁵ de l'université de Brest et le laboratoire GEPEA⁶ de l'université de Nantes. A cette équipe scientifique pluridisciplinaire s'associent les industriels de l'ADRO Ouest, représentant dans leur ensemble environ 75% de la production nationale d'ovoproduits, et apportant lors des comités de pilotage leur connaissance de la filière, assurant l'adéquation entre la problématique industrielle du projet et les orientations scientifiques choisies.

Le projet ALTOVOP a donc pour objectif général de mieux caractériser le phénomène d'altération des ovoproduits entiers liquides rencontré en milieu industriel et de rechercher des

⁴ STLO – Laboratoire Science et technologie du lait et de l'œuf - UMR 1253 INRA / AGROCAMPUS OUEST

⁵ LUBEM - Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne - EA 3882

⁶ GEPEA – Laboratoire Génie des Procédés Environnement - Agroalimentaire - UMR CNRS 6144

indicateurs précoces des activités métaboliques des bactéries altérantes impliquées. Il est divisé en différents sous projets. Le sous-projet 1 (SP1) correspond aux développements méthodologiques et impliquera la présentation des types d'altérations les plus représentatifs et le choix des approches pour l'obtention de signatures physico-chimiques les plus informatives sur ces altérations. Le sous-projet 2 (SP2) correspond à la caractérisation microbiologique, enzymatique, physico-chimique, rhéologique et fonctionnelle d'échantillons industriels altérés (collectés auprès des partenaires industriels du projet). Le sous-projet 3 correspond à la caractérisation des flores altérantes conduisant à la sélection des espèces à employer pour reproduire le phénomène d'altération de manière contrôlée. Le sous-projet 4 correspond à la caractérisation macroscopique et analytique de l'altération dans le cadre d'études cinétiques de l'altération réalisées en laboratoire. Enfin le sous-projet 5 correspond à la réconciliation de l'ensemble des données du projet afin de mettre en évidence des relations entre les différents paramètres mesurés et de dégager des marqueurs précoces de l'altération microbiologique des entiers liquides (EL).

Cette thèse de doctorat prend place dans le cadre de la participation du laboratoire GEPEA au projet ALTOVOP. Dans le cadre du sous-projet 1, une approche double de caractérisation (macroscopique et métabolique) a été développée pour la prise d'empreintes physico-chimiques sur les échantillons d'entier liquide au cours de leur altération. Dans le cadre du sous-projet 4, la méthodologie développée a été appliquée sur des échantillons industriels et lors de deux études cinétiques d'altérations modèles. Ces études ont été réalisées dans des conditions discutées avec l'ensemble du consortium du projet afin de refléter au mieux la réalité industrielle tout en prenant en compte les impératifs d'une reproduction contrôlée de l'altération en laboratoire. Enfin dans le cadre du sous-projet 5 les données de l'ensemble des analyses réalisées par les différents partenaires du projet ont été réconciliées et analysées. L'objectif in fine de ces travaux de doctorat est de caractériser les voies d'altérations microbiologiques de l'ovoproduit entier liquide et de mettre en évidence des marqueurs précoces de cette altération.

Ce manuscrit présente les travaux de recherches réalisés au cours de ce projet. Le premier chapitre présente une analyse de la littérature scientifique disponible concernant les œufs et les ovoproduits, l'étude de leur altération, ainsi que des techniques d'analyse employables pour une analyse plus fine de cette altération. Le second chapitre présente les matériels et méthodes employés dans le cadre de ces travaux. Le troisième chapitre présente les résultats de la validation des développements méthodologiques réalisés au cours de la thèse. Le quatrième et dernier chapitre présente les résultats obtenus, leurs analyses et les discussions associées. Les expérimentations présentées (sauf celles réalisées par les partenaires du projet et indiquées comme telles) se sont déroulées au sein du laboratoire de Génie des Procédés – Environnement – Agroalimentaire (GEPEA UMR CNRS 6144) sur le site de Saint-Nazaire.

Chapitre I – Bibliographie

1 Structure et composition de l'œuf

Dans cette première partie seront brièvement présentées la structure et la composition biochimique de l'œuf de poule. L'œuf étant une matrice biologique très investiguée, de nombreuses études de sa composition ont été réalisées. Pour certains aspects non traités ou non détaillés dans ce manuscrit des sources de référence sont proposées au lecteur pour approfondir ces points précis.

1.1 Structure interne de l'œuf

L'œuf est constitué de différentes parties : le jaune, le blanc, les membranes coquillières et la coquille (Figure 1).

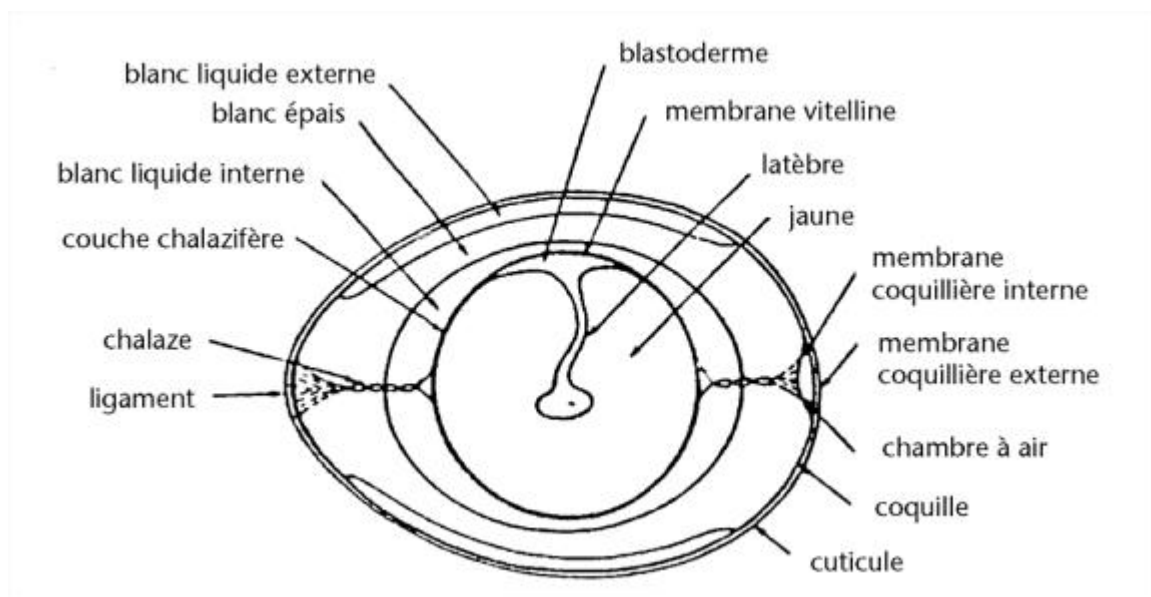


Figure 1 : Structure interne de l'œuf (Sauveur 1988)

Le poids d'un œuf de poule se situe entre 40 et 70g avec un standard pour les œufs de table à environ 60g, les proportions de ses différentes parties peuvent varier (Tableau 1). Les parties comestibles de l'œuf (blanc d'œuf et jaune d'œuf) représentent 90% de son poids et sont composée à 74% d'eau (Sauveur 1988).

Tableau 1 : Proportion des différentes parties de l'œuf de poule (Sauveur 1988)

Poids moyen (g)		En % de l'œuf total	
		Moyenne	Extrêmes*
Coquille	5,5	9,1	8,5 - 10,5
Membranes coquillières	0,25	0,4	-
Blanc	37	61,5	57 - 65
Jaune	17,3	29	25 - 33
Total comestible	54,3	90,5	89 - 92
Total	60	100	-

* A poids d'œuf variable

1.2 Composition de l'œuf

Les coquilles et membranes coquillières étant enlevées au cours du procédé de fabrication des ovoproduits (2.1) ces fractions ne seront que brièvement décrites. Cette partie traitera principalement de la composition biochimique du blanc et du jaune. Des informations plus détaillées sur la composition de l'œuf et de ses fractions sont largement disponibles dans la littérature (Guérin-Dubiard *et al.* 2010; Nau *et al.* 2010).

1.2.1 Blanc d'œuf

Le blanc d'œuf (ou albumen) est principalement constitué d'eau et de protéines et représente environ 60% du poids de l'œuf. Il peut être divisé en quatre parties distinctes : le blanc liquide externe, le blanc épais, le blanc liquide interne et les chalazes (filaments spiralés reliant le jaune aux extrémités de l'œuf et assurant le maintien du jaune dans une position centrale). Leurs proportions dépendent de différents facteurs, notamment la durée et les conditions de conservation. Les proportions moyennes sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Proportion et teneur en eau des différentes couches du blanc d'œuf (Stadelman, Newkirk, et Newby 1995)

Couches	% du blanc d'œuf		% H ₂ O
	Moyennes	Variations	
Blanc liquide externe	23,2	10 - 60	88,8
Blanc épais	57,3	30 - 80	87,6
Blanc liquide interne	16,8	1 - 40	86,4
Chalazes	2,7	-	84,3

La composition moyenne du blanc d'œuf est rappelée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Composition moyenne du blanc d'œuf en % et % de matière sèche (Thapon et Bourgeois, W.G 1994)

Composant	% du blanc d'œuf	% MS du blanc d'œuf
Protéines	9,7 - 10,6	88,85
Carbohydrates	0,4- 0,9	6,1
Lipides	0,03	0,25
Cendres	0,5 - 0,6	4,8
Matière sèche	10,6 - 12,1	-

Le blanc est principalement composé de protéines, sa composition ayant déjà été étudiée dans de nombreux travaux (Painter et Koenig 1976; Stevens 1991; Mine 1995; Guérin-Dubiard *et al.* 2006; Wang *et al.* 2012) elle n'est ici que très succinctement abordée. Le blanc contient plus de douze familles de protéines différentes. L'ovalbumine à elle seule représente plus de la moitié des protéines du blanc. Les principales protéines identifiées dans cette fraction de l'œuf sont les suivantes : Ovalbumine, Ovotransferine, Ovomucoïde, Ovoinhibiteur, Cystatine, Lysozyme, Ovomucine, Ovoglycolprotéine, Ch 21, Cal-gamma, Flavoprotéine, Avidine, Tenp, Clustérine, HEP21, Glutamyl aminopeptidase, Méthionine aminopeptidase, Metalloprotéase 2 (Guérin-Dubiard *et al.* 2010). La plupart de ces protéines présentent des fonctions spécifiques impliquées dans différents mécanismes allant du développement embryonnaire aux capacités immunologiques en passant par le transport et stockage des ions. De nombreuses autres protéines ont été détectées dans le blanc ; la fonction de certaines reste inconnue et d'autres restent encore à identifier. L'étude de Mann 2007 (Mann 2007) a permis de mettre en évidence la présence de 114 protéines dans le blanc.

La composition en minéraux et en vitamines du blanc est présentée dans le Tableau 4.

Tableau 4. Composition en minéraux et vitamines du blanc d'œuf (Guérin-Dubiard *et al.* 2010)

Minéraux	mg pour 100g de blanc d'œuf	Vitamines	µg pour 100g de blanc d'œuf
Sodium	155	Thiamine B ₁	10
Chlore	175	Riboflavine B ₂	430
Potassium	140	Niacine B ₃	90
Calcium	8	Acide panthoténique B ₅	250
Phosphore	18	Pyridoxine B ₆	10
Magnésium	10	Biotine B ₈	7
Fer	0,1	Acide folique B ₉	12
Zinc	0,12	Cobalamine B ₁₂	0,1
Cuivre	0,02		
Manganèse	0,007		
Iode	0,003		

Le blanc est également composé d'une faible proportion de sucres (0,9%). Ces sucres sont présents sous forme de glucose libre pour 50%, sous forme de sucres liés aux protéines (glucosamine, galactosamine,) et d'acides sialiques (Guérin-Dubiard *et al.* 2010).

1.2.2 Jaune d'œuf

Le jaune d'œuf ou vitellus contient les éléments nécessaires au développement de l'embryon et représente approximativement 30% du poids de l'œuf. Il est composé du latèbre (masse centrale du jaune anciennement formé), du col et du noyau de Pander (chemin de migration du disque germinatif vers la surface du cytoplasme au cours de la croissance de l'œuf), des stratifications du jaune d'œuf (couches concentriques) et de la membrane vitelline qui sépare le blanc du jaune (Moigne et Foucrier 2009). La composition moyenne du jaune est présentée dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Composition moyenne du jaune d'œuf en % et % de matière sèche (Thapon et Bourgeois, W.G 1994)

Composant	% du jaune d'œuf	% MS du jaune d'œuf
Protéines	16,0	33
Lipides	30,6	62,5
Carbohydres	0,6	1,2
Cendres	1,7	3,5
Matière sèche	48,9	-

Le jaune présente une macrostructure complexe, selon Guérin-Dubiard *et al.* (2010) « il se présente comme une émulsion de particules lipidiques dispersées dans une solution aqueuse de protéines ». En termes de structure, le jaune peut être séparé en deux fractions, le plasma et les granules (Figure 2). Ces fractions peuvent être obtenues facilement par centrifugation du jaune dilué ; leur composition est présentée dans le Tableau 6.

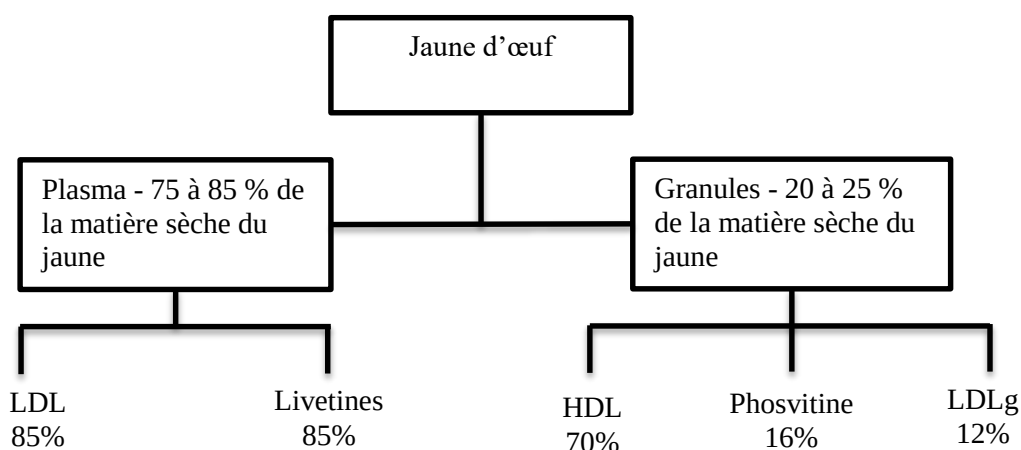


Figure 2 : Schéma de séparation et composition des fractions plasma et granules du jaune d'œuf (Guérin-Dubiard *et al.* 2010)

Tableau 6. Répartition des constituants du jaune d'œuf (d'après Powrie et Nakai 1986)

	MS du Jaune (%)	Lipides du jaune (%)	Protéines du jaune (%)	Lipides (%)	Protéines (%)
Jaune	100	100	100	64	32
Plasma	78	93	53	73	25
LDL	66	61	22	88	10
Livetines	10	-	30	-	96
Autres protéines	2	-	1	-	90
Granules	22	7	47	31	64
HDL	16	6	35	25	75
Phosvitine	4	-	11	-	95
LDLg	2	1	1	88	10

Les lipides du jaune sont tous associés à des protéines sous forme de lipoprotéines. Ils sont composés de 62% de triglycérides, 33% de phospholipides et environ 5% de cholestérol. La couleur jaune provient des caroténoïdes représentant moins de 1 % des lipides du jaune. La composition lipidique classique en acide gras est la suivante : 30-35% d'acides gras saturés, 40-45% d'acides gras mono-insaturés et 20-25% d'acides gras poly-insaturés. Les acides gras les plus abondants sont l'acide oléique (40-45%), l'acide palmitique (20-25%) et l'acide linoléique (15-20%). Ces concentrations sont toutefois sujettes à de fortes variations liées à l'alimentation des pondeuses (Anton 2007). Les lipoprotéines de haute densité (HDL) ou de faible densité (LDL) représentent la majeure partie de la matière sèche du jaune (respectivement 66% et 16%) ; on y trouve aussi 10% de protéines globulaires (livetines), 4% de phosphoprotéines (phosvitine) et d'autres protéines en faible proportion (<2%) (Tableau 6).

Les triglycérides représentent la majeure partie des lipides du jaune, ils sont formés d'une molécule de glycérol dont les trois fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras. La répartition la plus fréquente est la suivante : acide palmitique en position 1, acide oléique ou linoléique en position 2 et acide palmitique ou stéarique en position 3 (Kuksis 1992).

Les phospholipides sont la deuxième classe de lipides la plus représentée. Ce sont des molécules amphiphiles qui présentent une tête hydrophile (acide phosphorique + alcool, acides aminés ou polyol) et un groupe hydrophobe (deux acides gras). La phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine représentent la majorité des phospholipides du jaune (respectivement 76% et 22%) ; d'autres phospholipides comme le phosphatidylinositol, la phosphatidylsérine, la sphingomyéline, les cardiolipines, la lysoPhosphatidylcholine et la lysoPhosphatidyléthanolamine sont également présents en faibles proportions. Le cholestérol représente environ 5 % des lipides du jaune, il est principalement présent sous forme libre (85-90%) comme élément de la structure des

lipoprotéines et plus faiblement abondant sous forme estérifiée (10-15%). Les caroténoïdes sont principalement représentés par des carotènes et des xanthophylles (lutéine, cryptoxanthine et zeaxanthine) (Anton 2007). Le jaune contient également des minéraux et vitamines, leur concentration est présentée dans le Tableau 7.

Tableau 7. Composition en minéraux et vitamines du jaune d'œuf (Guérin-Dubiard *et al.* 2010)

Minéraux	mg pour 100g de jaune d'œuf	Vitamines	µg pour 100g de jaune d'œuf
Sodium	50	Thiamine B ₁	250
Chlore	162	Riboflavine B ₂	480
Potassium	100	Niacine B ₃	60
Calcium	133	Acide panthoténique B ₅	4500
Phosphore	530	Pyridoxine B ₆	370
Magnésium	15	Biotine B ₈	60
Fer	4,8	Acide folique B ₉	140
Zinc	3,9	Cobalamine B ₁₂	2,8
Cuivre	0,14	A (équivalent rétinol)	450
Manganèse	0,11	D	4,5
Iode	0,14	E	3600
		K	15

Le jaune est également composé de sucres (de 0.7 à 1 %), ces sucres sont présents sous forme de glucose libre (0.3%), de glycoprotéines et de glycolipides (Guérin-Dubiard *et al.* 2010).

1.2.3 Coquille et membranes coquillères

La coquille représente 10 % du poids de l'œuf. Elle est constituée d'un assemblage de minéraux (principalement du carbonate de calcium) et de composés organiques. Elle est le premier système de protection de l'œuf, assurant sa protection physique et antimicrobienne. La coquille est épaisse d'environ 0,3 mm et présente à sa surface de nombreux pores permettant la respiration de l'embryon. Les échanges gazeux qui se produisent à travers ces pores entraînent la formation de la chambre à air. Cette dernière évolue en fonction des conditions et de la durée de conservation et peut être mesurée pour évaluer les conditions de conservation d'un œuf. Deux membranes coquillères (une interne et une externe) permettent d'améliorer la résistance de l'œuf aux contaminations microbiologiques. Elles sont constituées d'une superposition de couches de fibres de protéines entrecroisées recouvertes d'un corps de glycoprotéines (Thapon et Bourgeois, 1994).

2 Les ovoproduits

La composition biochimique des fractions consommables de l'œuf de poule (blanc d'œuf et jaune d'œuf) ont été introduits dans la partie précédente. Les procédés de production des ovoproduits ainsi que leurs applications commerciales et industrielles sont succinctement présentés dans cette partie. Un bref aperçu du marché actuel des ovoproduits est également proposé. Une attention spécifique est portée sur l'ovoproduit entier liquide (matrice d'étude dans le cadre de ce projet de recherche).

2.1 Production des ovoproduits

L'ovoproduit est un mélange d'œufs dont les coquilles et les membranes coquillères ont été enlevées et ayant subi une homogénéisation et un procédé de traitement thermique (comme la pasteurisation). Il peut être fractionné (blanc, jaune) ou entier, et peut se présenter sous différentes formes : liquide, concentré, séché, cristallisé, congelé ou coagulé. L'ovoproduit trouve de nombreuses applications dans le monde industriel où les propriétés de l'œuf (blanc, jaune ou entier) sont d'un intérêt certain dans différents domaines, et plus particulièrement dans le domaine agroalimentaire.

Les normes d'hygiène et de qualité concernant les produits agroalimentaires à base d'œufs sont très strictes et le passage par la forme ovoproduit est devenu quasiment incontournable pour les industriels. L'ovoproduit, quel que soit la forme sous laquelle il est utilisé, représente un gain de temps et d'efficacité ainsi qu'une garantie de sûreté microbiologique. En effet, le cassage des œufs est suivi de différentes étapes de stabilisation incluant généralement des procédés de traitements thermiques tels que la pasteurisation, indispensables pour éliminer les contaminants pathogènes et limiter le développement des micro-organismes en général.

Les principales étapes du procédé de production des ovoproduits (Figure 3) sont le cassage, la filtration, la pasteurisation dont la température et la durée dépendront du type de produit (65 à 68°C pendant 5 à 6 min pour l'entier et le jaune, 55 à 57°C pendant 2 à 5 min pour le blanc en raison du caractère thermosensible des protéines. (Baron et Jan 2010), et le conditionnement. Différentes étapes peuvent s'ajouter en fonction du volume et des spécificités des produits désirés. Ainsi pourront s'ajouter des étapes de séparation, filtration, séchage, congélation... Les ovoproduits peuvent également être salés, sucrés ou encore subir d'autres modifications de leur composition chimique afin d'optimiser leur durée de conservation ou en fonction de l'usage prévu pour le produit.

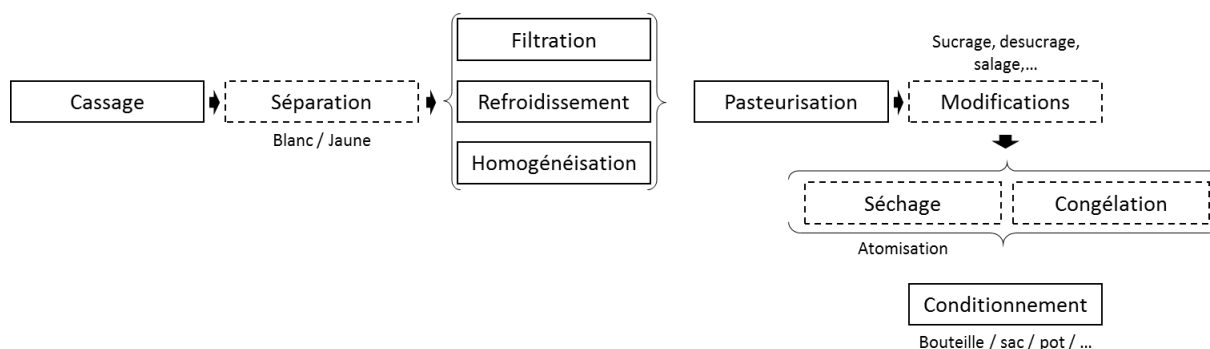


Figure 3. Représentation schématique du procédé de production des ovoproduits

Des informations plus détaillées sur les procédés de transformation des œufs en ovoproduits sont disponibles dans la littérature (Nau *et al.* 2010; Stadelman *et al.* 1995).

2.2 Utilisation des ovoproduits

Les ovoproduits et leurs fractions présentent d'intéressantes propriétés nutritionnelles et une grande diversité de propriétés physico-chimiques donnant accès à tout un panel de propriétés fonctionnelles. Cette multitude de propriétés fonctionnelles a permis le développement d'une large gamme d'applications dans le domaine agroalimentaire. Des applications dans les domaines de la pharmaceutique et de la cosmétique ont également été développées ou sont en cours d'étude. Le Tableau 8 présente une liste non exhaustive des applications usuelles des ovoproduits dans l'industrie alimentaire par fraction ; quelques exemples d'applications dans d'autres segments de l'industrie sont également présentés.

Tableau 8. Propriétés fonctionnelles des ovoproduits ((Sauveur 1988), liste en partie basé sur les travaux de (Delmer 1978). La mention X signifie que la fraction correspondante est utilisée pour la propriété correspondante dans différents produits.

Industrie utilisatrice	Pouvoir demandé à l'œuf	Fraction employée		
		Entier	Blanc	Jaune
Biscuiterie, Pâtisserie, Flans, ...	Aide au décollage	Gaufrettes	Meringue	X
	Anti cristallisant			
	Aromatique			
	Coagulant	Flans	X	Crèmes
	Colorant	Madeleine		Crèmes
	Emulsifiant	Pain d'épice		
			Meringue	
	Foisonnant		Macaron	
			Biscuit Cuillère	
			Mousses	
	Liant	Madeleines		
		Pâte à choux		
Pâtes alimentaires, sauces...	Aromatique			X
	Colorant	X		X
	Elastique	Raviolis		
	Emulsifiant			Mayonnaise
Confiserie	Anti cristallisant		Nougat	
	Elastique		X	
	Foisonnant		X	
Glaces	Emulsifiant			X
	Liant			X
Charcuterie	Emulsifiant			Quenelles
	Liant		Pâtés	
Industries non alimentaires	Liant			
	Emulsifiant			
	Propriétés biochimiques		Industries pharmaceutiques	

Les ovoproduits trouvent aussi des applications potentielles dans d'autres secteurs industriels, on peut citer les peptides présentant des activités anti-hypertension, produits par hydrolyse enzymatique de protéines d'œufs (López-Fandiño, Recio, et Ramos 2007), les phospholipides d'œuf utilisés pour stabiliser les émulsions et les lécithines employées pour leurs propriétés antioxydantes dans les formulations en pharmaceutique et en cosmétique (Cansell 2007).

Différents composés entrant dans la composition des œufs possèdent également une activité antibactérienne (bactériostatique ou bactéricide). Le Tableau 9 liste les composés de l'œuf présentant

une activité antibactérienne. Certains de ces composés comme le lysozyme sont déjà bien connus et exploités, d'autres jouant un rôle moins bien défini sont encore en cours d'étude.

Tableau 9. Composés présents dans les œufs présentant une activité antibactérienne (résumé d'après les travaux (Baron et Rehault 2007).

Composé	Activité / mécanisme
Lysozyme	Elément important de la défense immunitaire non spécifique
Ovotransferrine	Chélation des métaux, particulièrement du fer - induit un environnement carencé en fer
Anti-protéases	Ovostatine, ovomucoïde, ovoinhibiteur, cystatine - Inhibent les protéases bactériennes
autres protéines	Chélation des vitamines - Induit un environnement carencé en vitamines

2.3 Marché des œufs et des ovoproduits

Selon la FAO (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) la production mondiale d'œuf de poule a atteint en 2014 69,8 millions de tonnes, un chiffre légèrement en hausse (2%) par rapport à l'année 2013. La Chine était en 2014 le premier producteur mondial, elle représentait à elle seule 36% de la production mondiale, suivie par l'union européenne à 28 (10%) et des Etats-Unis (8%).

Selon la Commission Européenne, la production européenne atteindrait en 2016 110,8 milliards d'œufs, soit une hausse de 1.2% par rapport à l'année 2015. La France est le premier pays producteur de l'UE devant l'Italie et l'Allemagne avec 14,3 milliards d'œufs produits en 2016 (« Infos filière CNPO - Interprofession des oeufs - Source ITAVI » 2018).

En France, en 2013, 15,2 milliards d'œufs ont été produits, soit environ 927 000 tonnes, Cette production était réalisée dans les 2100 exploitations spécialisées dans l'élevage de pondeuses d'œuf de consommation. 42% des effectifs de pondeuses étaient situés en Bretagne et 11% dans les pays de la Loire, faisant du grand ouest français le principal bassin de production national. La filière française de l'œuf a connu une période difficile en 2011, 2012 et 2013 en réponse à la directive européenne « bien-être animal ». Ces nouvelles normes, applicables depuis le 1^{er} janvier 2012, ont nécessité des investissements importants dans les exploitations. Les données de production d'œufs de consommation et de production commercialisée d'ovoproduits en France pour les années 2009 à 2013 sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Production d'œufs de consommation et production commercialisée d'ovoproduits en France pour les années 2009 à 2013 (Barry 2015)

Production d'œufs de consommation	2009	2010	2011	2012	2013	Évolution 2013/2012 %
Œufs de consommation (tonne)	827 454	868 591	781 645	758 280	927 757	+ 22,4
Œufs de consommation (milliard d'œufs)	13,56	14,24	12,81	12,43	15,21	+ 22,4

Source : modèle de prévision SSP - ITAVI – CNPO

Production commercialisée d'ovoproduits (tonne)	2009	2010	2011	2012	2013	Évolution 2013/2012 %
Œufs entiers (liquides, congelés, séchés...)	198 012	187 735	195 008	196 555	202 109	+ 2,8
Jaunes d'œuf (liquides, congelés, séchés...)	29 431	28 381	27 827	28 770	28 532	-0,8
Blancs d'œuf (liquides, congelés, séchés...)	66 422	62 285	70 422	65 497	69 919	+ 6,8
Total ovoproduits	293 865	278 401	293 257	290 822	300 560	+ 3,3

Source : SSP - Agreste - Prodcom

En 2010, environ 40% de la production française d'œufs coquilles a été transformée en ovoproduits destinés à l'industrie et à la restauration hors domicile. De plus, la majeure partie des échanges internationaux et particulièrement les exportations se font préférentiellement sous la forme d'ovoproduits pour des raisons pratiques. Les exportations et importations françaises d'ovoproduits sont assez équilibrées avec un solde légèrement positif pour l'exportation (Tableau 11).

Tableau 11. Solde du commerce extérieur français en produits d'œuf (2013-2015) (FranceAgriMer 2016)

Volumes (tecoq ⁷)	2013	2014	2015
SOLDE	13 936	15 221	10 194
Ovoproduits alimentaires liquides	-15 967	-15 789	-19 118
Ovoproduits alimentaires séchés	16 273	17 153	17 768
Ovoproduits non alimentaires	13 630	13 858	11 544

Source : FranceAgriMer d'après douanes

Le tableau complet des données relatives au commerce extérieur français en produits d'œufs (2013-2015) est présenté dans l'Annexe A.

Le marché français des œufs et des ovoproduits reprend sa croissance après la légère baisse de production subie par le secteur à la suite de la directive européenne « bien-être animal ». La France garde cependant sa position de premier producteur d'œuf de l'UE. Avec une proportion d'œuf transformée en ovoproduits de plus en plus importante et une demande à l'international en nette augmentation, le secteur des ovoproduits français a de bonnes perspectives de croissance.

3 Analyse de l'altération de l'Entier Liquide

Cette partie traite des méthodes d'analyse de l'altération des ovoproduits et plus particulièrement de l'Entier Liquide (EL), regroupées selon trois approches. L'approche physico-chimique a pour objectif d'identifier les marqueurs d'altération biologique ou physico-chimique des ovoproduits identifiés dans la littérature. L'approche microbiologique a pour but de mettre en évidence les principales voies métaboliques d'altération microbiologique potentielles de l'entier liquide et des marqueurs potentiels de ces voies métaboliques. Enfin, l'approche réglementaire présente les contrôles actuels de mesure de la qualité des ovoproduits en France, leurs limites et leur application potentielle pour l'étude de l'altération. Une dernière partie résumera et discutera enfin de l'intérêt de l'ensemble des marqueurs identifiés.

⁷ Tonnes Equivalent Coquilles : Unité employée pour pouvoir agréger des données en poids concernant des œufs entiers et des produits à base d'œufs sous toutes leurs présentations : œufs entiers sans coquille, blancs seuls, jaunes seuls, séchés ou non, etc.. On applique au poids brut un coefficient propre à chaque forme du produit : 1 pour un œuf entier avec coquille par définition, 1,16 pour un œuf entier liquide sans coquille, 2,5 pour du jaune séché par exemple.

3.1 Etude de l'altération des ovoproduits – approche physico-chimique

Dans cette partie sont présentés les marqueurs d'altération physico-chimique et microbiologique référencés dans la littérature et impliqués ou suspectés d'être impliqués dans l'altération des ovoproduits et plus particulièrement de l'EL. Au cours des dernières décennies différentes équipes ont travaillé à la mise en évidence de tels marqueurs pouvant servir à mesurer la fraîcheur des ovoproduits ou à détecter une altération. Les marqueurs identifiés dans la littérature sont listés ici par famille chimique en fonction du type d'altération dont ils sont représentatifs (physico-chimique ou microbiologique). Leur structure chimique est également représentée, leur origine et leur pertinence discutées.

3.1.1 Altération physico-chimique

L'altération physico-chimique des ovoproduits advient principalement au cours des procédés de transformation et du stockage de ces produits. Les procédés thermiques de stabilisation ou de séchage et les conservations de longue durée ou effectuées dans des conditions mal adaptées (par exemple à température ambiante) peuvent engendrer des modifications importantes de la composition chimique des ovoproduits (oxydation des lipides, dégradation des vitamines,...). Certains de ces composés présentant des cinétiques d'apparition ou de dégradation significatives à basse température peuvent également être pertinents pour l'étude de l'altération des EL au cours de leur conservation.

3.1.1.1 Dérivés des acides aminés

- Acide pyroglutamique

L'acide pyroglutamique (Figure 4) a été détecté dans un échantillon d'entier liquide par Morris (1987). Selon Van Der Werf *et al.* (1971), il est issu du glutathion via des réactions du cycle du γ -glutamyl. Sa concentration augmente à la fois dans le blanc et dans le jaune au cours du stockage des œufs. Cette augmentation est directement liée à la température de conservation, faisant de cet acide un marqueur potentiel de dégradation (Lucisano *et al.* 1996).

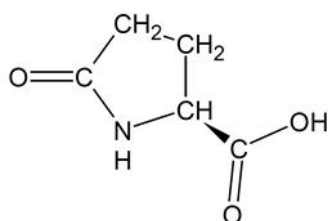


Figure 4. Acide pyroglutamique

Lucisano *et al.* (1996) mettent en garde contre l'utilisation de l'acide pyroglutamique comme indicateur de fraîcheur des œufs en raison de sa variabilité naturelle et de sa faible augmentation au

cours du stockage, et ce bien que celle-ci soit linéaire. La concentration d'acide pyroglutamique présent dans l'œuf est également dépendante de l'âge de la pondeuse (ROSSI et Pompei 1995).

Le dosage de l'acide pyroglutamique, de l'acide glutamique et de la glutamine par LC-MS peut, de plus, mener à des erreurs d'estimation. En effet il a été prouvé que l'acide glutamique et la glutamine peuvent subir une réaction de cyclisation en acide pyroglutamique dans la source d'ionisation par électronébulisation, engendrant ainsi un artefact courant dans le cadre des études de type métabolomique (Purwaha *et al.* 2014). Leur analyse par GC-MS est également source d'artefact. En effet la dérivation de la glutamine ou de l'acide glutamique à l'aide de BSTFA ou de BSTFA-TMCS peut engendrer la formation d'un dérivé d'acide pyroglutamique (PyrGlu2TMS) dans le chromatogramme d'ion totaux (TIC) obtenu (Salvatore 2015).

- *Furosine & Lysine*

La furosine est actuellement le marqueur de plus utilisé dans le cadre de l'étude des réactions de Maillard car hautement spécifique des étapes précoces de ces réactions. L'étude de la concentration en furosine couplée à celle de la concentration en lysine permet de déterminer la quantité de lysine disponible (et celle de lysine bloquée). Les réactions de formation de la furosine sont aujourd'hui bien caractérisées (Erbersdobler et Somoza 2007) (Figure 5).

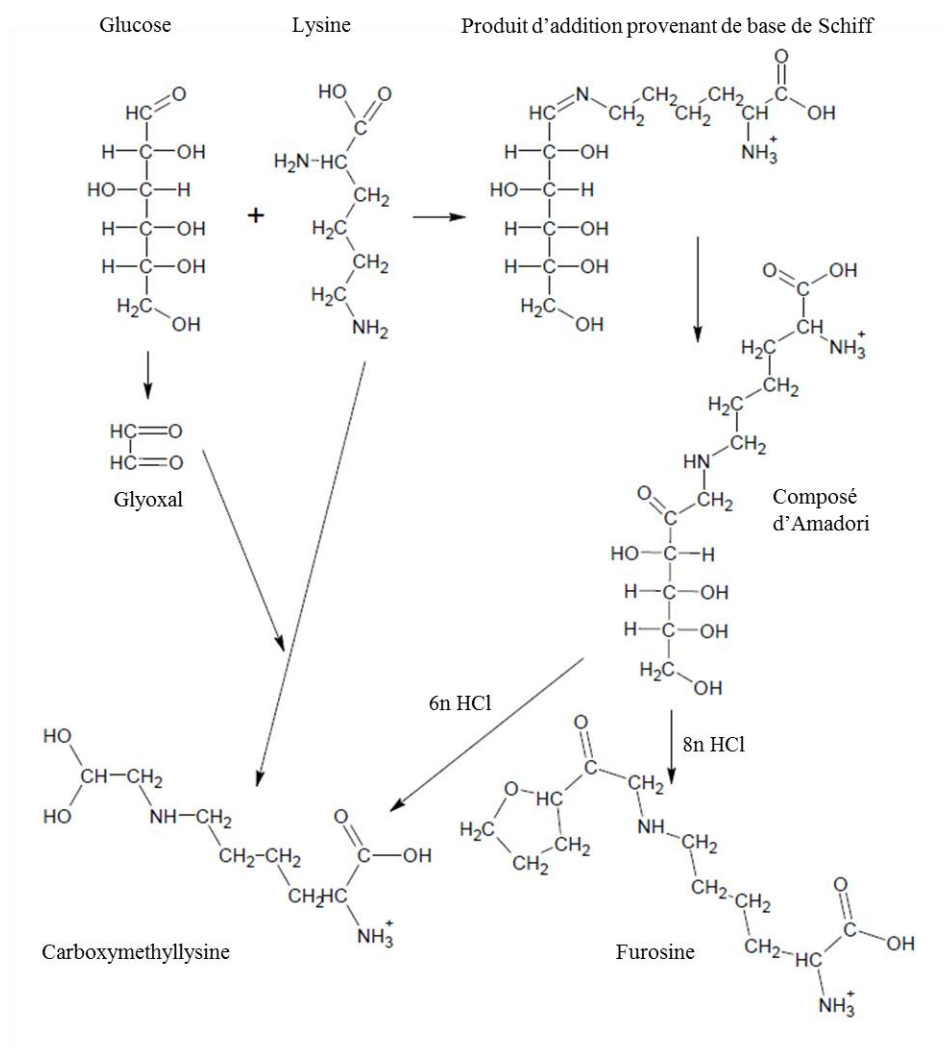


Figure 5. Etapes initiales de la réaction de Maillard avec la formation de furosine et de Nε-carboxyméthyllysine (Erbersdobler et Somoza 2007)

Le dosage de la furosine peut être utilisé pour évaluer l'intensité des traitements thermiques mais aussi pour évaluer l'âge des produits puisque les réactions de Maillard se produisent également à température ambiante. Le dosage de la furosine est déjà utilisé pour évaluer les conditions de stockage ainsi que l'âge et la fraîcheur de produit tels que le lait en poudre, la gelée royale, le miel et les œufs coquille (Caboni *et al.* 2005).

Hidalgo *et al.* (1995) expliquent, en se basant sur les travaux de Posati et Orr (1976), que la lysine et le glucose qui sont respectivement présents dans l'œuf entier à hauteur de 0,82% et 0,34% permettent la réalisation des réactions de Maillard au cours de la conservation des œufs coquille. Selon Caboni *et al.* (2005), les réactions de Maillard sont accélérées par le pH légèrement alcalin de l'entier liquide pasteurisé (pH 7,7). Cet indicateur présente également l'avantage de ne pas être impacté par la pasteurisation de manière significative (Rossi *et al.* 1996). En effet toujours selon Caboni *et al.* (2005), les valeurs de concentration de furosine obtenues par Rossi *et al.* (1996) et Hidalgo *et al.* (1995) sur des œufs frais et pasteurisés un jour après la ponte sont similaires. Hidalgo *et al.* (2006) ont confirmé

la possibilité d'exprimer la fraîcheur des œufs coquilles en âge d'œuf équivalent, utilisant la furosine comme index de référence.

3.1.1.2 Vitamines : Tocopherols et Retinols

Le tocophérol ainsi que les autres antioxydants naturels des œufs (Figure 6) subissent une importante dégradation au cours des traitements thermiques des ovoproduits, favorisant certaines voies de dégradation après pasteurisation. Cependant leur évolution continue au cours de la conservation, faisant de ces anti-oxydants un marqueur intéressant des conditions de conservation de ces produits (Caboni *et al.* 2005).

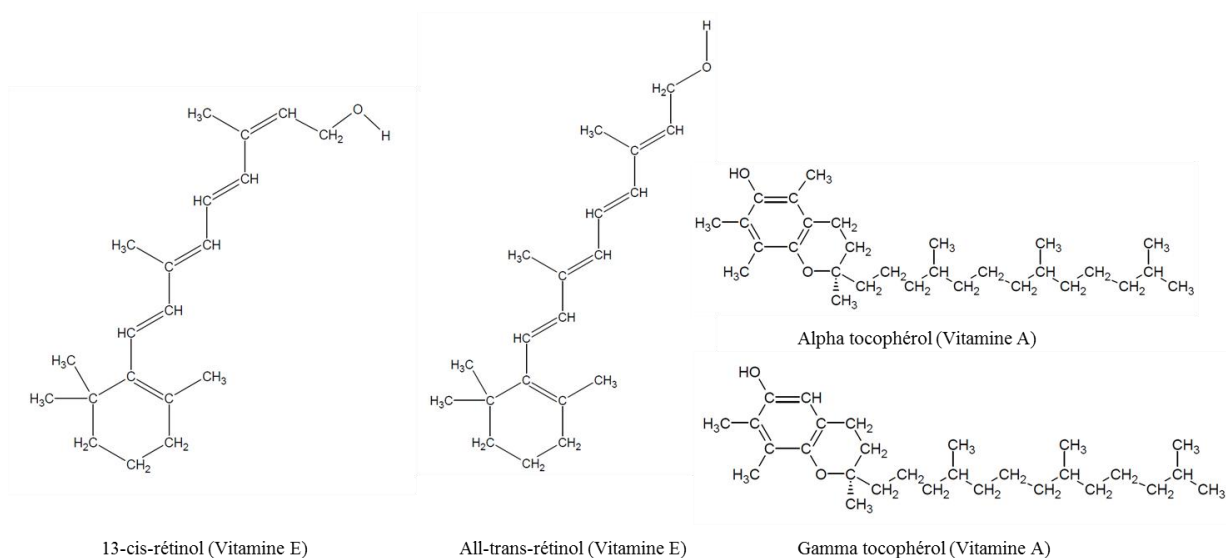


Figure 6. 13-Cis-rétinol, All-trans-rétinol, α -tocophérol, δ -tocophérol

Selon Galobart *et al.* (2001), les pertes de ces composés associées à une durée limitée de conservations sont minimales, limitant leur intérêt dans le cadre de l'étude de l'altération de l'EL. Ces marqueurs sont toutefois particulièrement pertinents pour étudier les ovoproduits en poudre (séchés par atomisation).

3.1.1.3 Stérols : Cholestérol & produits d'oxydation du cholestérol (COP's, de l'anglais Cholesterol Oxidation Products)

L'oxydation du cholestérol est très faible dans les œufs frais. Elle est accélérée par les procédés de traitement thermique et dépend du temps et des conditions de conservation.

Les produits d'oxydation du cholestérol (COPs) (Figure 7) sont des marqueurs importants des conditions de production et de stockage des ovoproduits (Caboni *et al.* 2005). La localisation des lipides dans le jaune (protégés de l'exposition à l'oxygène de l'air) et la présence d'antioxydants naturels dans l'œuf explique la faible oxydation du cholestérol observée dans les œufs frais.

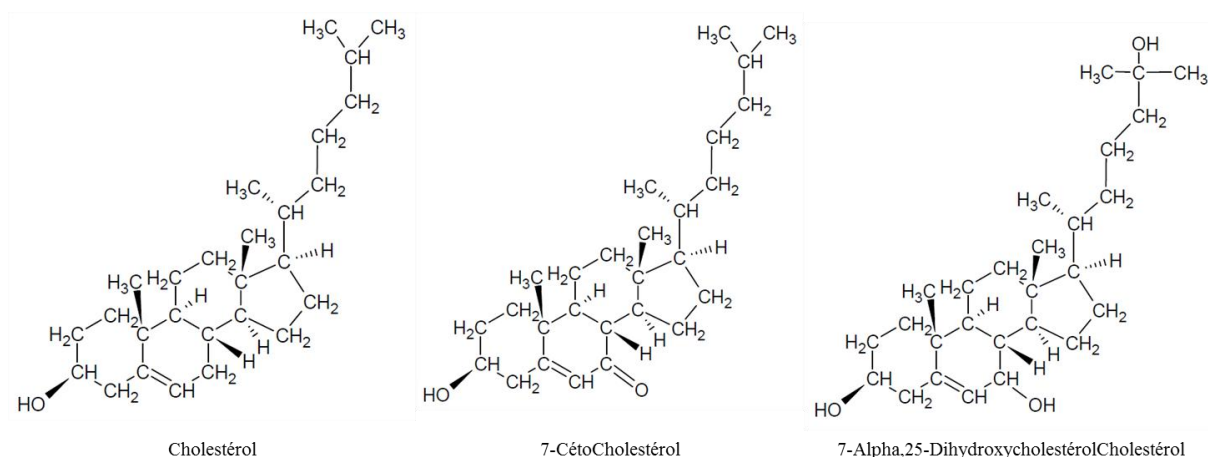


Figure 7. Cholestérol, 7-Cétocholestérol et 7-Alpha,25-dihydroxycholestérol

L'oxydation du cholestérol peut également se produire au cours des procédés de transformation thermique des œufs ou des produits à base d'œufs. Ces produits d'oxydation sont biologiquement actifs et peuvent engendrer différents effets toxiques (athérogénèse, carcinogénèse, ...) (Zardetto *et al.* 2014).

3.1.2 Altération biologique

3.1.2.1 Bases pyrimidiques : uracile et uridine

L'uracile a été étudié comme marqueur potentiel de la contamination des ovoproduits par Morris (1987). Cette étude portait sur la relation entre le contenu en uracile et l'acceptabilité de l'odeur d'un échantillon d'ovoproduit. Sa stabilité thermique et sa nature non volatile font de ce composé un marqueur potentiellement intéressant. L'uracile est synthétisé à partir de l'uridine par certaines bactéries dans le cas de contamination microbiologique (Hidalgo *et al.* 2004) ; il est naturellement absent dans l'œuf intact (Rossi et Pompei 1995). De nombreuses bactéries ont la capacité de convertir l'uridine en uracile par l'action de l'uridine phosphorylase, enzyme impliquée dans la synthèse nucléosidique des bactéries (Figure 8) (Leer *et al.* 1977; Utagawa *et al.* 1985).

Les acides acétique et lactique sont des produits du métabolisme bactérien (produits de fermentation) (Quinto *et al.* 2014 ; Salminen 2012). Ils sont présents dans les ovoproduits à hauteur de 1 à 7 mg/kg de matière sèche (Hidalgo *et al.* 2008). L'acide acétique peut provenir notamment de l'oxydation incomplète du glucose ou de l'éthanol par voie respiratoire aérobie. Chez les bactéries chimio-organotrophes, les acides acétique et lactique sont produits lors de la fermentation acide mixte et l'acide lactique lors des fermentations homolactique et hétérolactique (Salminen 2012). La législation européenne prévoit une limite à la concentration d'acide lactique présente dans un ovoproduit (3.3.1).

- Acide succinique

L'acide succinique est également un indicateur de développement microbologique (Stijve et Diserens 1987 via Hidalgo *et al.* 2004). Il a été détecté dans des échantillons d'ovoproduits sévèrement contaminés par Hidalgo *et al.* (2004). Cette étude a permis de mettre en évidence la forte sensibilité de ce marqueur à la pasteurisation. En effet, des taux importants d'acide succinique (proches de la limite légale pour les matières premières utilisées) détectés dans des échantillons avant pasteurisation n'étaient plus détectables (inférieurs au seuil de détection) après cette étape.

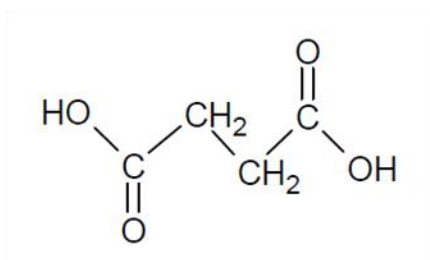


Figure 10. Acide succinique

L'acide succinique, utilisé comme marqueur de contamination bactérienne de la matière première avant pasteurisation semble donc avoir le potentiel de servir de marqueur d'altération au cours du stockage des produits. Cependant, la sensibilité à l'étape de pasteurisation pourrait mener à des biais de mesure lors des analyses.

3.1.2.3 Acides gras d'origine bactérienne :

Les lipides d'origine bactérienne diffèrent de ceux des formes de vie supérieures (O'Leary 1962). Les profils d'acides gras représentent donc des marqueurs chemotaxonomiques pertinents (Lechevalier et Moss 1977).

Certains AG de longueur ou de structure inhabituelles (nombre de carbone impairs, ramifications en iso- et anteiso-) sont présents en quantité importante dans de nombreuses bactéries (Lang *et al.* 2011), faisant de ces derniers des marqueurs de contamination intéressants (Bobbie et

White 1980). La Figure 11 présente un exemple de structure chimique d'un acide gras à chaîne impaire avec une ramification en « iso ».

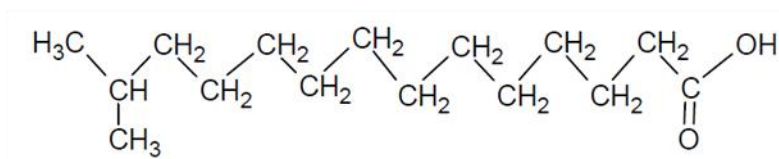


Figure 11. Acide gras Iso-c15:0

3.1.2.4 *N*-acyl-homosérines lactones et esters de l'acide borique (Molécules du Quorum Sensing)

La plupart des systèmes de communication bactériens basés sur la diffusion de molécules de signalisation ne sont activés que lorsque la population bactérienne atteint une densité suffisante, également appelé « quorum ». Ils appartiennent pour cette raison à la famille de molécules participant au système du « Quorum Sensing » (Rul et Monnet 2015).

Quatre principaux groupes de molécules ont été identifiés comme impliqués dans ces systèmes de communication intra et inter espèces : l'autoinducer-2 (AI-2) présent dans tous les types de bactéries, les peptides utilisés par les bactéries à Gram positive, les *N*-acyl-homosérine lactones et l'autoinducer 3 (AI-3) utilisés par les bactéries à Gram négative (Rul et Monnet 2015).

Les *N*-acyl-homosérines lactones et l'autoinducer 2 (Figure 12) ont été détectés dans différentes matrices alimentaires (viandes, produits laitiers, légumes) (Rul et Monnet 2015). L'autoinducer 2 a été proposé comme molécule de signalisation universelle inter espèces permettant le développement de colonies bactériennes multi espèces (Campagna *et al.* 2009).

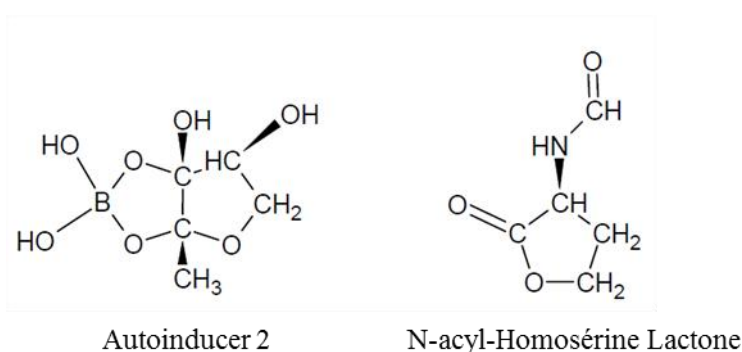


Figure 12. Autoinducer-2 et *N*-acyl-Homosérine Lactone

Les systèmes de signalisation bactériens sont affectés par de nombreux facteurs (pH, conditions oxydantes, température, hétérogénéité) dans les matrices alimentaires. La viscosité est également très impactante puisqu'elle influence la diffusion, l'accumulation et la réception des

molécules impliquées. De plus, ces matrices alimentaires contiennent souvent des enzymes capables de dégrader les molécules de signalisation (Rul et Monnet 2015).

3.1.2.5 Le cas particulier du Glucose

Le Glucose est un sucre réducteur naturellement présent dans l'EL à hauteur de 0,9% dans le blanc d'œuf et de 0,3% dans le jaune d'œuf (Nau *et al.* 2010).

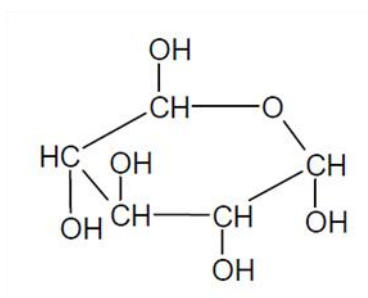


Figure 13. Glucose

Il est à la fois un marqueur d'altération physico-chimique puisqu'il est impliqué dans les étapes précoces des réactions de Maillard (Caboni *et al.* 2005) et un marqueur d'altération microbiologique puisqu'il représente un substrat carboné adapté au développement bactérien (Salminen 2012).

3.1.2.6 Cas particulier de l'acide hydroxybutyrique

L'acide hydroxybutyrique (Figure 14) n'est pas un marqueur de l'altération microbiologique. Il est lié à la biologie du développement de l'œuf. Sa présence est un signe de développement embryonnaire et peut-être mesurée afin de détecter les œufs rejetés d'incubateurs. La législation européenne prévoit une limite pour l'acide hydroxybutyrique contenu dans un échantillon d'ovoproduit (3.3.1).

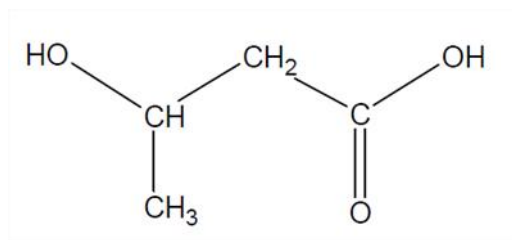


Figure 14. Acide 3-Hydroxybutyrique

L'acide 3-hydroxybutyrique est étudié comme marqueur du développement embryonnaire potentiel depuis 1970 (Staruszkiewicz *et al.* 1970). L'intérêt de cet indicateur a été confirmé par différents travaux (Salwin *et al.* 1972 ; Heaney et Curtis 1976 ; Littmann *et al.* 1982 ; Parry *et al.* 1980). Rossi *et al.* (1999) soulignent que les acides lactique et acétique sont également formés au cours du développement embryonnaire. Le dosage de l'acide hydroxybutyrique peut donc être

nécessaire à l'interprétation de la présence de ces marqueurs afin d'écarter la possible présence d'œufs rejetés d'incubateurs dans les matières premières utilisées.

Une analyse critique des marqueurs d'altération identifiés dans cette partie est présentée à la fin de ce chapitre, après la présentation des approches microbiologiques et réglementaires (voir Analyse critique des marqueurs d'altération identifiés et sélection des techniques à employer).

3.2 Etude de l'altération des ovoproduits – approche microbiologique

Dans cette partie seront succinctement présentés les principaux genres bactériens impliqués dans l'altération des ovoproduits et plus particulièrement de l'EL, leur métabolisme et les principaux produits de ce dernier. Cette partie résume les récents travaux de synthèse bibliographique de (Jan *et al.* 2018) portant sur l'altération microbiologique des ovoproduits.

La majorité des espèces pathogènes aujourd'hui retrouvées dans les ovoproduits peuvent être maîtrisés par le respect des règles d'hygiène et l'application de barèmes de pasteurisation adaptés. Cependant certaines espèces psychrotrophes, thermorésistantes ou sporulées, potentiellement favorisées par les procédés de transformation, sont plus difficiles à contrôler (Baron et Jan 2010). Les bactéries mises en jeu dans l'altération des œufs coquilles sont décrites dans la littérature (R. G. Board et Fuller 1994 ; Board 2000 ; EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2014). Cependant, ces études datent de plusieurs années et correspondent à des méthodes d'élevages qui ne sont plus pratiquées. De plus, il est généralement admis que moins de 1% des bactéries présentes dans l'entier cru survivent à la pasteurisation (Jan *et al.* 2018).

Même si la flore des ovoproduits est fortement liée à la flore des œufs d'origine, elle est aussi fortement influencée par les procédés de transformation et de stabilisation (Baron et Jan 2010). Ainsi, les bactéries les plus représentées dans les ovoproduits ne sont pas nécessairement les plus représentées dans la flore de l'œuf avant traitement thermique mais plutôt les plus résistantes à ces procédés, notamment à l'étape de pasteurisation. Une étude réalisée dans l'ouest de la France entre 2001 et 2003 (Protais *et al.* 2006) a permis de mettre en évidence l'efficacité de la pasteurisation de l'EL pour la réduction du nombre d'*enterobactéries*, d'*E. Coli*, de bactéries des genres *Brochotrix*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Salmonella* et *Listeria*. Les bactéries mésophiles à coloration de Gram négative qui dominaient la flore des entiers crus (Mackenzie et Skerman 1982) laissaient après la pasteurisation place à des bactéries Gram positive véhiculées par les coquilles, peu compétitives dans le cadre de la contamination des œufs mais dont la thermorésistance permettait de résister aux procédés de transformation et de stabilisation des ovoproduits tels que l'EL. Une pression de sélection supplémentaire est appliquée lors de la conservation des lots d'EL à froid ; les espèces bactériennes capables de croître à faible température vont alors se développer.

La production et le stockage d'ovoproduits comme l'EL vont donc induire le développement d'une flore secondaire, moins bien caractérisée et qui provoque de réguliers phénomènes d'altération en milieu industriel. Cette flore est principalement composée d'espèces psychrotrophes, thermorésistantes ou sporulées appartenant aux genres *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi qu'au groupe *Bacillus Cereus*.

3.2.1 Groupe *Bacillus cereus*

- Présentation générale

Les bactéries appartenant à ce groupe sont des bacilles sporulés ubiquitaires à coloration de Gram positive aéro-anaérobies facultatives et qui présentent des spores ovales en position terminale à sub-terminale. Le groupe *Bacillus cereus* se compose de sept espèces classées sur des critères pratiques tel que la virulence, la physiologie et la morphologie (*Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus mycoïdes*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* sensu stricto et *Bacillus cereus* sensu lato). Parmi ces espèces, seule *B. cereus* sensu stricto est connue pour provoquer des toxi-infections alimentaires par la production de deux types de toxines dont le céruléide à l'origine du syndrome émétique (Agata *et al.* 1994). Les espèces *B. weihenstephanensis*, *B.pseudomycoïdes* et *B.mycoïdes* ne sont pas considérées comme agents de toxi-infections alimentaires. Elles possèdent cependant un potentiel toxinogène (Prüss *et al.* 1999; Stenfors *et al.* 2002).

Les capacités des bactéries du groupe *B.cereus* à pénétrer dans l'œuf ou à se développer dans les ovoproduits ne sont que peu caractérisées, n'ayant pas été identifiées dans des cas de toxi-infections alimentaires collectives liées à la consommation d'œufs comme ce fut le cas pour les bactéries du genre *Salmonella*. Les souches psychrotrophes du groupe sont cependant impliquées dans l'altération des ovoproduits pasteurisés en raison de leurs propriétés de formation de biofilms, de leurs propriétés de sporulation et de leur activité enzymatique (Baron *et al.* 2007 ; Jan *et al.* 2011 ; Techer *et al.* 2014 ; Techer *et al.* 2015).

- Métabolisme central

La connaissance du métabolisme central du groupe *B.cereus* est difficile en raison de la grande diversité des souches étudiées, de leurs besoins en acides aminés et de leur développement dans des milieux complexes servant à imiter les matrices alimentaires. Différentes études montrent que les bactéries du groupe *B.cereus* ont la capacité de cataboliser une vaste gamme de glucides, principalement via la voie d'Emden-Meyeroff, mais également par la voie des pentoses phosphates (Rosenfeld *et al.* 2005 ; Zigha *et al.* 2006a ; Ouhib *et al.* 2006).

En aérobiose, le pyruvate est converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) et la production d'acétate n'a lieu que lorsque la vitesse d'entrée du carbone au niveau du cycle de Krebs excède sa capacité d'oxydation (Rosenfeld *et al.* 2005 ; Duport *et al.* 2006).

Le catabolisme anaérobie du glucose du groupe *B.cereus* est schématisé dans la Figure 15.

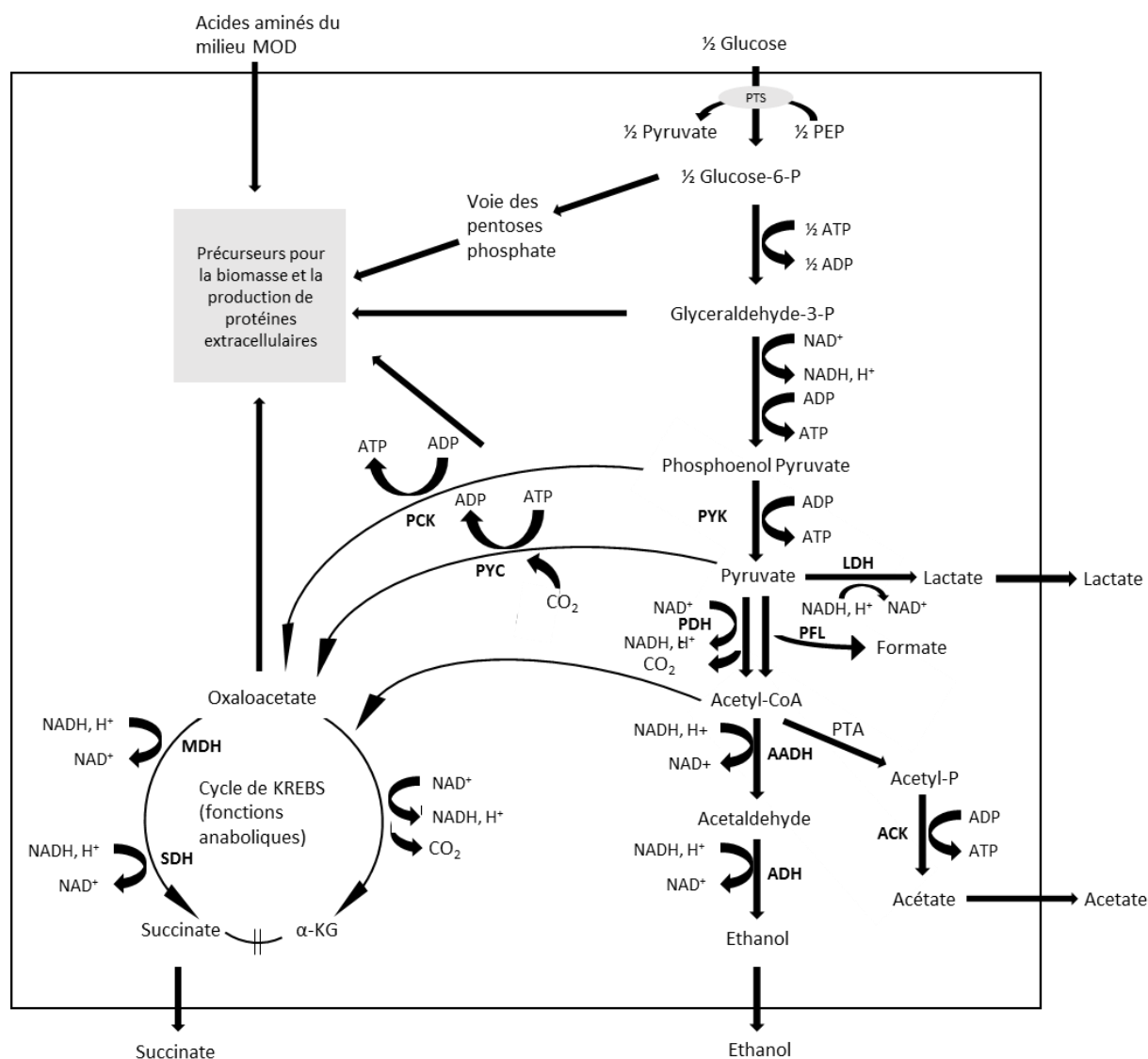


Figure 15. Schéma du catabolisme du glucose chez *B.cereus* (PFL : pyruvate formate lyase, LDH : lactate déshydrogénase, MDH : malate déshydrogénase, SDH : succinate déshydrogénase, PTA : phosphotransacétylase, ACK : acétate kinase (figure inspirée de la figure originale Zigha *et al.* 2006a).

En anaérobiose, le comportement des bactéries du groupe *B.cereus* est extrêmement dépendant des sucres présents dans le milieu. Dans le cas de l'étude de Zigha *et al.* (2006 a et b), les principaux produits de dégradation étaient l'acide lactique (jusqu'à 65% du total des produits formés), les acides acétique et formique (15% du total des produits formés chacun), l'éthanol et le succinate ne représentant que 2 à 3 % du total des produits formés.

Le réseau de régulation du métabolisme central des bactéries du groupe *B.cereus* est très complexe. Le séquençage de la souche *B.cereus* ATCC 14579 a en effet permis de mettre en évidence plus de 200 régulateurs transcriptionnels contrôlant les 5370 cadres de lecture (ORFs) identifiés (Ivanova *et al.* 2003 ; Gohar *et al.* 2005). Plus de 500 protéines ont été annotées dans le protéome extracellulaire de cette souche (Gohar *et al.* 2005). Les protéines majeures identifiées sont présentées dans le Tableau 12.

Tableau 12. Principales protéines du protéome extracellulaire de la souche *B.cereus* ATCC 14579 (données d'après Jan *et al.* 2018)

Famille	Protéine(s)
Collagénases	ColA
Metalloprotéases	InhA1, InhA2, InhA3, Camélysine, CalY
Protéase (subtilase)	sfp
Protéases neutres, M23/M37	BC3698
Phospholipases	Phosphatidylinositol-specific phospholipases C (PI-PLC), Phosphatidylcholine-specific phospholipases C (PC-PLC), Sphingomyélinase, Smase,
Chitinase	Chitin binding protein A (ChbA)
5'-nucléotidase	UshA
Hémolysines	-
Enterotoxines	-
flagellines	-

- Activités enzymatiques
 - o Activités protéolytiques

De nombreux gènes codant pour des enzymes protéolytiques et des transporteurs d'acides aminés et de peptides sont présents dans le génome des bactéries du groupe *B.cereus*, suggérant ainsi une préférence de ces souches pour les acides aminés (Ivanova *et al.* 2003). De nombreuses peptidases et protéases sont également présentes dans le protéome extracellulaire dans le cas où les cellules sont incubées dans un milieu riche en protéines. L'activité hydrolytique sur les protéines et les peptides doit aider les cellules à utiliser les peptides exogènes comme source d'acides aminés (Luo *et al.* 2007 ; Gohar *et al.* 2005). A notre connaissance, seule une étude de Techer *et al.* (2015) décrit l'activité protéolytique des bactéries du groupe *B.cereus* isolées à partir d'ovoproduits industriels (en raison de leur implication dans l'altération d'un dessert à base d'ovoproduits). L'ensemble des souches isolées dans cette étude ont développé une activité protéolytique sans qu'un lien ne soit clairement établi entre les activités enzymatiques mesurées et les modifications physico-chimiques induites par l'altération du produit. Les activités protéolytiques altérantes des bactéries du genre *B.cereus* sont largement décrites

dans la littérature (Nabrdalik *et al.* 2010 ; Bach *et al.* 1999, 2001 ; Grass *et al.* 2004), plus particulièrement dans l'industrie laitière (Lindsay *et al.* 2000 ; LDRM Chen, Daniel, et Coolbear 2003 ; L Chen *et al.* 2004).

o Activités phospholipases

Les bactéries du groupe *B.cereus* produisent plusieurs types de phospholipases C. L'activité de ces phospholipases est une des propriétés biochimiques principales utilisée dans les méthodes officielles de détection de ces souches (Hondal *et al.* 1998). La phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine sont les substrats de la phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC) (Martin *et al.* 2000). La réaction conduit à la libération d'un diglycéride et d'un composé contenant un groupement phosphate (phosphosérine, phosphocholine ou phosphoéthanolamine). La phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) est spécifique du phosphatidylinositol et des glycolipides qui en dérivent (Hondal *et al.* 1998). La Sphingomyélinase quant à elle clive spécifiquement des sphingolipides. La phosphatidylcholine étant un composant important du jaune d'œuf, les EL sont des produits susceptibles d'être altérés par l'activité de ces enzymes. Dans les faits, la révélation de l'activité de ces enzymes est généralement réalisée par culture sur des géloses à base de jaune d'œuf (Kushner 1957 ; Hergenrother *et al.* 1995 ; Fricker, Reissbrodt, et Ehling-Schulz 2008). Elle diminue le pouvoir liant du jaune et provoque une modification de son état colloïdal conduisant à un blanchiment et à la formation d'une couche lipidique en surface dans une émulsion de jaune d'œuf (Techer *et al.* 2014). A notre connaissance seule l'étude de Techer *et al.* (2015) décrit l'activité phospholipase de bactéries du groupe *B.cereus* isolées à partir d'ovoproduits industriels (en raison de leur implication dans l'altération d'un dessert à base d'ovoproduits), sans toutefois, comme pour le cas de l'activité protéolytique, établir de lien entre l'activité enzymatique mesurée et les modifications physico-chimiques induites par l'altération du produit.

o Activités lipases

Le genre *Bacillus* est le principal représentant des bactéries à coloration de Gram positive quant à l'expression d'activités lipases (Decimo *et al.* 2017). Ces activités sont décrites dans la littérature. Celles mises en jeu dans l'altération des matrices alimentaires sont majoritairement décrites dans les produits laitiers. A notre connaissance, seules deux publications font état des activités lipases dans le cadre de l'étude de l'altération des ovoproduits. Miller *et al.* (2010) montrent qu'environ 87% des souches isolées d'entiers liquides présentent une activité lipolytique. Techer *et al.* (2015) montrent quant à eux que l'activité lipolytique est présente pour une proportion importante de souches des genres *Enterobacter* (60%), *Enterococcus* (50%), *Escherichia* (85.7%), *Serratia* (66.7%) et *Shigella* (66.7%). Il est important de noter qu'aucune des souches du groupe *B.cereus* n'a exprimé d'activité lipolytique dans les conditions expérimentales de l'étude de Techer *et al.* (2015). Malgré leur potentiel altérant via leur phospholipases, les bactéries du groupe *B.cereus* semblent moins mises en jeu dans

l'hydrolyse des triglycérides que d'autres types bactériens identifiés dans les ovoproduits ou produits à base d'ovoproduits, y compris le genre *Enterococcus*.

o Régulation de l'expression des activités hydrolytiques

La régulation de l'activité hydrolytique des bactéries du groupe *B.cereus* peut être séparée en deux types de facteurs ; les facteurs bactériens et les facteurs environnementaux. Des informations plus détaillées sur le fonctionnement des systèmes de régulation de l'activité hydrolytique des bactéries du groupe *B.cereus* sont données dans les travaux de Jan *et al.* (2018).

▪ Facteurs bactériens

La plupart des facteurs de virulence des bactéries du groupe *B.cereus* sont sécrétés au début de la phase stationnaire de croissance et sont directement ou indirectement régulés par le facteur transcriptionnel PlcR (Phospholipases C regulator) (Agaisse *et al.* 1999 ; Slamti et Lereclus 2002). Ce facteur transcriptionnel active l'expression de gènes cibles par liaison à une séquence nucléotidique appelée « boîte PlcR ». La transcription de PlcR se fait par auto-induction et commence juste avant l'entrée des cellules en phase stationnaire de croissance (Lereclus *et al.* 1996).

D'autres facteurs bactériens peuvent intervenir dans la régulation de l'expression des activités hydrolytiques dans le groupe *B.cereus* tel que le taux de croissance, la mobilité, les plages de température de croissance et de production enzymatique, le type cellulaire et la souche (Lereclus *et al.* 1996).

▪ Facteurs environnementaux

Les conditions environnementales (température, disponibilité en nutriments, pH, potentiel redox, conditions d'oxygénation) ont également un impact sur les activités hémolytiques des bactéries du groupe *B.cereus*. Le réseau de régulation des facteurs environnementaux de virulence pour le groupe *B.cereus* n'est pas totalement élucidé mais un certain nombre de ces facteurs et de réponses correspondant à ces différents stress sont présentés dans la littérature (Mols et Abee 2011 ; De Sarrau *et al.* 2012). Les bactéries de ce groupe ont notamment montré une importante capacité à modifier la composition de leurs membranes en fonction des conditions environnementales. Cette capacité doit participer à l'ubiquité de ce groupe bactérien (Diomandé *et al.* 2015).

3.2.2 Genres *Streptococcus* et *Enterococcus*

- Présentation générale

- o *Le genre Streptococcus*

Ce genre regroupe une centaine d'espèces pathogènes et commensales. Ce sont des coques ubiquistes à coloration Gram positive assemblées en paires ou en chaînettes, catalase négatives, non mobiles et dont le type respiratoire est majoritairement anaérobie facultatif. L'acide lactique est le principal produit de leur catabolisme glucidique. Certaines espèces présentent une capsule et elles sont dépourvues de cytochrome. La classification de ces bactéries est en constante évolution. Elle est basée sur leurs capacités hémolytiques ou les propriétés antigéniques du polysaccharide C (Lancefield 1933). Différentes espèces de *Streptococcus* (*S. avium*, *S. durans*, *S. faecalis*, *S. faecium* et *S. gallinarum*) ont été reclassées dans le genre *Enterococcus* (aujourd'hui nommées *E. avium*, *E. durans*, ...). Les espèces *E. faecium* et *E. faecalis*, anciennement nommées *S. faecium* et *S. faecalis* (Schleifer et Kilpper-Bälz 1984a) et présentant un intérêt particulier en raison de leur potentiel pour la dégradation de l'EL sont présentées dans le genre *Enterococcus*. La suite de cette partie se focalise sur le genre *Enterococcus*.

- o *Le genre Enterococcus*

Ce genre est composé d'une trentaine d'espèces de coques à coloration de Gram positive, aéro-anaérobies facultatives. Elles se présentent généralement sous la forme de chaînettes. Les espèces les plus courantes dans les produits alimentaires sont *E. faecium* et *E. faecalis* (Al Bulushi *et al.* 2010 ; Anderson *et al.* 2016). En tant que bactéries lactiques, certaines souches de ce genre sont utilisées dans des procédés de transformation alimentaire ou comme probiotiques. Cependant, leur caractère pathogène opportuniste et le risque qu'ils représentent en tant que vecteur d'antibio-résistance (Leblanc 2006a) implique que chaque souche utilisée pour ce type d'application soit soumise à une évaluation afin d'attester de son innocuité.

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont parmi les plus thermorésistantes des bactéries non sporulantes (Perez *et al.* 1982 ; Magnus *et al.* 1988). Elles possèdent des capacités d'adaptation importantes en termes de substrats et de conditions de croissance. Cette propriété et leur caractère ubiquiste suffisent aisément à expliquer la présence et la prévalence de ce genre bactérien dans les produits ayant subi un traitement thermique. Dans une étude de Miller *et al.* (2010) portant sur la conservation des ovoproduits pasteurisés, les espèces *E. faecalis* et *E. faecium* représentaient respectivement 67% et 27 % des souches isolées. Il est intéressant de noter que ces souches ont la capacité de résister à un traitement de pasteurisation à 60°C pendant 30 min.

- Métabolisme central

Les différentes espèces du genre *Enterococcus* ont la capacité de métaboliser entre 15 et 30 sucres différents. Toutes les espèces de ce genre partagent la capacité de métaboliser le glucose, le lactose, le fructose, le galactose, le maltose, le mannose, le ribose, le tréhalose, la N-acetyl glucosamine, l'amygdaline, l'arbutine, le cellobiosen, le β -gentiobiose, le β -D méthyle glucopyranoside et la salicine (Schleifer et Kilpper-Bälz 1984b). Contrairement aux bactéries du genre *Streptococcus*, elles ont la capacité d'utiliser d'autres sources de carbone tel que le glycérol, le lactate, le malate, le citrate, les α -cétoacides à chaîne ramifiée et les acides aminés comme l'arginine. Les bactéries du genre *Enterococcus* étant homofermentaires, les produits finaux de leur métabolisme dépendent des conditions de culture. Ainsi, en anaérobiose, le produit principal de leur métabolisme est l'acide lactique, tandis qu'en aérobiose, les produits principaux de leur métabolisme sont l'acétate et le CO₂ (Aguilar-Galvez *et al.* 2012).

Les espèces *E. faecalis* et *E. faecium* ont la capacité en aérobiose de cataboliser le glucose via les voies d'Embden-Meyerhof, de Doudoroff ou des pentoses phosphates. En anaérobiose, la voie majeure se trouve être la voie d'Embden-Meyerhof, conduisant à la formation de lactate comme principal produit final du métabolisme. Dans le cas de l'espèce *E. faecium*, la fermentation conduit aussi à la production de quantités non négligeables d'acétate, de formiate et d'éthanol. Les deux espèces ont la capacité de fermenter le pyruvate en conditions aéro ou anaérobies. La fermentation du glycérol ne peut cependant être réalisée qu'en anaérobiose (sauf pour *E. faecalis*, seule espèce du genre qui a la capacité de la réaliser également en conditions d'aérobiose). *E. faecalis* est également la seule espèce du genre à avoir la capacité d'utiliser certains acides aminés (arginine, sérine) comme source d'énergie pour la croissance. Cependant certaines espèces du groupe *Enterococcus* ont également le pouvoir de dégrader l'arginine, la tyrosine et la phenylalanine (Leblanc 2006a). D'autres travaux de la littérature ont mis en évidence la capacité des bactéries de ce genre à métaboliser le citrate (Moreno *et al.* 2006). Ce substrat étant fortement oxydé, et aucun équivalent réducteur (comme le NADH) n'étant produit au cours de son catabolisme, sa consommation par les bactéries engendre la formation de produits autres que l'acide lactique, tels que le diacétyl, l'acétaldéhyde, l'acétoïne et le 2,3-butanediol qui sont connus pour leur rôle dans l'aromatisation des fromages (Hugenholtz, Perdon, et Abee 1993).

- Activités enzymatiques

Les bactéries du genre *Enterococcus* produisent trois types d'enzymes participant à leur pouvoir pathogène opportuniste : une hyaluronidase, une gélatinase et une sérine protéase (Jett, Huycke, et Gilmore 1994). Elles participent également au développement de l'arôme de matrices alimentaires comme les fromages de par leurs activités protéolytiques et lipolytiques et leur capacité à

produire des acides gras volatils ou à longue chaîne, de l'acétoïne, du diacétyle et d'autres composés volatils (Jan *et al.* 2018).

Les activités protéolytiques des bactéries du genre *Enterococcus* sont moins bien décrites dans la littérature que celles des bactéries lactiques. Elles sont plutôt faibles dans les produits laitiers, sauf pour quelques souches d'*E. faecalis* (Sarantinopoulos *et al.* 2001). Les activités protéolytiques des souches d'*E. faecalis* semblent bien supérieures à celles des souches d'*E. faecium* à la fois dans les ovoproduits (Miller *et al.* 2010) et dans d'autres matrices alimentaires comme le lait (Villani et Coppola 1994). Les activités protéolytiques peuvent également mener à la formation d'amines biogènes à partir des acides aminés libres (Ogier et Serror 2008; Benkerroum 2016). Ainsi l'histidine, la tyrosine, la phénylalanine, la lysine et l'ornithine peuvent être transformées en histamine, tyramine, phenyléthylamine, cadavérine et putrescine par des réactions de décarboxylation. Dans l'étude de Wessels *et al.* (1990), plus de la moitié des souches psychrotrophes d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* (isolées de produits laitiers) présentaient une activité protéolytique à faible température.

Certaines souches d'*E. faecalis* et *E. faecium* présentent des activités estérases (LUND 1965). Les souches du genre *Enterococcus* semblent plus actives sur les triglycérides que les souches du genre *Streptococcus*, et les vitesses d'hydrolyse semblent diminuer avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras libérés (Dovat *et al.* 1970). Les espèces et souches du genre *Enterococcus* présentent une grande hétérogénéité d'activités lipolytiques dans les matrices alimentaires comme le lait, allant d'une activité nulle à une large gamme d'activités en termes d'acides gras hydrolysables (Carrasco de Mendoza *et al.* 1992). Les travaux de Miller *et al.* (2010) mettent en évidence des activités lipolytiques exprimées par des souches d'*E. faecium* et *E. faecalis* isolées d'EL altérés. Dans les travaux de Techer *et al.* (2015), la moitié des souches du genre *Enterococcus* testées (issues de blancs d'œufs industriels) ont présenté des activités lipasiques détectables lors de l'altération d'une crème anglaise.

o Régulation de l'expression des activités hydrolytiques

La régulation de l'activité hydrolytique des bactéries du genre *Enterococcus* peut également être séparée en deux types de facteurs : les facteurs bactériens et les facteurs environnementaux. Des informations plus détaillées sur le fonctionnement des systèmes de régulation de l'activité hydrolytique des bactéries du genre *Enterococcus* sont disponibles dans les travaux de Jan *et al.* (2018).

▪ Facteurs bactériens

La production de cytolysine, gélatinase et sérine protéase est régulée par un mécanisme de quorum sensing dit à deux composants (gelE et sprE). La transcription de ces gènes est régulée par le système « lucos Faecal Streptococci Regulator (Fsr) (Sifri *et al.* 2002). Les bases génétiques de la

régulation de la production d'amines biogènes chez les bactéries du genre *Enterococcus* sont complexes et en dehors du cadre de ce manuscrit, des informations plus détaillées sur ce point sont disponibles dans la littérature (Driessen, Smid, et Konings 1988; Suárez *et al.* 2013; Ladero *et al.* 2012).

- Facteurs environnementaux

Les bactéries du genre *Enterococcus* ont la capacité de survivre à de nombreux stress (Van den Berghe *et al.* 2006). Elles présentent un caractère thermorésistant dépendant de l'ampleur du choc thermique et du stade physiologique de croissance au moment où le stress est appliqué (Martinez *et al.* 2003). Cette thermorésistance peut s'expliquer par la composition variable en lipides de leur membrane, leur stabilité membranaire étant plus forte à la température minimale de croissance. Ce mécanisme est propre aux bactéries du genre *Enterococcus*. A des températures plus élevées, la proportion en acides gras insaturés diminue et la teneur en acides gras membranaires augmente (Ivanov *et al.* 1999). Le pH a également un effet important sur le métabolisme de ces bactéries, plus particulièrement sur le catabolisme du citrate (Campbell et Gunsalus 1944).

La production d'amines biogènes dans les matrices alimentaires dépend de nombreux facteurs : disponibilité des précurseurs et des coenzymes (Edwards et Sandine 1981), pH, température, concentration en sels, a_w (Gardini *et al.* 2016).

3.2.3 Rôle du Quorum Sensing dans les phénomènes d'altération

Le Quorum Sensing (QS) est un des mécanismes à la base de la communication bactérienne intra et inter-espèces. Cette capacité de communication permet notamment aux populations bactériennes de coordonner leurs activités métaboliques de survie. Le quorum sensing fonctionne sur le principe de la sécrétion et de la reconnaissance de petites molécules signal dont la concentration augmente en même temps que la population bactérienne. Une fois un seuil critique atteint, il permet l'activation d'une enzyme cible ou la modulation d'un régulateur. Ce mécanisme permet de fournir une réponse coordonnée à un stimulus au bénéfice de l'ensemble de la population bactérienne (Jan *et al.* 2018).

Quatre grands types de molécules de communication sont principalement décrits : les N-Acyl Homosérine Lactones (AHLs ou AI-1)) utilisés par les bactéries à coloration de Gram négative (Papenfort et Bassler 2016), l'AutoInducer-2 (AI-2) produit à la fois par les bactéries à coloration de Gram positive et négative et considéré comme signal universel de communication intra et inter espèces (De Keersmaecker, Sonck, et Vanderleyden 2006), l'AutoInducer-3 (AI-3) spécifique des *E. coli* entérohémorragiques (Reading *et al.* 2007) et les Peptides AutoInducer (AIPs) utilisés par les bactéries à coloration de Gram positive (Lyon et Novick 2004).

Les bactéries des genres *Bacillus* et *Enterococcus* utilisent le QS dans différents buts : produire des peptides antibactériens et exotoxines, pour former des biofilms, etc... (Podbielski et Kreikemeyer 2004).

L'implication du QS est de plus en plus décrite dans le cadre des phénomènes d'altération de produits agro-alimentaires. En effet, les enzymes hydrolytiques sont généralement produites en fin de phase exponentielle, quand la population bactérienne tend vers le Quorum (Rajmohan, Dodd, et Waites 2002; Stepaniak 2004). Différentes enzymes, dont des protéases et lipases impliquées dans l'altération de matrices agroalimentaires, ont été identifiées comme régulées par le QS (Liu et Griffiths 2003 ; Liu, Wang, et Griffiths 2007 ; Riedel *et al.* 2001 ; Whitfield *et al.* 2000). La présence de certaines de ces molécules de signalisation (AI-1 et AI-2) dans des matrices alimentaires altérées est largement décrite dans la littérature (Pinto *et al.* 2007 ; Liu, Gray, et Griffiths 2006 ; Connell *et al.* 2010 ; Pirhonen *et al.* 1993).

3.3 Analyses règlementaires de l'Entier Liquide

Différentes méthodes d'analyses invasives et non invasives existent et sont utilisées pour évaluer l'âge et la fraîcheur des œufs coquilles (œufs non séparés de leur coquille). On peut citer la mesure de la chambre à air qui participe en France au classement des œufs par catégorie (A ou B) et l'unité de Haugh, impliquée dans l'obtention du label rouge en France et comme indice de fraîcheur dans la législation américaine. Cependant, une fois séparé de sa coquille et mélangé, l'ovoproduit ne peut plus être soumis à ces analyses simples et d'autres critères d'hygiène et de sécurité sont appliqués.

Les centres de production d'ovoproduits français sont soumis aux législations françaises et européennes. Les circuits de production sont contrôlés et soumis à un agrément en fonction du type de production (œuf liquide, ovoproduit transformé, ...). Les installations de production sont conçues pour limiter les risques de contamination (nettoyage, désinfection, séparation des opérations listées dans le règlement (CE) n°853/2004, annexe III, section X, chapitre II - point I). Les opérations de production telles que la pasteurisation sont contrôlées par le producteur mais ce dernier est soumis à une obligation de résultats quant à la qualité hygiénique des produits finis (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt 2017). La mise sur le marché d'ovoproduits est également précédée de contrôles servant à vérifier l'état de fraîcheur des produits aussi bien sur le plan physico-chimique que microbiologique.

Les critères règlementaires listés ci-dessous sont extraits des textes référencés dans le « Vademecum sectoriel production d'ovoproduits et d'œufs liquides (Version 2.0, Février 2017) » (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt 2017) disponibles sur le site du ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. Ce sont principalement des textes issus des

règlements (CE) n° 2073/2005 (« Règlement (CE) n° 2073-2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires », s. d.), (CE) n° 853-2004 (« Règlement (CE) n° 853-2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale », s. d.) et de la norme CEE-ONU EGG-2 - Édition 2010 (« NORME CEE-ONU EGG-2 concernant la certification et le contrôle de la qualité commerciale des OVOPRODUITS - ÉDITION 2010 », s. d.).

3.3.1 Critères physico-chimiques

Certaines spécifications sont fournies par la législation afin de veiller à la qualité des matières premières utilisées et des produits commercialisés. Le règlement (CE) 853-2004 présente des spécifications analytiques que doivent respecter les ovoproduits pour le marché européen :

- La concentration en acide 3-hydroxy-butyrique ne doit pas dépasser 10 mg/kg de matière sèche d'ovoproduit non modifié.
- La teneur en acide lactique de la matière première utilisée pour fabriquer les ovoproduits ne doit pas excéder 1 g/kg de matière sèche.
- La quantité de résidus de coquilles, de membranes d'œufs et d'autres particules éventuelles dans l'ovoproduit transformé ne doit pas dépasser 100 mg/kg d'ovoproduit.

La norme CEE-ONU EGG-2 spécifie quant à elle que les ovoproduits obtenus au moyen de techniques classiques et sans avoir recours à des procédés spéciaux visant à modifier les propriétés et/ou la composition du produit doivent satisfaire à un certain nombre de prescriptions listées dans le Tableau 13 qui sont en partie redondantes avec celles du règlement (CE) 853-2004 (« Règlement (CE) n° 853-2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale », s. d.).

Tableau 13. Indicateurs physiques et chimiques des ovoproduits classiques

	Produit						
	Œuf entier		Jaune d'œuf		Blanc d'œuf		
	Liquide et congelé	Séché ⁸	Liquide et congelé	séché	liquide et congelé	séché	
						Séché en plateau	Séché par pulvérisation
Teneur minimale en éléments solides (% de poids sec)	22	95	40	95	10,5	84	92
Teneur minimale en matières grasses (% de poids sec)	9,8	39	25	55	0,05	0,05	
Teneur minimale en protéines (% de poids sec)	10,5	45	15	33	10	71	75
Corps étrangers	Aucune particule de plus de 1mm dans 100g et 100mg*kg au maximum	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem
Concentration minimale en ions hydrogène (pH)	7	7,5	5,9	6	8,5	4	
Quantité maximale d'acide bêta-hydroxybutyrique ⁹ (mg/kg)	10	10	10	10	10	10	
Quantité maximale d'acide lactique (mg/kg)	1000	-	1000	-	1000	-	
Quantité maximale d'acide succinique ¹⁰ (mg/kg)	25	-	25	-	25	-	

⁸ Dans le cas des ovoproduits séchés, on calcule le rapport de poids des matières grasses et du blanc d'œuf sous forme d'éléments solides.

⁹ L'acide lactique (utilisé seulement pour le traitement), l'acide succinique et l'acide bêta-hydroxybutyrique sont considérés comme des éléments solides. Le poids maximal des coquilles, membranes d'œuf et autres particules présentes dans les ovoproduits est de 100 mg/kg d'ovoproduit.

[Il peut être nécessaire d'exprimer la teneur en éléments solides sous forme de teneur en matières sèches. Les éléments solides pourraient être interprétés comme étant le résidu de la filtration des œufs liquides. Lorsque l'on déshydrate simplement les œufs liquides, le résidu sec sera de la matière sèche. Comme les œufs liquides ne comportent aucun élément solide en suspension, ces œufs liquides qui auraient été séchés devraient être indiqués comme étant de la matière sèche.]

¹⁰ La limite de l'acide succinique doit être indiquée afin d'empêcher que les rejets des couvoirs ne soient utilisés dans les ovoproduits de qualité alimentaire pour l'industrie alimentaire; il s'agit là d'un paramètre de qualité

3.3.2 Critères microbiologiques

Le règlement (CE) 853-2004 indique clairement que les exploitants du secteur alimentaire doivent veiller à ce que toutes les opérations soient effectuées de manière à éviter toute contamination pendant la production, la manipulation et l'entreposage des ovoproduits et fournit un certain nombre de consignes et protocoles afin d'assurer la bonne qualité hygiénique des produits.

En plus de ces précautions et de l'étape de pasteurisation à laquelle sont soumis les ovoproduits entiers liquides, des analyses microbiologiques sont effectuées sur chaque lot de produit afin de garantir le respect de certaines spécifications, dont l'absence de bactéries du genre *Salmonella* dans 25g de produit (Tableau 14) et la présence d'*Enterobacteriaceae* à un niveau inférieur à un seuil prédéfini (Tableau 15).

Tableau 14. Critères de sécurité des denrées alimentaires

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes/toxines, métabolites	Plans d'échantillonnage ¹¹		Limites		Méthode d'analyse de référence ¹²	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
1.14 Ovoproduits, excepté les produits dont le procédé de fabrication ou la composition permettent de supprimer le risque salmonelles	Salmonella	5	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

(Critères de sécurité des denrées alimentaires – Règlement (CE) n°2073-2005 – Annexe III, chapitre 1.14)

¹¹ n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs comprises entre m et M

¹² Il y a lieu d'utiliser l'édition la plus récente de la norme

Tableau 15. Critères d'hygiène des procédés – Ovoproduits

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage ¹³		Limites ¹⁴		Méthode d'analyse de référence ¹⁵	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.3 Ovo-produits	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	10 ufc/g ou ml	100 ufc/g ou ml	ISO 21528-2	Fin du procédé de fabrication	Contrôle de l'efficacité du traitement thermique et de la prévention de la recontamination

Les résultats des analyses révèlent la qualité microbiologique du procédé contrôlé.

Entérobactéries dans les ovoproduits :

- qualité satisfaisante lorsque toutes les valeurs observées sont $\leq m$,
- qualité acceptable lorsqu'un maximum de c/n valeurs se situe entre m et M, et que le reste des valeurs observées est $\leq m$,
- qualité insatisfaisante lorsqu'une ou plusieurs valeurs observées sont $> M$ ou lorsque plus de c/n valeurs se situent entre m et M.

(Critères d'hygiène des procédés – Ovoproduits - Règlement (CE) n°2073-2005 – Annexe III, chapitre 2.3)

3.3.3 Limitations des analyses actuelles et importance de trouver des approches complémentaires

Les critères listés dans les parties 3.3.1 et 3.3.2 permettent de se prémunir de l'utilisation de matières premières très contaminées ou présentant un facteur de risque spécifique (œufs rejetés d'incubateurs). Ils assurent également la protection contre certains germes spécifiques présentant un risque pour la santé publique (*Salmonella*). Cependant, les analyses actuelles n'assurent pas l'évaluation de l'état de fraîcheur d'un produit, ni l'optimisation de sa durée optimale de conservation ou la détection des risques d'altération microbiologique des produits au cours de leur stockage. La responsabilité de l'industriel étant souvent engagée par la législation qui lui impose plus d'obligations de résultats que de moyens, les producteurs se voient dans l'obligation non contractuelle d'effectuer en plus des contrôles réglementaires un certain nombre d'analyses supplémentaires, dont le

¹³ n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs comprises entre m et M

¹⁴ Les limites indiquées s'appliquent à chaque unité d'échantillon analysé.

¹⁵ Il convient d'utiliser l'édition la plus récente de la norme.

dénombrement de la flore totale sur milieu PCA, la recherche de bactéries du genre *Listeria* ou encore le dénombrement des *Bacillus* Nau *et al.* (2010).

Ces approches microbiologiques ont été complétées ces dernières années par des approches physico-chimiques permettant l'identification de marqueurs de la dégradation des ovoproduits au cours de leur procédé de fabrication et du stockage. Certains de ces marqueurs sont peu utilisés en raison de leur thermolabilité ou de leur variabilité naturelle dans la matière première (uridine, acide pyroglutamique) et d'autres car les méthodes proposées dans la littérature pour leur détection et leur quantification présentent des contraintes trop limitantes (Tableau 16). Même si certains d'entre eux comme la furosine (Rossi *et al.* 2013) présentent un potentiel intéressant, aucun n'est actuellement utilisé en routine pour l'analyse de la fraîcheur et de l'altération des EL. Moins de procédés sont aujourd'hui utilisables pour l'analyse de la fraîcheur et la détection de l'altération des ovoproduits liquides que pour celle des œufs coquille, certaines de ces techniques n'étant pas utilisables une fois cassé et mélangé. Le Tableau 16 présente les différentes méthodes référencées dans la littérature pour la détection de l'altération d'ovoproduits entiers liquides (EL).

Tableau 16. Liste des méthodes disponibles pour la détection ou la prédiction de l'altération d'ovoproduits entiers liquides ((Jan *et al.* 2018), compilé depuis différentes sources : Alamprese 2004; Brown *et al.* 1986; Correa *et al.* 2008; Hidalgo *et al.* 2008; Hidalgo *et al.* 2004; Postollec *et al.* 2010; Riva *et al.* 2001.

Méthodes	Critère d'altération/ ovoproduit testé	Avantages	Désavantages
Analyse de l'odeur	Légèrement acide; putride/ Entier liquide, blanc, jaune	Sensible, rapide	requiert des experts, onéreux
Chromatographie Gazeuse – Spectrométrie de Masse	Dimethylsulfide (DMS)/ Entier liquide, blanc, jaune	sensible	fortes contraintes techniques
Chromatographie Liquide Haute Performance	Uracile, acide lactique et acide acétique / Entier liquide	rapide	peu sensible
Kit enzymatique	Acide 3-hydroxybutyric, acide succinique, acide lactique, uracile/ Entier liquide et pâtes fraîches	rapide	faible rendement d'extraction, peu sensible

Les analyses réglementaires assurent la sécurité alimentaire et la qualité des produits utilisés mais ne permettent pas de détecter et/ou d'éviter l'altération des EL. L'analyse des nombreux marqueurs potentiels d'altération identifiés dans la littérature pourrait aujourd'hui compléter les approches existantes et permettre de mieux évaluer la qualité de ces produits, ainsi que leur stade potentiel d'altération, évitant ainsi les pertes de produits liées aux contaminations microbiologiques.

Un récapitulatif de ces marqueurs identifiés et des marqueurs potentiels est présenté dans la partie suivante.

3.4 Marqueurs d'altération identifiés

3.4.1 Approche physico-chimique

Le Tableau 17 présente la liste des marqueurs d'altération confirmés ou potentiels des ovoproduits, présentés dans la littérature et identifiés dans le cadre de l'approche physico-chimique de l'altération.

Tableau 17. Marqueurs d'altération des EL potentiels (en bleu) et confirmés (en noir), identifiés dans la bibliographie. Les marqueurs sont classés par catégories (biotiques et abiotiques) dans le tableau de gauche et par famille chimique dans le tableau de droite. Les cases grisées correspondent aux marqueurs dont l'analyse est aujourd'hui comprise dans les critères législatifs relatifs à la production (matières premières), la transformation ou la mise sur le marché des ovoproduits.

Témoins de la dégradation bactérienne	Acides organiques
Acide lactique [117]–[119]	Acide lactique [117]–[119]
Acide succinique [117]–[119]	Acide succinique [117]–[119]
Acide acétique [117]–[119]	Acide Hydroxybutyrique [117], [120]–[123]
Uracile [118], [124], [125]	Acide acétique [117]–[119]
Glucose [131]	Bases pyrimidiques
Autoinducer-2 [134]	Uracile [118], [124], [125]
AHL [135]	Acides aminés
Acides gras bactériens [140]–[142]	Acide pyroglutamique [126], [127]
Acide Hydroxybutyrique [117], [120]–[123]	Lysine [128]–[130]
Témoins de la dégradation physico-chimique	Composés des réactions de Maillard
Acide pyroglutamique [126], [127]	Furosine [128]–[130]
Lysine [128]–[130]	Sucres réducteurs
Furosine [128]–[130]	Glucose [131], [132], [133]
Glucose [132], [133]	Molécules du Quorum Sensing
Cholestérol & COP's [132], [136], [137]	Autoinducer-2 [134]
Tocophérol [132], [138], [139]	AHL [135]
Rétinol [132], [138], [139]	Lipides & lipides oxydés
	Cholestérol & COP's [132], [136], [137]
	Vitamines
	Tocophérol [132], [138], [139]
	Rétinol [132], [138], [139]
	Autres composés
	Acides gras bactériens [140]–[142]

3.4.2 Approche microbiologique

3.4.2.1 Composés volatils

Le Tableau 18 présente la liste des marqueurs d'altération volatils potentiels des ovoproduits, présentés dans la littérature et identifiés dans le cadre de l'approche microbiologique de l'altération. Les molécules présentées ici sont déjà décrites dans la littérature comme potentiellement produites par des bactéries du genre *Enterococcus* et/ou des bactéries du groupe *B.cereus*. Les références citées correspondent à d'autres matrices alimentaires, la littérature sur l'altération des ovoproduits étant peu abondante.

Tableau 18. Marqueurs d'altération des EL potentiels, identifiés dans la bibliographie pour les bactéries du genre *Enterococcus* et du groupe *B.cereus*. Les marqueurs sont classés par type de catabolisme (sucres ou acides aminés), le type de matrice alimentaire étudié dans les travaux cités est précisé (données d'après Jan *et al.* 2018).

	Enterococcus sp.	Groupe B. cereus
Issus du catabolisme des sucres		
3-hydroxybutanone (acétoïne)	Viande fermentée (Latorre-Moratalla <i>et al.</i> 2011)	Milieu de culture: (Kominék et Halvorson 1965)
	Fromage: (Nieto-Arribas <i>et al.</i> 2011; Stelios <i>et al.</i> 2009; Randazzo <i>et al.</i> 2007)	
2,3-butanedione (diacétyl)	Fromage: (Nieto-Arribas <i>et al.</i> 2011; Stelios <i>et al.</i> 2009; Randazzo <i>et al.</i> 2007)	-
Acide acétique	Viande fermentée: (Latorre-Moratalla <i>et al.</i> 2011)	Milieu de culture (Rosenfeld <i>et al.</i> 2005; Duport <i>et al.</i> 2006)
	Fromage: (Stelios <i>et al.</i> 2009)	
1-hexanol	Viande fermentée: (Latorre-Moratalla <i>et al.</i> 2011)	(Casaburi <i>et al.</i> 2015)
	Fromage: (Randazzo <i>et al.</i> 2007)	
Acide hexanoïque	Fromage: (Stelios <i>et al.</i> 2009)	-
Acide butanoïque	Fromage: (Randazzo <i>et al.</i> 2007)	-
2-butanone	Viande fermentée: (Latorre-Moratalla <i>et al.</i> 2011)	-
2-heptanol	Viande fermentée: (Latorre-Moratalla <i>et al.</i> 2011)	Viande fermentée: (Casaburi <i>et al.</i> 2015)
Issus du catabolisme des acides aminés		
2-méthylpropanol	Milieu de culture: (Tavaria <i>et al.</i> 2002)	-
3-méthylbutanal	Viande fermentée: (Latorre-Moratalla <i>et al.</i> 2011)	-
	Fromage: (Stelios <i>et al.</i> 2009)	
Disulfure de diméthyle	Viande fermentée: (Latorre-Moratalla <i>et al.</i> 2011)	Viande fermentée: (Huang <i>et al.</i> 2012) Milieu de culture : (Huang <i>et al.</i> 2012)

Benzaldéhyde	Viande fermentée: (Latorre-Moratalla <i>et al.</i> 2011) Milieu de culture: (Tavaria <i>et al.</i> 2002)	-
Trisulfure de diméthyle	Milieu de culture: (Tavaria <i>et al.</i> 2002)	-
Propanoate d'éthyle	Fromage: (Stelios <i>et al.</i> 2009; Randazzo <i>et al.</i> 2007)	-
Butanoate d'éthyle	Fromage: (Stelios <i>et al.</i> 2009; Randazzo <i>et al.</i> 2007)	-

Les acides organiques produits par le métabolisme bactérien viennent s'ajouter à la liste des marqueurs potentiels d'altération. Certains sont déjà employés pour évaluer la qualité microbiologique des EL tels que les acides lactique et succinique. D'autres comme les acides acétique et formique et certains produits finaux du métabolisme tel que l'éthanol sont également des composés d'intérêt dans le cadre de l'étude de l'altération microbiologique des EL.

3.4.3 Vers l'identification et la quantification des marqueurs d'altération

Les marqueurs d'altération identifiés dans la littérature présentent une grande variabilité en termes de structures et de propriétés chimiques. L'objectif de ce projet étant d'identifier les voies métaboliques de l'altération microbiologique des EL et de mettre en évidence des marqueurs précoces de cette altération, l'approche analytique employée devra caractériser le plus exhaustivement possible les familles et les espèces chimiques potentiellement impliquées dans ces phénomènes. Cette approche devra en plus permettre d'identifier de nouveaux composés qui n'étaient pas connus comme impliqués dans l'altération des EL. La partie suivante présente de façon générale l'approche analytique (issue de la métabolomique) qui sera employée dans le cadre de ce projet.

4 Approche métabolomique

L'œuf entier est une matrice complexe, principalement composée d'eau, de protéines et de lipides. Il contient également des carbohydrates, vitamines, minéraux et de nombreux autres composés en concentration variable. Cette complexité chimique le rend difficile à analyser et la majeure partie des protocoles concerne essentiellement les fractions « blanc d'œuf » et « jaune d'œuf » laissant de côté l'œuf entier. L'état de qualité hygiénique et de fraîcheur des œufs peut être évalué selon des critères physico-chimiques ou microbiologiques, imposés par les réglementations en vigueur. Les états fournissent des procédures et recommandations quant à la production et la commercialisation de ce type de produits. Les critères et procédures varient selon les régions. Ainsi la législation européenne interdit par exemple le cassage des œufs par centrifugation pour les œufs destinés à l'industrie agroalimentaire alors que la législation américaine prévoit la possibilité de casser les œufs par

centrifugation si ces derniers sont propres, désinfectés, intacts et amenés à terme à subir un traitement thermique (cuisson au four, ...). En plus des procédures et recommandations concernant le procédé de production, la qualité hygiénique des ovoproduits est contrôlée par des critères physico-chimiques et microbiologiques sur les matières premières utilisées et des produits finis (3.3).

Au-delà de ces aspects réglementaires portant sur les spécifications requises pour la mise sur le marché, l'altération des ovoproduits au cours de leurs procédés de fabrication et de leur stockage est un champ d'étude en soi. Et même si différents marqueurs potentiels de la qualité hygiénique ou de la fraîcheur des ovoproduits ont été proposés au cours des dernières décennies, ni ces derniers, ni les spécifications analytiques issues de la réglementation ne sont aujourd'hui utilisables en routine pour la détection ou l'étude de l'altération des ovoproduits entiers liquides (EL). L'altération des EL n'est donc actuellement pas caractérisée par des analyses spécifiques. L'altération ne peut être que constatée en production où elle provoque parfois une dégradation des propriétés organoleptiques des produits (couleur, odeur, texture, etc.) ainsi que des modifications de leurs caractéristiques physico-chimiques (pH, viscosité, etc.). Les approches analytiques issues des normes de contrôle réglementaires et certaines plus récemment développées pour la caractérisation de la qualité des entiers liquides sont parfois exploitées pour l'étude de l'altération, mais trop peu d'approches sont développées spécifiquement en ce sens. De plus ces techniques sont souvent longues et coûteuses, nécessitant parfois des équipements spécifiques et sont très limitées puisque désignées pour une cible donnée.

Certaines approches rapides issues des dernières avancées techniques en chimie analytique pourraient se substituer en partie aux méthodes classiques de contrôle en routine de la qualité des EL, et surtout les compléter dans le cadre de l'étude de l'altération. Ces approches hautement résolutes issues des sciences « omiques » permettraient de rendre compte plus exhaustivement de l'état de la matrice ovoproduit, puisqu'elles sont capables d'analyser fidèlement plusieurs milliers de composés en une seule fois. C'est le cas notamment des approches issues de la métabolomique. Le terme « métabolomique » a été introduit en 1999 par J. Nicholson au Royaume-Uni, puis par O. Fiehn en 2001 comme étant « la mesure quantitative dynamique des réponses métaboliques multiparamétriques d'un système vivant à des stimuli physiopathologiques ou à des modifications génétiques » (Zhao et Lin 2014). Comme la transcriptomique et la protéomique, la métabolomique fait partie des disciplines liées à la post-génomique.

L'objectif de la métabolomique est l'étude du métabolome. Celui-ci représente l'ensemble des métabolites présents au sein d'un système biologique : organisme, cellule, tissu et fluide biologique (plasma, urine). Les métabolites sont des molécules organiques ayant un poids moléculaire inférieur à 1000 Da tels que les acides aminés, les acides organiques, les oses et les petits peptides. Les acides nucléiques et les protéines ne font pas partie des métabolites en raison de leurs poids moléculaires trop élevés. Les métabolites étant les produits finaux de la machinerie enzymatique cellulaire, ils peuvent

être considérés comme la réponse ultime aux variations génétiques et/ou environnementales d'un système biologique (Fiehn 2002). Cependant, l'analyse du métabolome n'est pas simple à mettre en place puisqu'il faut tenter de prendre en compte toute sa complexité. Le nombre de métabolites répertoriés chez les organismes vivants est estimé à plus de 50 000.

Différents types d'approches métabolomiques peuvent être suggérées pour la caractérisation du métabolome d'un organisme (Fiehn 2002):

- La métabolomique ciblée (~ 10 métabolites)
- Le profilage métabolique (~100 métabolites)
- La métabolomique (~1000 métabolites)
- L'empreinte métabolique (>1000 métabolites)

L'analyse ciblée de métabolites peut être définie comme une analyse détaillée, centrée sur un ou un petit nombre de métabolites d'une voie métabolique déterminée, pouvant nécessiter une fragmentation de l'échantillon afin d'éviter les interférences induites par d'autres composés le constituant. C'est une approche quantitative.

Le profilage métabolique est défini de la même manière que précédemment, consistant à identifier et à quantifier un nombre restreint de métabolites sauf qu'à l'inverse de la métabolomique ciblée, les composés peuvent appartenir à différentes voies métaboliques ; ils sont également plus nombreux. La préparation de l'échantillon se focalise sur les propriétés chimiques des composés recherchés afin de limiter les effets de matrice.

La métabolomique correspond à l'identification et la quantification du plus grand nombre de composés possibles dans l'échantillon. Les méthodes d'annotation et d'identification utilisées sont généralement automatisées. Les informations obtenues sont plus exhaustives mais moins précises que dans le cadre du profilage ou de l'analyse ciblée.

A l'inverse de ces trois approches dont le but est l'identification et la quantification d'un nombre variable de métabolites avec précision, l'objectif de la prise d'empreinte métabolique est la comparaison de profils métaboliques issus de deux conditions expérimentales pour établir des signatures propres au phénomène étudié (Kopka *et al.* 2004). C'est l'étude de manière non ciblée d'un grand nombre de métabolites qui ne sont donc pas quantifiés de manière absolue. On parle ici de quantification relative.

L'avantage de la métabolomique dite « ciblée » par rapport à la métabolomique « non ciblée » est l'obtention simplifiée d'une quantification précise. Son principal inconvénient est sa « limitation en terme d'ampleur de l'analyse » (Yi *et al.* 2016).

Pour pouvoir appliquer une approche de type profilage métabolique à l'étude de l'altération des EL, il est nécessaire de maîtriser, en plus des conditions de culture de l'organisme ou des organismes utilisés pour reproduire l'altération microbiologique, toutes les étapes de préparation d'échantillon, à savoir le mode de préparation et d'échantillonnage des EL, le prétraitement des échantillons et l'extraction des métabolites en fonction des techniques employées (déprotéination, séchage, fractionnement, ajout d'un étalon interne,...). Le choix de la technique analytique est également important puisqu'elle doit permettre d'estimer sans a priori la diversité de l'empreinte métabolique. L'analyse des données brutes et l'exploitation des résultats constituent également des étapes sensibles puisque les résultats obtenus sont nettement influencés par les techniques employées, ou la qualité des banques de données utilisées pour l'annotation. Toutes ces opérations clés doivent être maîtrisées afin d'éviter l'accumulation de biais pendant les opérations de traitement des données.

En métabolomique, les techniques les plus couramment utilisées sont la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) en raison de leur haut pouvoir résolutif. Cependant, une analyse moins résolutive, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) peut être envisagée (Figure 16). Même si cette technique présente une performance moindre, elle est néanmoins robuste et facile d'accès, ce qui permet, malgré tout, de quantifier une grande partie des composés et donc d'envisager une meilleure compréhension des phénomènes de redirection des flux de carbone.

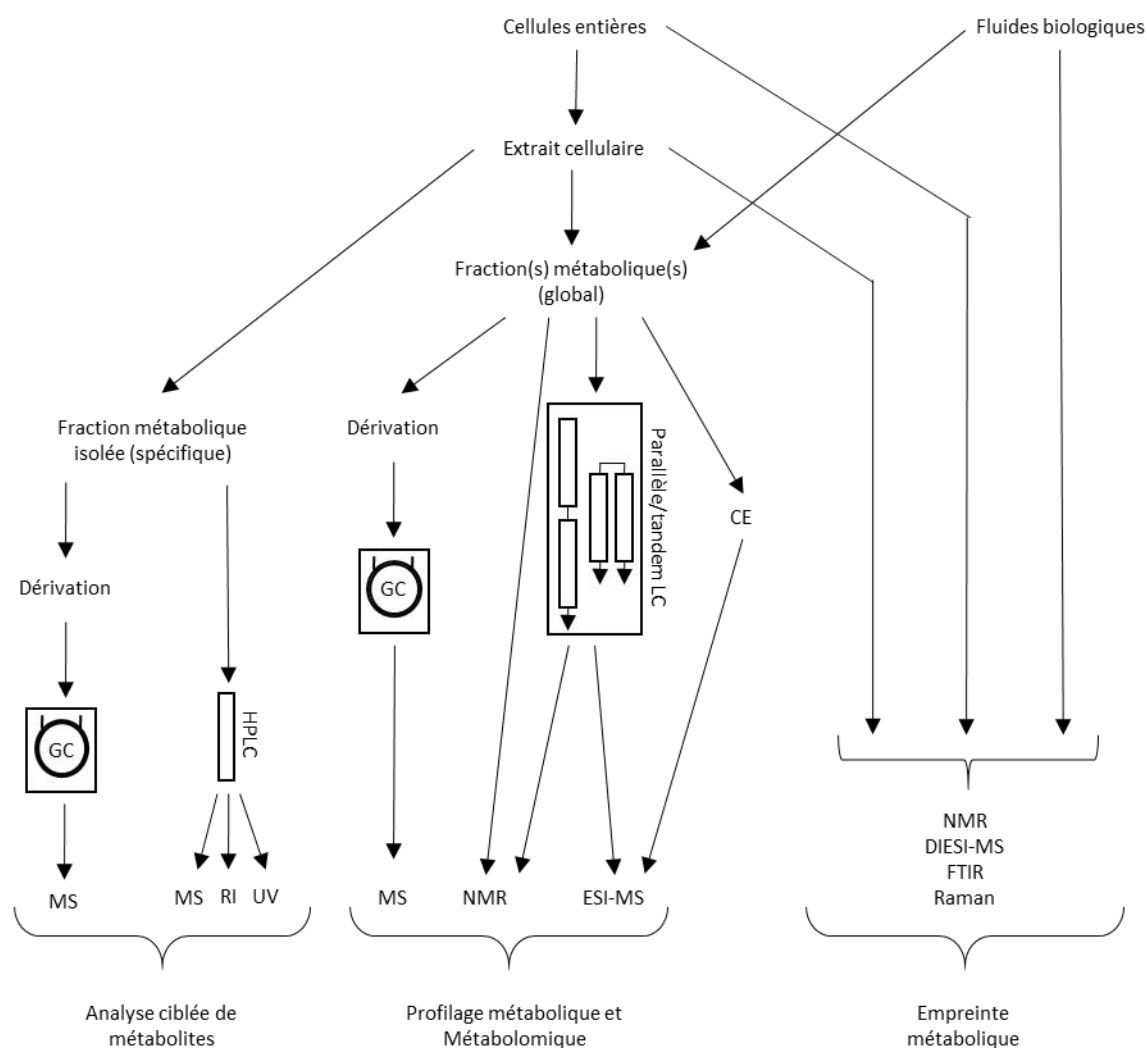


Figure 16. Techniques de métabolomique : technologies utilisées en fonction des approches et des échantillons (Inspiré par les travaux de Dunn et Ellis 2005).

4.1 Prétraitements des échantillons

Les techniques de métabolomique peuvent être, en fonction de la complexité des échantillons à analyser, employées directement sur un prélèvement ou sur une fraction métabolique spécifique de ce dernier. Dans le cas de l'analyse des ovoproduits, différentes étapes de préparation sont nécessaires en amont de l'analyse si des techniques hautement résolutes (MS, RMN,...) sont employées.

En effet la matrice ovoproduit étant principalement composée d'eau et de macromolécules (protéines), une étape de déprotéination doit être ajoutée afin de limiter l'encrassement du système (GC/LC-MS) et la perturbation de la mesure, rendant souvent inaccessible le signal des métabolites (RMN). Une étape de séparation dans un mélange ternaire de solvant organique peut également être employée afin de préparer distinctement des fractions métaboliques polaires et apolaires. Ces fractions, d'une complexité moindre, sont plus simples à analyser, ce qui peut permettre d'augmenter

la résolution de l'analyse en réduisant l'occurrence de problèmes tels que la co-élution ou le masquage des signaux faibles par un composé majoritaire.

4.1.1 Déprotéination des échantillons

La déprotéination des échantillons est employée pour éliminer ou pour récupérer les protéines d'un échantillon. Elle repose généralement sur des méthodes de précipitations partielles ou totales ou de filtration en fonction du but recherché. L'objectif, dans le cadre de ce projet, étant d'éliminer les protéines des échantillons, et les méthodes de filtration n'étant que difficilement applicables à une matrice aussi riche en protéines que l'œuf, les méthodes de précipitations totales semblent les plus adaptées. Les méthodes les plus courantes pour la précipitation totale des protéines utilisent des acides ou des solvants organiques permettant de limiter la solubilité des protéines et ainsi les faire précipiter. Les échantillons sont ensuite centrifugés et les culots de protéines formés, récupérés et rincés afin d'être remis en solution, ou éliminés.

Les protéines sont solubles en milieu aqueux principalement en raison de leur charge et du fait que leurs résidus d'acides aminés sont solvatés par l'eau. Le bouleversement de ces interactions protéines-eau (provoqué par un agent précipitant : sel, solvant organique, acide, ...) induit une diminution de la solubilité des protéines en favorisant l'augmentation des interactions protéines-protéines, conduisant à leur précipitation (Boyer 1986). La dénaturation des protéines par les agents précipitants favorise également leur précipitation. En effet, l'organisation des chaînes latérales des acides aminés chargés ou formant des pont hydrogènes avec l'eau (Glu, Asp, Lys, Arg, Ser, Thr, ...) généralement dirigés vers l'extérieur, et des chaînes latérales hydrophobes (Phe, Trp, Tyr), généralement dirigées vers l'intérieur et donc « camouflées », est déstructurée par la dénaturation (modification des structures quaternaire, tertiaire et secondaire des protéines sans casser leur chaîne d'acides aminés). Les groupements hydrophobes ramenés à la surface ont alors tendance à s'agréger entre eux et avec d'autres protéines, formant des complexes protéines-protéines peu solubles et accentuant le phénomène de dénaturation (Gauthier 2009).

4.1.1.1 *Déprotéination en milieu acide*

Les protéines étant majoritairement chargées positivement dans les environnements acides, certains acides (TCA, PCA) peuvent former avec ces dernières des sels insolubles et engendrer leur précipitation. Les échantillons sont ensuite filtrés et injectés tel quels ou neutralisés en fonction de la méthode employée pour l'analyse. Les méthodes de précipitation acide sont très efficaces et largement répandues. Cependant elles ne sont pas adaptées à l'analyse de composés sensibles aux acides. Les techniques de précipitation acide sont parfois complétées par l'utilisation de solvants organiques afin de faciliter la solubilisation des composés potentiellement adsorbés sur les protéines (Hanai 1991).

4.1.1.2 Déprotéination aux solvants organiques

Les solvants les plus couramment utilisés pour la déprotéination sont l'acétone, le méthanol, l'acétonirile, et l'éthanol (Carratù *et al.* 2003 ; Knecht et Chang 1986 ; Agostoni *et al.* 2000). Des mélanges de solvants sont parfois employés pour des applications spécifiques afin de maximiser la solubilité d'un composé ou d'une gamme de composés ciblés (Hanai 1991). L'ajout de ces solvants miscibles à l'eau dans l'échantillon en proportion variable permet de diminuer la solubilité des protéines dans la solution et ainsi de les faire précipiter. Un autre phénomène pouvant également participer à la précipitation des protéines avec des solvants organiques est l'abaissement de la constante diélectrique de la solution (Boyer 1986). Cette méthode de précipitation est très simple à mettre en œuvre, sa principale limitation est la sélectivité du solvant de déprotéination liée à la solubilité des composés à analyser dans ce dernier.

Les méthodes de déprotéination aux solvants organiques pouvant être réalisées à froid (-20°C), ne nécessitant pas d'étapes de neutralisation exothermiques et permettant un séchage plus rapide des surnageants de déprotéination en raison de la forte volatilité des solvants employés, semblent les plus adaptées dans le cadre de ce projet. La limite principale de cette méthode étant liée à la capacité de solubilisation des composés du solvant employé, et cette capacité étant fortement liée à la polarité du solvant, l'utilisation de deux solvants de polarité contrastée (acétone et éthanol) couramment employés pour la déprotéination d'échantillons biologiques sera explorée en parallèle. L'utilisation de ces deux solvants a pour but de maximiser l'exhaustivité de l'analyse en permettant le profilage du plus grand nombre possible de métabolites.

4.1.2 Séparation / Extraction dans un mélange ternaire de solvants organiques

Les mélanges ternaires de solvants organiques sont utilisés en biologie pour l'extraction liquide-liquide et la séparation de fractions métaboliques. L'échantillon est d'abord solubilisé dans un mélange ternaire à l'état monophasique. Les proportions du mélange sont ensuite changées par l'ajout d'un composé afin de provoquer le passage du système à l'état biphasique. Les métabolites en solution dans le mélange initial (monophasique) se répartissent entre les deux phases (polaires et apolaires) en fonction de leur affinité avec ces dernières.

Différents mélanges ternaires peuvent être employés. Le système méthanol / chloroforme / eau ou MCW (Methanol / Chloroform / Water) est couramment employé dans le domaine de la métabolomique, notamment pour le profilage du métabolisme central. Différentes compositions sont possibles pour un même système ternaire. Elles doivent être optimisées en fonction de la matrice et des composés étudiés. Des exemples de mélanges de solvants développés pour des applications spécifiques sont présentés dans le Tableau 19.

Tableau 19. Composition des mélanges MCW référencés dans la littérature et leurs applications spécifiques.

Solvants	Méthanol	Chloroforme	Eau	Application
Proportions	1	1	0,1	Extraction de métabolites de cellules eucaryotes adhérentes (Dettmer <i>et al.</i> 2011)
	4	3	1	Extraction de métabolites d'érythrocytes (Sana et Fischer 2007)
	10	3	1	Extraction de métabolites d'une cyanobactérie (Hasunuma <i>et al.</i> 2013)

La basse température permet de limiter la dégradation des composés les plus fragiles ; le mélange utilisé est donc stocké à -20°C avant utilisation. Une fois l'échantillon sec dissout dans le mélange MCW initial, une quantité donnée d'eau est ajoutée (dépendante de la composition initiale). La modification de la composition du système engendre la formation de deux phases, une phase polaire principalement composée d'eau et de méthanol (et d'une faible proportion de chloroforme) et une phase apolaire principalement composée de méthanol et de chloroforme (et d'une faible proportion d'eau). Les métabolites en solution dans le mélange initial se répartissent alors entre les deux phases en fonction de leur affinité avec ces dernières.

4.2 Principales techniques analytiques employées en métabolomique

Les techniques les plus couramment employées dans le cadre des études métabolomiques sont abordées dans cette partie. Leur application à l'altération des ovoproduits est présentée, des exemples d'application sur d'autres matrices alimentaires sont également proposées lorsqu'aucun exemple d'application à l'étude des ovoproduits n'a été trouvé dans la littérature.

4.2.1 La spectroscopie vibrationnelle

Les techniques de spectroscopie vibrationnelle sont des techniques non invasives n'impliquant pas ou peu de préparation des échantillons et pouvant donc s'appliquer sur matrice entière. Il est également possible de les appliquer sur des extraits de polarité contrastée. Cet avantage est cependant contre-balancé par la résolution ou la sensibilité limitée des techniques menant à une moindre finesse des informations chimiques et biochimiques obtenues.

4.2.1.1 La spectroscopie infrarouge (IR)

- Le rayonnement IR

Le principe de la spectroscopie repose sur l'interaction entre un rayonnement électromagnétique et un échantillon. Elle se traduit par des modifications énergétiques des deux contributeurs du phénomène. Le rayonnement infrarouge a été découvert en 1800 par William

Herschel. Cette composante du rayonnement électromagnétique peut être décrite comme l'association d'un champ magnétique et d'un champ électrique. Ils oscillent perpendiculairement en phase selon une bisinusoidale dans la direction de propagation de l'onde. Le rayonnement infrarouge peut également être décrit comme étant associé à un flux de particules sans masse : les photons. Ces particules transportent une certaine quantité d'énergie appelée quantum dont la valeur est donnée par l'équation

de Bohr :
$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

où $h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s (constante de Planck) et $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ (nombre d'onde en cm^{-1}). Les gammes spectrales utilisées en spectrométrie infrarouge et qui permettent d'identifier les liaisons chimiques correspondant aux groupes fonctionnels de différentes molécules, sont celles du proche et du moyen infrarouge (Tableau 20, Tableau 21). L'infrarouge lointain correspondant à la dernière gamme spectrale de l'IR ne sera pas traité dans ce manuscrit.

Tableau 20. Gamme spectrale du moyen infrarouge

ν	2,5 μm	à	25 μm
Energie E	$7,95 \cdot 10^{-20}$ J soit 0,4965 eV	à	$7,95 \cdot 10^{-21}$ J soit 0,04965 eV
Fréquence ν	$1,2 \cdot 10^{14}$ Hz	à	$1,2 \cdot 10^{13}$ Hz
Nombre d'onde $\bar{\nu}$	4000 cm^{-1}	à	400 cm^{-1}

Tableau 21. Gamme spectrale du proche infrarouge

ν	0,78 μm	à	2,5 μm
Energie E	$1,60 \cdot 10^{-19}$ J soit 1,5895 eV	à	$7,95 \cdot 10^{-20}$ J soit 0,4965 eV
Fréquence ν	$3,8 \cdot 10^{11}$ Hz	à	$1,2 \cdot 10^{14}$ Hz
Nombre d'onde $\bar{\nu}$	12820 cm^{-1}	à	4000 cm^{-1}

- La spectrométrie infrarouge est une spectroscopie de vibration moléculaire

L'énergie totale des molécules peut être représentée comme la somme de trois composantes :

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{elec}} + E_{\text{vibr}} + E_{\text{rot}}$$

E_{elec} : énergie électronique moléculaire associée aux orbitales des électrons périphériques de la molécule (électrons participant à la formation de liaisons covalentes).

E_{vibr} : énergie liée aux vibrations de tous les atomes et liaisons de la molécule.

E_{rot} : énergie de rotation de la molécule autour de son centre de gravité.

En spectrométrie infrarouge, l'augmentation de l'énergie interne de la molécule s'effectue en modifiant l'énergie vibrationnelle E_{vibr} . On s'intéresse donc aux transitions qui ont lieu lorsque la molécule absorbe un rayonnement électromagnétique dans le domaine infrarouge et que l'énergie de celui-ci est égal à l'écart d'énergie entre deux niveaux vibrationnels. Les liaisons chimiques de la molécule vibrent autour de leur position d'équilibre. Si les atomes de la molécule présentent des électronégativités différentes, la molécule formera un dipôle électrique permanent. L'absorption infrarouge correspondra donc à un couplage entre la composante électrique de l'onde électromagnétique et un tel dipôle.

4.2.1.2 *La spectroscopie Moyen InfraRouge (MIR)*

La spectroscopie MIR s'applique couramment à l'analyse de l'humidité, du contenu en protéines, lipides et carbohydrates des produits alimentaires en milieu industriel. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est la technique la plus couramment utilisée. La spectroscopie IRTF permet à la fois des analyses de relations structure-fonction des composés étudiés et leur quantification, faisant de cette technique un outil de référence pour la recherche ainsi que le contrôle qualité dans l'industrie alimentaire (Nawrocka et Lamorsk 2013).

- *Instrumentation.*

Les premiers appareils de mesure dans le moyen infrarouge fonctionnaient sur le principe des spectromètres à distorsion, basés sur le principe de la spectroscopie à transmission. Avec cette technique, l'échantillon est exposé à une radiation IR et un détecteur analyse la fraction des radiations absorbées à des fréquences précises. Un réseau de diffraction est utilisé à la manière d'un prisme afin de séparer les longueurs d'ondes de la lumière en différentes fenêtres spectrales et de les envoyer séparément vers le détecteur à travers une ouverture. Les absorbances à chaque longueur d'ondes peuvent ensuite être analysées une à une en faisant varier la position du réseau de diffraction et de l'ouverture. L'analyse de nombreuses longueurs d'ondes avec ce type d'instrument est fastidieuse, impliquant des temps d'analyses conséquents et limitant ainsi le nombre de lectures pour chaque échantillon. Le développement des ordinateurs et des techniques spectroscopiques basées sur la transformée de Fourier a révolutionné le potentiel de la spectroscopie infrarouge. Dans un appareil IRTF, le principe utilisé est toujours celui de la transmission ; la façon dont le spectre est enregistré est cependant très différente. La spécificité de l'IRTF est liée à l'utilisation d'un interféromètre formé par une source IR, un séparateur de faisceau, deux miroirs et un détecteur (Figure 17).

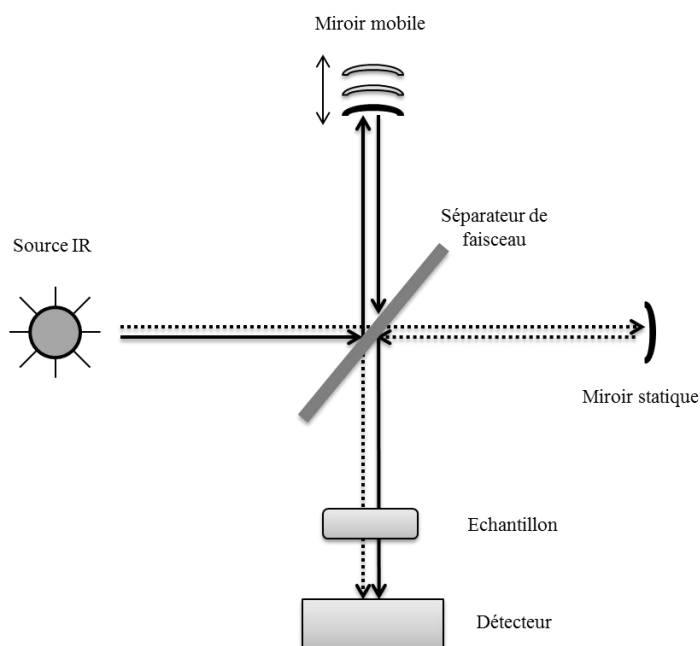


Figure 17. Schéma d'un interféromètre comme utilisé en IRTF (Figure originale dans Blum et John 2012)

Ici le rayonnement IR est séparé puis redirigé vers deux miroirs, un statique et un mobile. Le rayonnement est réfléchi par les miroirs, recombinaé par le séparateur de faisceau puis atteint le détecteur qui mesure les absorbances à toutes les longueurs d'ondes simultanément. Une fois les deux rayons recombinaés par le séparateur de faisceau, ces derniers ayant suivi un chemin de longueur différente, il est possible de mesurer des interférences constructives et destructives qui forment ce que l'on appelle un interférogramme. Les données mesurées par le détecteur correspondent ici à la transformée de Fourier du spectre. On applique donc sur ces données une autre transformée de Fourier afin de reconstruire le spectre IR du produit analysé. Cette technique permet une analyse bien plus rapide des échantillons. De plus, une plus grande quantité d'énergie atteint le détecteur ce qui permet une augmentation du ratio signal sur bruit. La quasi-totalité des spectromètres dédiés à l'étude de la fenêtre spectrale du moyen infrarouge sont aujourd'hui basés sur le principe de l'IRTF (Blum et John 2012).

Indépendamment de l'échelle de résolution des acquisitions, la plupart des bandes que l'on retrouve dans un spectre MIR issu de l'analyse d'un produit alimentaire ont été identifiées et assignées à des modes de vibrations particuliers correspondant à différents groupes chimiques (Karoui, Mazerolles, et Dufour 2003). On retrouve par exemple les bandes d'absorption des amides I (élongation C=O $\approx 1600-1690\text{ cm}^{-1}$), II (élongation C-N et déformation N-H $\approx 1480-1575\text{ cm}^{-1}$) et III (élongation C-N et N-H déformation $\approx 1230-1300\text{ cm}^{-1}$) des protéines, celles des lipides (élongation C-H $\approx 2800-3000\text{ cm}^{-1}$, élongation C-O $\approx 1725-1745\text{ cm}^{-1}$, élongation C-O des triacylglycérides $\approx$

1175 cm^{-1} , déformation C=C-H $\approx 970 \text{ cm}^{-1}$), et enfin celles des carbohydrates (élongation C-H $\approx 2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$, élongation et déformation du squelette $\approx 800\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$). L'eau absorbe très bien les radiations infrarouges et présente des bandes caractéristiques (élongation H-O $\approx 3360 \text{ cm}^{-1}$, bande d'association de l'eau $\approx 2130 \text{ cm}^{-1}$, déformation H-O-H $\approx 1640 \text{ cm}^{-1}$)(Nawrocka et Lamorsk 2013 ; Karoui *et al.* 2006).

- *Application de l'IRTF à l'étude de l'altération des EL*

Les premières applications de la spectroscopie infrarouge à l'étude des EL ont été proposées en 1984 inspirées par les travaux menés 20 ans auparavant sur l'analyse quantitative du lait par cette même technique (Goulden 1964). Elles ont permis le développement d'une technique de quantification de la matière sèche, des protéines et lipides totaux dans l'EL. Cependant, ce n'est qu'avec le développement de l'informatique et des approches spectrométriques basées sur la transformée de Fourier qu'il a été possible de traiter efficacement les informations contenues dans ces spectres, en exploitant notamment les techniques issues des statistiques multivariées. L'IRTF a été notamment utilisée pour déterminer le contenu lipidique et la teneur en humidité d'échantillons de produits alimentaires (Van de Voort *et al.* 1992; Van de Voort *et al.* 1993) et de nombreuses équipes ont exploité cette technique pour l'étude de la structure secondaire des protéines de l'œuf (Sanchez-Ruiz et Martinez-Carrion 1988 ; Furlan *et al.* 2007 ; Blume *et al.* 2015). Cependant, très peu d'approches ont été développées pour l'étude de la fraîcheur des œufs coquilles et aucune à notre connaissance ne porte sur l'étude de l'altération des EL.

L'œuf contient une quantité d'eau importante (88.5%) (Karoui *et al.* 2009). Cette eau absorbe efficacement les radiations infrarouges, ce qui génère une forte contribution sur le spectre MIR. En effet, l'eau présente des bandes d'absorption majoritaires (élongation H-O $\approx 3360 \text{ cm}^{-1}$, bande d'association de l'eau $\approx 2130 \text{ cm}^{-1}$, déformation H-O-H $\approx 1640 \text{ cm}^{-1}$) qui peuvent, de par leur position et leur intensité, masquer des signaux d'intérêts. Il est possible de limiter cette contribution en séchant les échantillons avant lecture par différentes méthodes (dessiccation, lyophilisation, chauffage IR,...) ou en utilisant des algorithmes de correction spécifiques, conçus pour éliminer la contribution de l'eau aux spectres IR (Powell *et al.* 1986 ; Bouř et Keiderling 2003). La soustraction précise des bandes d'absorbance de l'eau est possible grâce à la précision de fréquence accessible en FTIR (Karoui *et al.* 2003). Un exemple de spectre FTIR d'EL annoté est présenté dans la Figure 18.

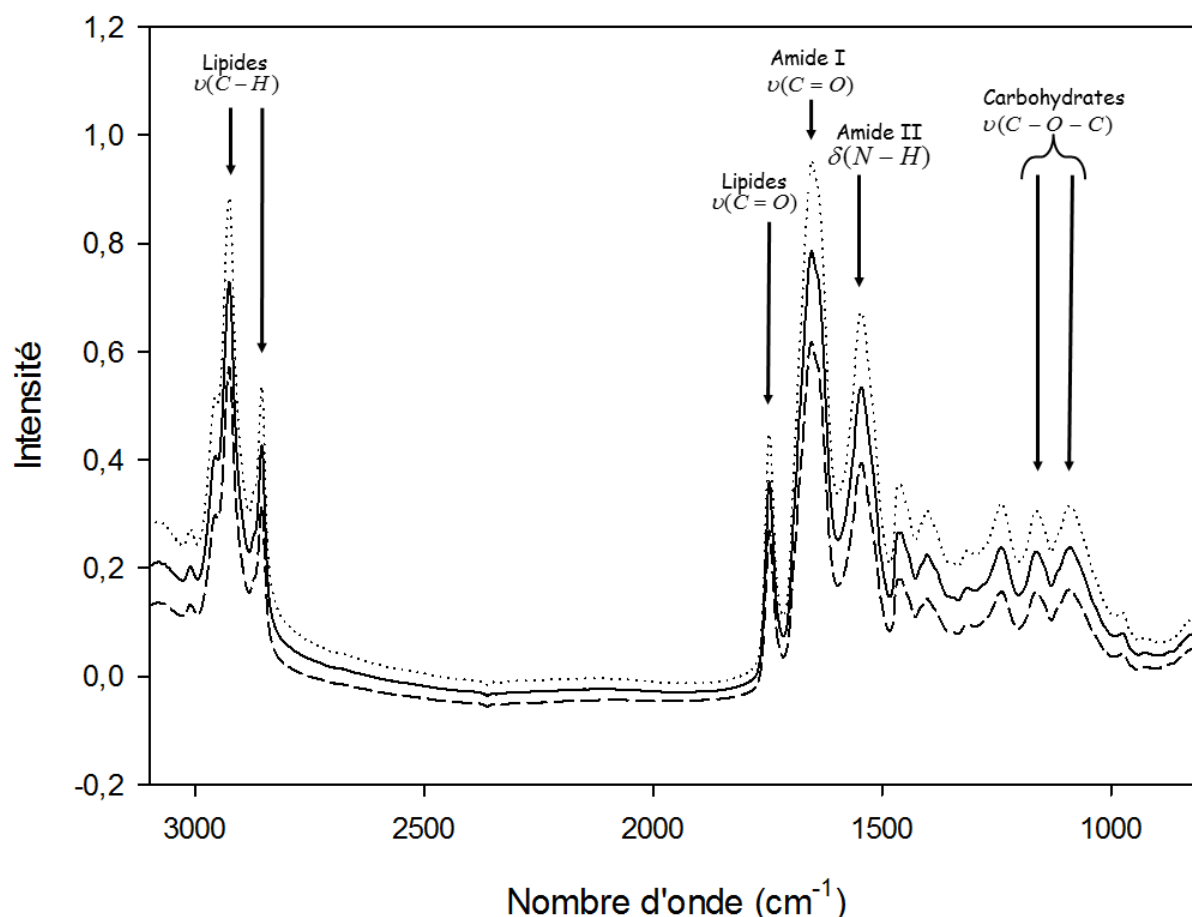


Figure 18. Spectre IRTF enregistré sur un entier liquide stérile dilué au 1/10ème séché dans un dessiccateur sous vide (dépôt de 5µl). Les principales bandes de vibration d'intérêt sont assignées sur le spectre. Seule la région la plus informative est représentée. Les bandes Amide I et II ($\approx 1600-1690\text{ cm}^{-1}$ et $\approx 1480-1575\text{ cm}^{-1}$) correspondent au signal des protéines, les bandes situées entre 2800 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} et près de 1740 cm^{-1} correspondent aux signaux lipidiques (lipoprotéines et triacylglycérols), les bandes situées entre 1000 et 1200 cm^{-1} correspondent aux signaux glucidiques (glucose libre, osamines).

De par sa capacité à générer un « profil chimique » de l'échantillon, l'IRTF est donc une technique prometteuse dans le cadre de l'analyse de la fraîcheur et de l'altération des EL. Cependant l'interprétation de ces spectres nécessite l'utilisation d'approches issues des statistiques multivariées et sont donc limitées par les biais inhérents à ces techniques d'interprétation des données, comme les effets de « sur-prédiction » (ou « overfitting ») par exemple.

4.2.1.3 La Spectroscopie Proche Infra Rouge (SPIR)

Le potentiel de la SPIR pour l'étude de produits alimentaires a été démontré dès les années 1960 (Norris et Butler 1961). Depuis de nombreux travaux ont confirmé les capacités de cette technique à fournir rapidement des informations fiables sur la concentration des principaux constituants de différents produits alimentaires (Osborne 2000). Sa capacité à quantifier simultanément plusieurs composés (lipides, protéines et carbohydrates totaux, eau) dans différentes matrices en un temps très court lui donne un avantage significatif sur les techniques d'analyse

classiques en plus de les égaler, voire de les surpasser en terme de précision (Nawrocka et Lamorsk 2013).

Un autre avantage important de la SPIR est la possibilité d'analyser de nombreux types d'échantillons solides ou liquides, sans ou avec peu d'étapes de préparation. Les échantillons liquides peuvent notamment être analysés de manière automatisée et l'utilisation de la fibre optique ouvre des possibilités de contrôle en ligne. La SPIR permet également l'étude de composés à haute teneur en eau sans séchage, contrairement à la spectroscopie MIR. Le signal de l'eau est en effet beaucoup plus atténué dans cette zone spectrale. Ces avantages sont toutefois contrebalancés par la nécessité d'effectuer des étalonnages spécifiques aux instruments utilisés et aux matrices étudiées, et donc de les renouveler systématiquement en cas de changement de formulation des produits étudiés. La SPIR présente également une sensibilité souvent trop faible pour l'étude de composants minoritaires (Li-Chan *et al.* 2002). La SPIR demeure malgré tout l'une des méthodes d'analyse non destructives les plus prometteuses dans le domaine de l'agroalimentaire [22].

- *Instrumentation.*

Les bandes d'absorbance de la région du PIR (Proche InfraRouge) sont dues aux fréquences des harmoniques et combinaisons des modes de vibrations fondamentaux observés dans la région du MIR. Les vibrations impliquant les liaisons C-H, O-H, N-H, et éventuellement S-H et C=O sont responsables de la majorité des bandes d'absorbance dans la région du PIR (Li-Chan *et al.* 2002).

La fréquence des harmoniques correspond approximativement au double, triple, etc. des fréquences des vibrations fondamentales. Les bandes de combinaisons proviennent de l'interaction de deux ou plus des vibrations simultanées, leur fréquence correspondant à la somme des multiples des fréquences des vibrations fondamentales correspondantes (Nawrocka et Lamorsk 2013).

L'intensité des bandes correspondant aux harmoniques et aux bandes d'association en PIR décroît rapidement en même temps que leur fréquence augmente (la deuxième harmonique présente une intensité plus faible que la première, etc.). En conséquence, la région du PIR est caractérisée par des bandes d'intensité faible, généralement entre 10 et 100 fois inférieure à celles de la région du MIR. Les harmoniques les plus hautes présentant une intensité plus faible, seuls les signaux dont la vibration fondamentale est située dans la région spectrale du MIR, comprise entre 2,7 et 5,4 μm , présentent une intensité relativement importante dans la région du PIR (la première harmonique des modes de vibration en question est présente dans la région du PIR) (Charalambous 1984).

Les premiers spectromètres « proche-infrarouge » ne dérivait des instruments de spectroscopie UV-Visible que par des modifications mineures. Le potentiel de ces appareils a induit le développement d'appareillages spécifiques à la SPIR. Les premiers appareils utilisaient des monochromateurs à balayage et des réseaux holographiques à grande ouverture. Ces spectromètres à

balayage nécessitaient des ratios signal sur bruit importants pour être fonctionnels, impliquant donc un design électronique minutieux. Ces spectromètres très versatiles nécessitaient une compréhension avancée du principe de la SPIR, limitant leur application en milieu industriel. Pour les applications de routine, des systèmes plus simples basés sur l'utilisation de jeux de filtres en remplacement du monochromateur ont été développés. Ces appareils permettent d'effectuer simplement des mesures à différentes longueurs d'ondes prédéfinies (Charalambous 1984).

Tout comme pour la spectroscopie MIR, la SPIR a beaucoup bénéficié du développement de la micro-informatique et des approches spectroscopiques basées sur la transformée de Fourier, donnant naissance ainsi à la PIR-TF (FT-NIR en anglais). Cette technique fonctionnant sur le même principe que l'IRTF a permis d'améliorer la vitesse d'analyse, la reproductibilité des spectres et la précision des longueurs d'ondes mesurées.

Les spectromètres permettant l'analyse de la région du PIR fonctionnent sur le principe de la transmission, de la réflexion diffuse ou d'un mélange des deux ; on parle alors de « transflection » (Figure 19). Ces diverses techniques ont doté la SPIR d'un large éventail de méthodes d'échantillonnage et de sondes optiques permettant l'analyse de nombreuses matrices sans préparation d'échantillon et ouvrant des perspectives d'analyse en ligne.

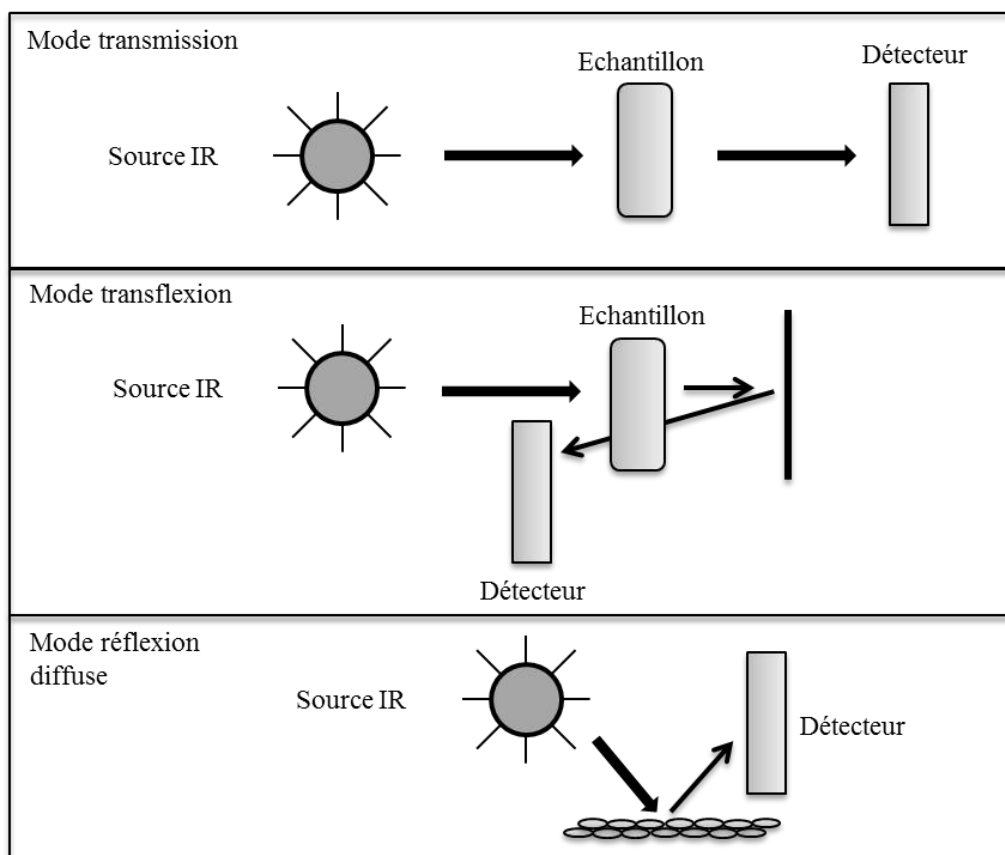


Figure 19. Schéma des modes transmission, « transflection » et réflexion diffuse (inspirée de la figure originale de Hansen, Pedersen-Bjergaard, et Rasmussen (2011)).

De récentes avancées telles que la microscopie proche infrarouge (Delarozadelgado *et al.* 2007) et les systèmes d'imagerie hyper spectraux proche infrarouge (Fernández Pierna *et al.* 2012) permettent aujourd'hui la réalisation d'analyses en PIR à l'échelle macro ou microscopique ainsi que la détermination de nouveaux paramètres physico-chimiques tels que la présence d'acides gras omega-3 dans les matrices alimentaires.

Les principales bandes de vibration du domaine du PIR utilisées dans l'analyse quantitative des principaux composants de produits alimentaires sont présentées dans le Tableau 22.

Tableau 22. Bandes de vibration du domaine du PIR utilisées dans l'analyse quantitative des principaux composants de produits alimentaires. Données d'après Li-Chan *et al.* (2002), annotation selon les travaux de Osborne *et al.* (1993).

Composant	Longueur d'onde (nm)	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution
Protéines	910	10989	C–H Elongation, troisième harmonique
Lipides	928	10776	C–H Elongation, troisième harmonique
Eau	970	10309	O–H Elongation, deuxième harmonique
Amidon	990	10101	O–H Elongation, deuxième harmonique
Protéines	1020	9804	2*N–H Elongation + 2*amide I
Lipides	1037	9643	2*C–H Elongation + 2*C–H déformation + (CH ₂) _n
Lipides	1200	8333	C–H Elongation, deuxième harmonique (groupes CH ₂)
Sucrose, Amidon	1440	6944	O–H Elongation, première harmonique
Eau, Amidon	1450	6897	O–H Elongation, première harmonique
Glucose	1480	6757	O–H Elongation, première harmonique (liaison hydrogène intramoléculaire)
Cellulose	1490	6711	O–H Elongation, première harmonique (liaison hydrogène intramoléculaire)
Protéines	1510	6623	N–H Elongation, deuxième harmonique
Amidon	1528	6545	O–H Elongation, première harmonique (liaison hydrogène intramoléculaire)
Amidon	1540	6494	O–H Elongation, première harmonique (liaison hydrogène intramoléculaire)
Amidon, glucose	1580	6329	O–H Elongation, première harmonique (liaison hydrogène intramoléculaire)
Lipides	1734	5767	C–H Elongation, première harmonique (groupes CH ₂)
Lipides	1765	5666	C–H Elongation, première harmonique (groupes CH ₂)
Cellulose	1780	5618	C–H Elongation, première harmonique
Cellulose	1820	5495	O–H Elongation + 2*C–O Elongation
Amidon	1900	5263	O–H Elongation + 2*C–O Elongation
Eau	1940	5155	O–H Elongation + O–H Déformation
Protéines	1980	5051	N–H Elongation asymétrique + amide II
Amidon	2000	5000	2*O–H Déformation + C–O Déformation
Protéines	2050	4878	N–H Elongation symétrique + amide II
Sucrose,	2080	4808	O–H Elongation + O–H Déformation

Amidon			
Amidon	2100	4762	2*O–H Déformation + 2*C–O Elongation
Protéines	2180	4587	2*amide I + amide III
Amidon	2252	4440	O–H Elongation + O–H déformation
Amidon	2276	4394	O–H Elongation + C–C Elongation
Cellulose	2336	4281	C–H Elongation + C–H Déformation
Cellulose	2352	4252	C–H Déformation, deuxième harmonique
Amidon	2461	4063	C–H Elongation + C–C Elongation
Amidon	2488	4019	C–H Elongation + C–C Elongation
Amidon	2500	4000	C–H Elongation + C–C Elongation

- *Application de la SPIR à l'étude de l'altération des EL*

Les premières applications de la SPIR à l'analyse des ovoproduits remontent aux années 1980 et concernaient la mesure de la matière sèche. Des approches permettant la mesure du taux d'humidité et des contenus protéiques et lipidiques totaux furent ensuite rapidement développées (Wehling, Pierce, et Froning 1988). Le but de ces études était d'évaluer la possibilité d'application d'un spectromètre PIR disponible dans le commerce à l'étude simultanée du taux d'humidité et des contenus en protéines totales et lipides totaux d'échantillons d'ovoproduits séchés par atomisation.

Différentes approches de SPIR utilisant la SPIR-TF (spectroscopie proche infrarouge à transformée de Fourier) ont été récemment développées pour l'analyse non invasive de la qualité et de la fraîcheur des œufs coquilles (Zhao *et al.* 2010 ; Giunchi *et al.* 2008 ; Lin *et al.* 2011). Les résultats de ces analyses sont généralement comparés aux critères de fraîcheur des œufs coquilles les plus reconnus sur le plan international (Haugh unit, pH du blanc d'œuf, etc.). Leur interprétation se fait par l'intermédiaire de modèles statistiques multivariés linéaires ou non linéaires.

La SPIR a également été utilisée pour l'étude des variations de la composition physico-chimique des jaunes d'œuf lyophilisés (plus particulièrement la composition en acides gras polyinsaturés) en fonction du régime des pondeuses (Dalle Zotte *et al.* 2006). Dans cette étude, des modèles PLS ont permis une séparation presque parfaite des échantillons en fonction des différents régimes alimentaires suivis par les pondeuses (différentes méthodes d'enrichissement en acide gras polyinsaturés). Cependant, d'autres paramètres tels que le pH, le contenu en cholestérol et les paramètres de couleur (CIE) n'ont pas pu être correctement prédits.

La SPIR trouve donc de nombreuses applications dans le domaine de l'analyse des œufs et ovoproduits. Cependant, même si plusieurs études ont exploré la capacité de cette méthode pour l'évaluation de la fraîcheur des EL, aucune à notre connaissance ne porte directement sur l'altération des EL en milieu de production. Or, la capacité de cette méthode à générer une « signature physico-

chimique » de l'échantillon (tout comme la spectroscopie MIR) en fait un candidat au potentiel intéressant pour l'étude de cette altération.

4.2.1.4 *La spectroscopie Raman*

La diffusion Raman a été décrite pour la première fois par Raman et Krishnan (1928). De nombreuses équipes de recherche en ont ensuite exploré les aspects expérimentaux (63 études en 1928 et 141 en 1929). Il a cependant fallu attendre l'intégration du laser dans les spectromètres Raman dans les années 60 (Kogelnik et Porto 1963) pour que les applications les plus importantes de cette technique soient développées. Les analyses étant cependant encore limitées par le haut degré de technicité de la spectrométrie Raman et par la forte contribution au spectre du phénomène de fluorescence, aujourd'hui évité par l'utilisation de lasers dans le rouge et le proche infra-rouge (DIEM 1993).

La spectroscopie Raman, ou spectroscopie de diffusion Raman permet, tout comme la spectroscopie infrarouge, l'observation des états vibrationnels d'une molécule et donc l'étude de la composition moléculaire d'un échantillon par l'identification de ses groupements chimiques. Cette technique proche et complémentaire de la spectroscopie infrarouge permet également l'analyse d'échantillons aqueux (car moins sensibles à la contribution de l'eau) et la détection de vibreurs différents.

L'effet Raman est dû à l'interaction entre une radiation monochromatique et un échantillon. Les photons sont réfléchis, absorbés ou diffusés. La majeure partie des photons diffusés (environ 1/1000) est de même fréquence ν_0 que le rayonnement incident. Ce phénomène est décrit comme diffusion de Rayleigh ou diffusion élastique. Une faible partie de ces photons (environ 1/10⁸) sont diffusés de manière non élastique, avec un changement de fréquence caractérisant l'effet Raman. Deux types de diffusion Raman peuvent être rencontrés ; la diffusion Raman Stokes, et la diffusion Raman anti-Stokes. Dans les deux cas, les différences de fréquences observées entre ν_0 (fréquence du rayonnement incident) et ν_d (fréquence des photons diffusés) sont égales aux fréquences de vibration actives pour le composé étudié. La Figure 20 présente un diagramme des processus de diffusion de Rayleigh, Raman Stokes et Raman anti Stokes.

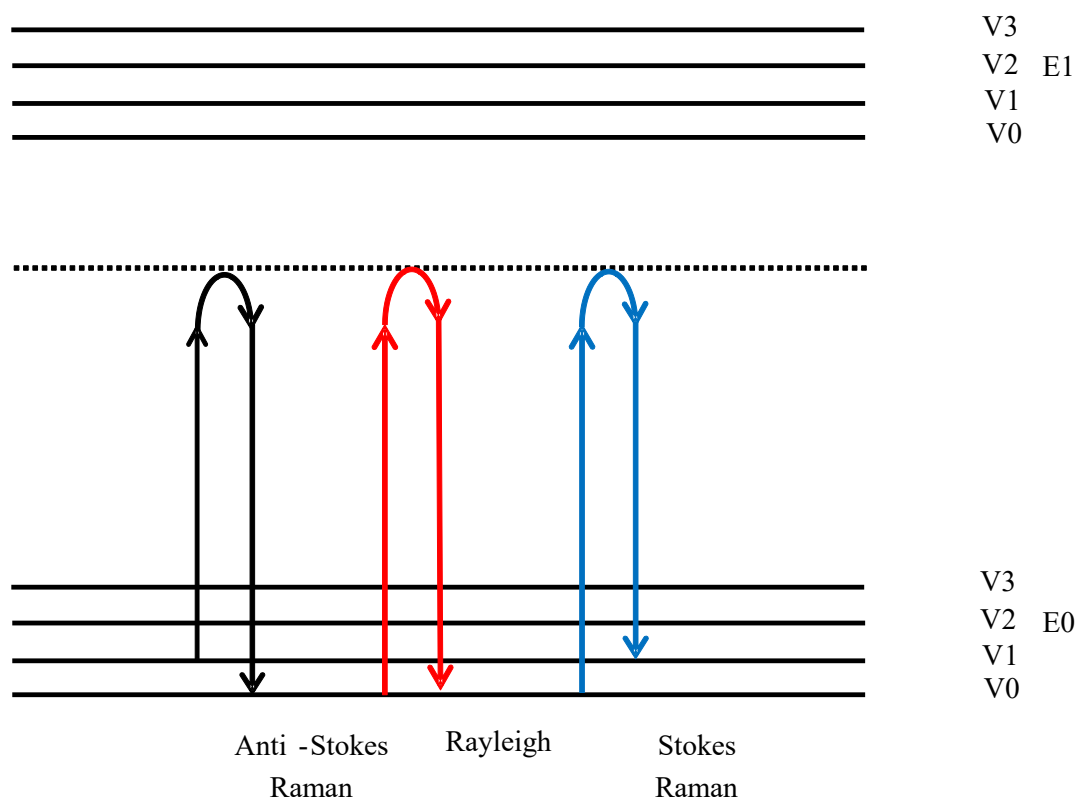


Figure 20. Diagramme de Jablonski des processus de diffusion de Rayleigh, Raman Stokes et Raman anti Stokes, E = niveau énergétique, V = niveau vibrationnel (Coat *et al.* 2018).

L'état énergétique d'une molécule peut être décrit par ses fonctions d'ondes (rotationnelle, vibrationnelle et électronique). E0 et E1 représentent les niveaux électroniques fondamentaux et excités d'une molécule. V0, V1, V2 et V3 représentent les niveaux vibrationnels. Dans le cas de la diffusion de Rayleigh, le système revient à son niveau de départ v0. Dans le cas où le système se stabilise à un niveau vibrationnel différent de son point de départ, on peut observer une légère augmentation ou diminution de l'énergie des photons de $E_{V1}-E_{V0}$, et on parle de diffusion Raman Stokes ou anti Stokes. D'autres effets Raman (Schrader et Moore 1997) peuvent également être exploités pour l'analyse de molécules tels que la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) (Chen *et al.* 1982 ; Murphy *et al.* 1982) pour l'analyse d'échantillons au contact de surfaces métalliques, ou la diffusion Raman de résonance rencontrées quand la longueur d'onde émise par la source lumineuse est proche de celle d'une transition électronique de la molécule analysée.

Cette partie traitait jusqu'ici des *effets Raman linéaires*. Il existe également des *effets Raman non linéaires*. Ces derniers sont mesurables dans le cas où la source incidente génère un champ électrique très intense. Différentes approches récentes de spectroscopie Raman tel que l'effet Hyper Raman, l'effet Raman stimulé, l'effet Raman inverse, la Diffusion Raman Cohérente Stokes et Anti-Stokes et l'effet Raman photo-acoustique reposent sur ce principe (Coat *et al.* 2018).

Le schéma de principe d'un spectromètre Raman confocal est présenté dans la Figure 21.

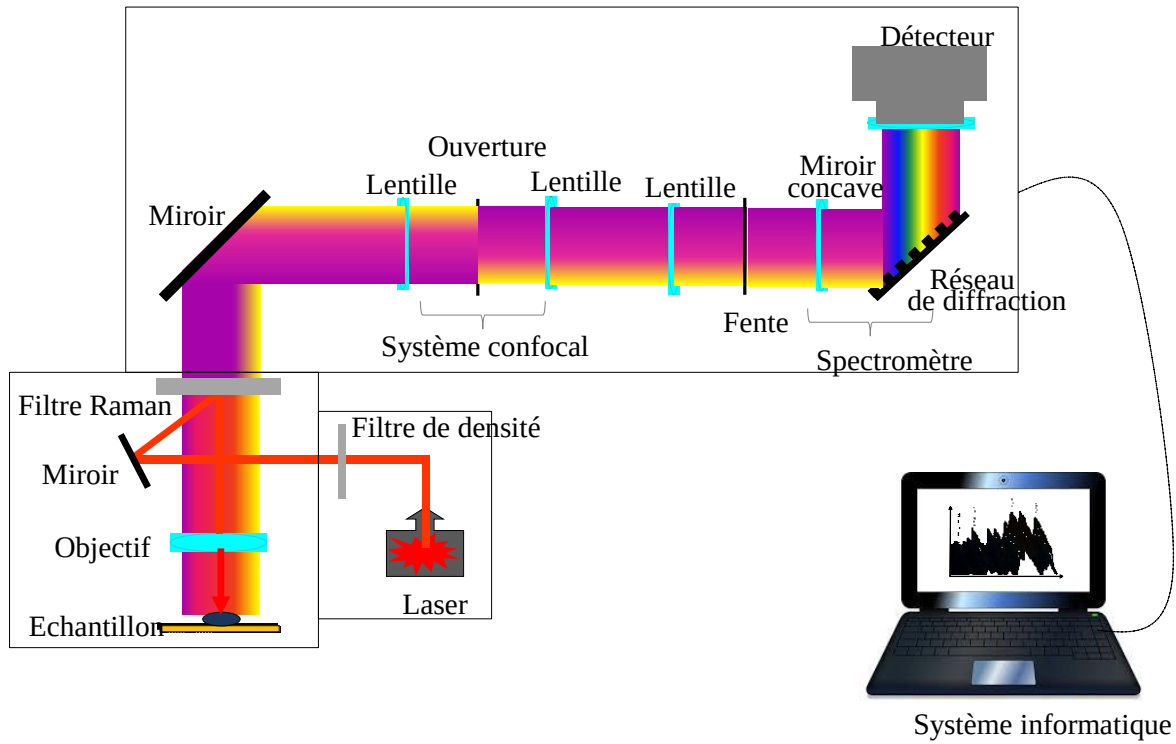


Figure 21. Schéma de principe d'un spectromètre Raman confocal (Coat *et al.* 2018)

Un ou plusieurs lasers fournissent la source d'irradiation monochromatique. Différents types de filtres peuvent être installés à la sortie du laser (filtre interférentiel, de réjection) afin d'améliorer la qualité du signal obtenu en minimisant la contribution d'autres phénomènes (imperfections du faisceau d'excitation, diffusion Rayleigh). Un filtre de densité permet également de contrôler la puissance du laser. Le spectromètre Raman est également équipé d'un système de focalisation sur l'échantillon allant d'une simple lentille convergente à un microscope. Le spectromètre diffracte le rayon selon les longueurs d'onde et les redirige vers le détecteur, généralement une caméra CCD (Charge Coupled Device) qui permet la détection multicanale d'informations spatiales et spectrales sur l'échantillon.

La comparaison entre différents spectres Raman est possible grâce à la comparaison des déplacements Raman utilisant des nombres d'onde relatifs. Ces nombres d'ondes sont calculés en fonction de la longueur d'onde de la source d'excitation selon la relation suivante :

$$\text{Nombre d'onde Raman relatif } (\text{cm}^{-1})10^7 = \frac{1}{\lambda_{\text{laser}}(\text{nm})} - \frac{1}{\lambda(\text{nm})}$$

Le Tableau 23 présente les principales bandes Raman et leur attribution.

Tableau 23. Assignment des principales bandes Raman (Schuster, Urlaub, et Gapes 2000; Maquelin *et al.* 2002).

Déplacement Raman (cm ⁻¹)	Attribution
497, 550	Carbohydrates : C-O-C
657	Tyrosine
720	Adénine
779, 810	Acides nucléiques
850, 878	Tyrosine (dans les protéines)
1000	Phénylalanine
1093	Carbohydrates : (C-C, C-O)
1117	Lipides insaturés (=C-C=)
1243	Amide III : N-H, C-N
1311	Amide III
1444	$\delta(-CH^2)$
1568	Guanine, Uracile (élongation du cycle)
1655	Amide I
2880	Lipides : CH ₂ (élongation symétrique)
2933	Lipides : CH ₃ (élongation antisymétrique)

- *Applications de la spectroscopie Raman à l'étude de l'altération des EL*

La spectroscopie Raman trouve de nombreuses applications dans le domaine pharmaceutique où elle permet notamment d'analyser la dispersion des agents actifs dans des comprimés (Vankeirsbilck *et al.* 2002), dans le domaine médical pour l'analyse des espèces microbiologiques et plus récemment virales (Shanmukh *et al.* 2006) et des cellules ou tissus entiers (Kneipp *et al.* 2003; Krishna *et al.* 2005). La spectroscopie Raman présente également des applications dans d'autres domaines tels que l'étude des relations cellule – toxine (Notingher *et al.* 2004) ou l'identification rapide de drogues (cocaïne, l'héroïne, dérivés de phényléthylamine) (Bell *et al.* 2000 ; Ryder, O'Connor, et Glynn 1999). Les applications de la spectroscopie Raman sont cependant rares dans le domaine agroalimentaire. Des études portant sur l'analyse de la composition ou de la qualité des huiles et autres produits gras (Sadeghi-Jorabchi *et al.* 1990, 1991; Yang *et al.* 2005 ; Guzmán *et al.* 2011), l'analyse de la distribution spatiale des protéines dans les grains de blé (Piot *et al.* 2000) ou l'analyse de nanomatériaux dans des matrices alimentaires et pharmaceutiques (Li et Church 2014) sont référencées dans la littérature. Très peu d'étude porte sur l'œuf ou les ovoproduits, et aucune à notre connaissance sur l'altération des EL. Les seules études identifiées utilisant la spectroscopie Raman pour l'étude des œufs ou ovoproduits concernent la détection de mélamine dans le blanc d'œuf (Wang *et al.* 2015), l'étude de la structure secondaire des protéines du blanc d'œuf (Wang et Paliwal 2011), la quantification des caroténoïdes dans le jaune d'œuf en fonction du régime de la pondeuse (Hesterberg

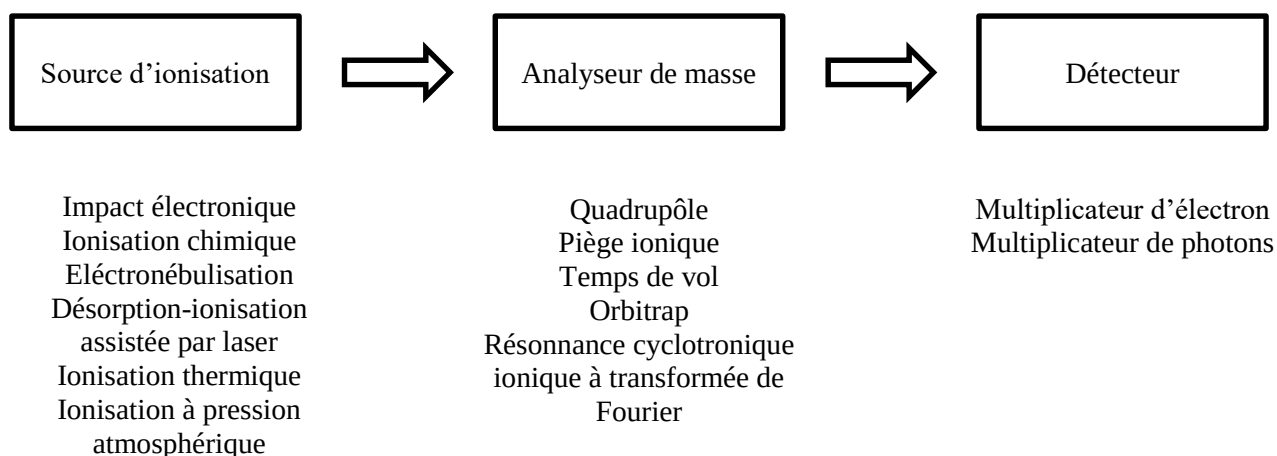
et al. 2012) et la détection de contamination au jaune d'œuf dans le blanc d'œuf liquide (Cluff *et al.* 2016). La limitation des applications de la spectroscopie Raman dans le domaine agroalimentaire peut en partie être expliquée par l'absence de base de données Raman dédiée aux matrices alimentaires.

4.2.2 La spectrométrie de masse

Le développement du premier spectromètre de masse a été réalisé par Sir Joseph John Thomson à l'université de Cambridge au cours de la première décennie du 20^{ème} siècle (Thomson 1911). Son fonctionnement reposait sur la différence des trajectoires paraboliques des ions dans des champs magnétiques. La détection des ions était réalisée par impact sur un écran fluorescent ou un film photographique. Francis W. Aston conçut dans les années qui suivirent la première guerre mondiale un nouveau spectromètre de masse d'une résolution améliorée d'un ordre de grandeur, permettant ainsi l'étude des isotopes. A la même période, A.J. Dempster développait à l'université de Chicago un spectromètre de masse équipé de la première source d'ionisation par impact électronique (Russell et Siuzdak 2003). De nombreux développements techniques firent leur apparition lors des décennies suivantes, tels que les analyseurs à double focalisation, les analyseurs de temps de vol (Time Of Flight), et les analyseurs à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier. Le développement des détecteurs quadripôles par Paul Wolfgang en 1950 (Paul et Steinwedel 1953) a ouvert la porte aux systèmes couplés de type spectromètre de masse – spectromètre de masse (MS-MS) ou chromatographie gazeuse ou liquide – spectrométrie de masse (GC-MS et LC-MS) (Yost et Enke 1978). De nombreux développements ont depuis permis d'améliorer la résolution des spectromètres de masse permettant aujourd'hui la quantification de composés à des seuils inférieurs à 1 ppm en analyse de routine et la diversité des techniques employables en fonction de la nature des composés étudiés et de l'objectif de l'analyse (analyse ciblée, non ciblée, quantitative, élucidation structurale, ...).

Les spectromètres de masse actuels utilisent différents principes et équipements spécifiques mais ils ont en commun trois éléments : une source d'ionisation permettant la formation des ions, un analyseur de masse permettant de les séparer et un détecteur pour leur analyse. Un schéma de principe général est présenté dans la Figure 22.

Figure 22. Schéma de principe général d'un spectromètre de masse, des exemples de technologies courantes sont données pour les différents éléments.



La spectrométrie de masse peut nécessiter différentes étapes de purification ou de préparation des échantillons. C'est ainsi que le mode d'acquisition choisi dépendra principalement de l'application et du niveau de sélectivité recherché (Dunn et Ellis 2005), les analyses les plus exhaustives étant réalisées avec le mode scan complet (full scan en anglais).

Les échantillons peuvent être également injectés directement dans le spectromètre de masse. Cette technique nécessite cependant l'utilisation d'un spectromètre de haute ou très haute résolution permettant une bonne séparation des composés isobares (présentant une masse nominale identique) (Ibanez *et al.* 2015). Une alternative consiste à employer une technique séparative en amont de l'analyse. Les systèmes couplés les plus couramment rencontrés impliquent des chromatographes en phase liquide (LC-MS) et gaz (GC-MS). La séparation chromatographique permet alors de répartir les composés à analyser tout au long du gradient d'élution, assurant ainsi la séparation de composés isobares ou isomères (qui présentent la même masse exacte) (Ibáñez *et al.* 2013).

4.2.2.1 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de

masse

- Historique et Principe

Le premier couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse (GC-MS) a été développé dans les années 1960. La GC-MS est la technique la plus répandue pour l'analyse des composés volatils ou semi-volatils non thermolabiles (Coat *et al.* 2018). L'échantillon est introduit dans la colonne directement ou après volatilisation, puis véhiculé par la phase mobile (gaz vecteur) dans la phase stationnaire pour y séparer ses composants en fonction de leur affinité avec cette dernière et de leur température de volatilisation. Ensuite, ils sont analysés dans le spectromètre de masse après passage à travers une ligne de transfert. Différentes réactions de dérivation ont été

développées pour faciliter l'analyse de composés polaires, non volatiles ou thermolabiles (Pasikanti, Ho, et Chan 2008).

- *La dérivation*

Les possibilités d'analyse des composés polaires par GC-MS sont limitées en raison de leur faible stabilité thermique et des points d'ébullition élevés qu'ils présentent, cette technique étant plus adaptée à l'analyse de composés volatiles. Différentes réactions, dites de dérivation, ont été développées afin de permettre l'analyse de ces composés polaires par GC-MS. Ces réactions de dérivation ont principalement pour but d'abaisser le point d'ébullition des composés, de réduire leur polarité et d'augmenter leur stabilité thermique. Elles permettent également d'améliorer le seuil de détection et la résolution des analyses (Roessner *et al.* 2000). Les réactions de dérivation les plus couramment employées sont les réactions d'oximation suivies de réactions de silylation (Becker *et al.* 2013 ; Huege *et al.* 2007 ; Kanani *et al.* 2008) et les réactions d'alkylations (Hušek 1998 ; Smart *et al.* 2010). La Figure 23 présente le mécanisme de ces réactions de dérivation.

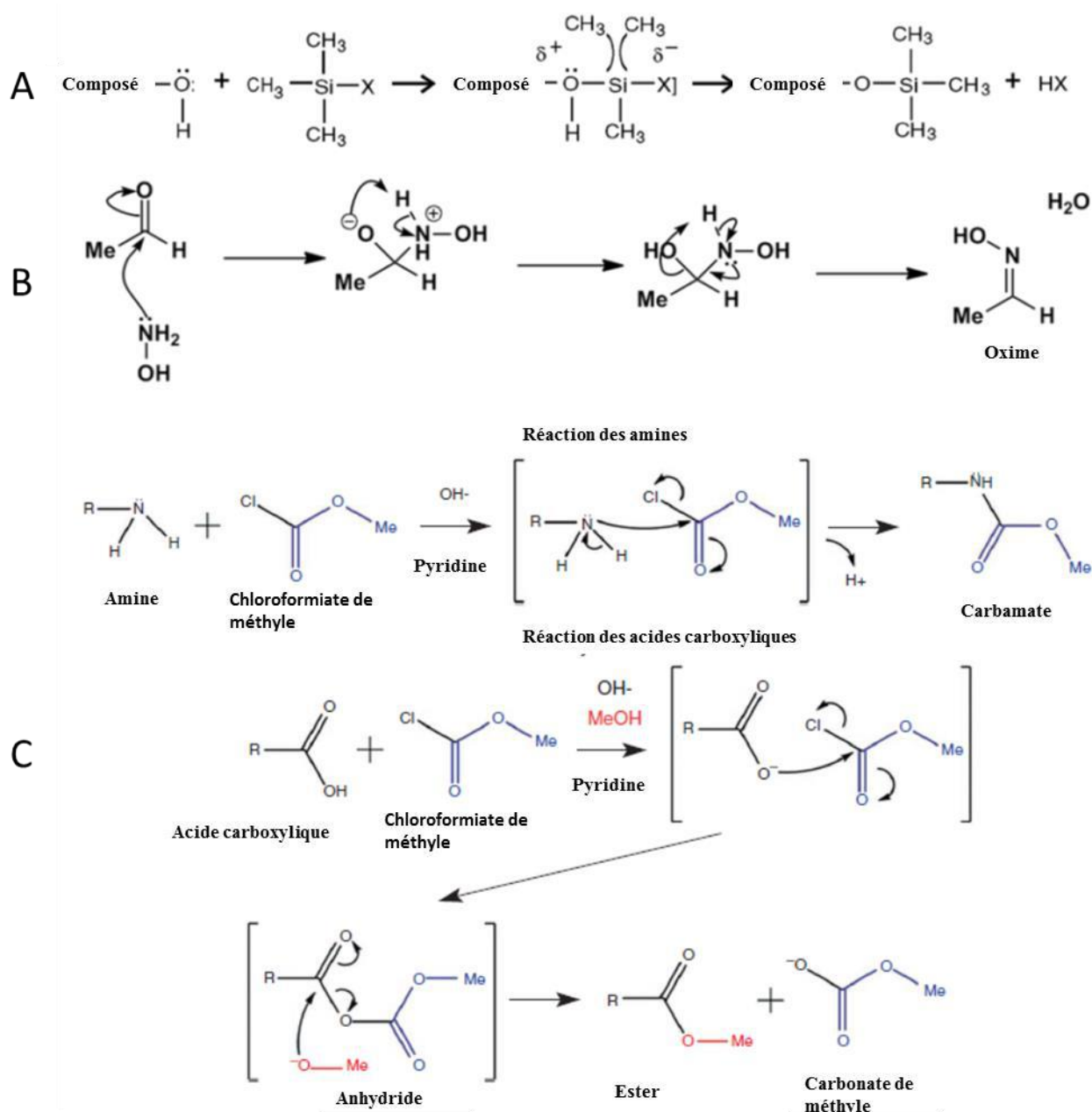


Figure 23. Mécanismes des réactions de dérivation, (A) silylation et formation de dérivés triméthylsilyl (TMS) sur un alcool avec $-\text{X}=-\text{O}-\text{C}(\text{CF}_3)=\text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ pour le BSTFA, $\text{X}=-\text{(CH}_3\text{)N-CO-CF}_3$ pour le MSTFA (Orata 2012), b) oximation de l'acétaldéhyde par l'hydroxylamine (Rosenberg *et al.* 1974) c) alkylation avec le méthyl chloroformate sur une amine primaire et un acide carboxylique avec formation d'un carbamate et d'un ester (Smart *et al.* 2010).

La silylation est une des approches les plus employées. Au cours de cette réaction, tous les atomes d'hydrogène actifs sont remplacés par un groupement triméthylsilyle (TMS) pour les réactifs MSTFA, BSTFA, BSA et HDMS, ou par un groupement tert-butyldiméthylsilyl (TBDMS) pour le réactif MTBSTFA. Le mécanisme impliqué est une substitution nucléophile bimoléculaire (de type $\text{S}_\text{N}2$) en une étape.

Ces réactifs sont utilisés en large excès pour augmenter l'efficacité de la réaction. La réaction de silylation a besoin d'un environnement anhydre et aprotique car les composés dérivés sont hydrolysables. Les extraits contenant de l'eau ou des solvants protiques (méthanol, éthanol, etc.) doivent donc être séchés ou lyophilisés avant silylation.

Le HDMS est un composé peu réactif, surtout utilisé pour la dérivation spécifique des oses et bien que le BSA soit très réactif, de nombreux sous-produits peuvent se former lors de l'utilisation de ce réactif, générant ainsi des pics supplémentaires susceptibles de co-éluer avec les composés à analyser (Orata 2012). La sélection parmi les autres types de réactifs de silylation (Figure 24) est à faire en fonction des molécules cibles de l'étude.

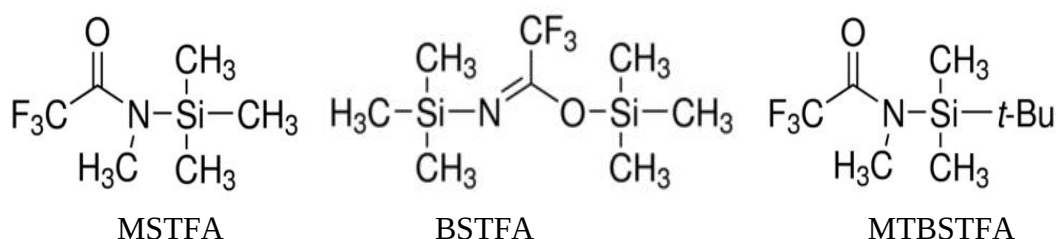


Figure 24. MSTFA, BSTFA et MTBSTFA

De façon simplifiée, les dérivés TBDMS présentent la meilleure stabilité à l'issue des réactions de silylation mais sont difficilement utilisables sur les molécules telles que les oses ou les stérols en raison des effets liés à l'encombrement stérique. Le MSTFA et le BSTFA sont parmi les plus utilisés des réactifs conduisant à la formation de dérivés TMS (Orata 2012). L'efficacité des réactifs de dérivation peut être améliorée par l'utilisation de catalyseurs (Figure 25).

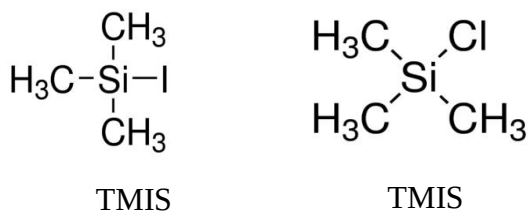


Figure 25. Catalyseurs TMIS et TMCS

Le choix du réactif de dérivation dépend de deux critères principaux qui sont la réactivité vis-à-vis des molécules cibles et la capacité à dissoudre les substrats et les produits de la réaction de dérivation. Le nombre de sous-produits générés est aussi un élément à prendre en compte puisque ces derniers peuvent à la fois avoir un impact sur le rendement de la réaction et augmenter la complexité du chromatogramme. Bien que l'objectif soit la dérivation de l'ensemble des molécules contenues dans l'échantillon, dans les faits, l'étape de dérivation engendre inévitablement des biais clairement décrits dans la littérature. Selon Kanani *et al.* (2008) deux catégories de biais existent : ceux qui impactent uniformément l'ensemble des composés analysés, facilement corrigibles grâce à l'ajout d'un étalon interne dans l'ensemble des échantillons et ceux qui impactent spécifiquement un ou

plusieurs des composés analysés. Les méthodes pour s'affranchir de ce deuxième type de biais sont plus complexes et nécessitent le recours à des isotopes spécifiques des molécules étudiées (marquage isotopique) (Wahl *et al.* 2014).

Au vu des spécificités des réactifs de dérivation disponibles commercialement, le MSTFA et le BSTFA avec ou sans catalyseurs (TMCS ou TMIS) semblent être les plus susceptibles de dériver et de solubiliser efficacement la grande variété de composés identifiés comme potentiellement intéressants dans le cadre de cette étude.

- *Application à l'étude de l'altération des EL*

De nombreuses applications de la GC-MS ciblée pour l'étude de la qualité et de l'origine des matrices alimentaires sont proposées dans la littérature (Cavaliere *et al.* 2007 ; Sultanbawa et Rural 2015 ; Dabija et Hatnean 2014). La plupart de ces études se concentrent sur l'analyse de composés volatils, facilement analysables par GC et contribuant fortement à la dégradation des propriétés organoleptiques des produits alimentaires. Les applications des analyses ciblées par GC-MS pour l'étude de marqueurs d'altération autres que des composés volatils sont rares (Coat *et al.* 2018). On peut citer par exemple Pizzoferrato *et al.* (1993) qui ont étudié par GC-MS la concentration des stérols et de leurs produits d'oxydation dans les ovoproduits où ces derniers sont considérés comme des marqueurs de dégradation chimique. D'autres approches de type profilage métabolique (analyse ciblée) ont également été développées pour caractériser l'altération de différentes matrices alimentaires et mettre en évidence des marqueurs d'altération pertinents. Ces méthodes sont généralement centrées sur l'analyse des COVs (Xu *et al.* 2010 ; C. Li *et al.* 2011) ou des métabolites primaires (acides organiques, oses, acides aminés,...) après dérivation (Cevallos-Cevallos et Reyes-De-Corcuera 2012 ; O'Gorman *et al.* 2012).

A notre connaissance, aucune étude sur la qualité ou l'étude de l'altération des EL basées sur une approche de type métabolomique par GC-MS n'est présente dans la littérature. L'absence de ce type d'étude peut être en partie expliquée par la complexité des étapes de préparation des échantillons. En effet, l'EL est composé de très nombreux éléments, dont des macromolécules abondantes telles que les protéines qui rendent difficile leur analyse par GC. Des étapes de déprotéination des échantillons sont donc nécessaires et doivent être complétées par différentes étapes de séparation ou d'extraction afin de maximiser le potentiel et la simplicité de l'analyse (voir Prétraitements des échantillons).

4.2.2.2 *La chromatographie liquide couplée à spectrométrie de masse*

- *Historique et principe*

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a été développée plus tardivement que la GC-MS, bien que les premières tentatives remontent également aux années

1960 (Tal'roze *et al.* 1968). L'introduction directe d'échantillons liquides dans le spectromètre de masse impliquait de nombreuses contraintes. Le développement de différentes méthodes d'interface LC-MS en 1974 (ionisation chimique à pression atmosphérique (Horning *et al.* 1974), interface à fil mobile (Scott et Scott 1974) et introduction directe (Arpino, Dawkins, et McLafferty 1974)) a permis le développement rapide de cette technique jusqu'à ce qu'elle atteigne les capacités résolutives et la diversité technique qu'elle présente aujourd'hui. La LC-MS est rapidement devenue, de par sa couverture métabolique, une méthode de choix pour les analyses métabolomiques (Coat *et al.* 2018). Dans les systèmes actuels, les solutés contenus dans l'échantillon sont élués et séparés sur un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) puis analysés dans le spectromètre de masse grâce au développement de nouvelles méthodes d'interface entre la LC et la MS, l'ionisation à pression atmosphérique ou API pour *atmospheric pressure ionization* (ESI, APCI, APPI, APLI) et les sources d'ionisation non API (EI, SMB, DESI) (Palma *et al.* 2016).

- *Application à l'étude de l'altération des EL*

Différentes applications de la LC-MS pour l'étude des matrices alimentaires sont reportées dans la littérature. Ces applications portent souvent sur l'étude de la composition (Rogachev et Aharoni 2012) et l'évaluation de la qualité ou de la sécurité (Zhang *et al.* 2012) des produits alimentaires. Cependant les études portant sur l'altération de produits alimentaires sont rares. On peut citer une étude ciblée sur la détection des amines biogènes parfois associées à l'activité de microorganismes dans ces produits et facilement caractérisées par LC-MS, ou une étude non ciblée avec pour objectif de mettre en évidence des métabolites marqueurs de bactéries spécifiques dans des colonies individuelles. Dans cette étude, un seul pic différentiel fût trouvé sur les profils correspondant à l'ensemble des pathogènes. La limitation des applications de la LC-MS à l'étude de l'altération des aliments peut être liée au fait que les différences de composition chimique induites par l'altération concernent principalement les composés volatils organiques et les métabolites primaires, généralement analysés par GC-MS (Coat *et al.* 2018).

4.2.3 La résonance magnétique nucléaire

La description simplifiée du principe de la RMN présentée dans cette partie est principalement basée sur les récents travaux de l'équipe du professeur Giraudeau dans Coat *et al.* (2018) et les cours de RMN du Professeur Akoka accessibles en ligne sur l'espace pédagogique du laboratoire CEISAM (Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation) de l'université de Nantes (Akoka 2016).

4.2.3.1 Principe

La résonance magnétique nucléaire (RMN) repose sur le comportement magnétique du noyau atomique. Ce phénomène découvert par Félix Bloch et Edward Mills Purcell leur a valu le prix Nobel de Physique en 1952. Les expériences de RMN exploitent le moment magnétique de spin des atomes. Ce moment magnétique de spin est la résultante de l'interaction entre le spin nucléaire et un champ magnétique. Le phénomène de RMN ne se manifeste que pour les noyaux de spin non nul. Le noyau le plus couramment étudié en RMN est l'hydrogène ^1H (RMN du proton), même si d'autres noyaux tels que le ^{13}C ou le ^{15}N sont aussi couramment étudiés. Nous ne traiterons ici que de la RMN du proton.

Le principe de fonctionnement de la RMN est très complexe. On peut le présenter de manière très simplifiée comme ceci : le noyau des atomes peut être assimilé à une sphère chargée positivement et tournant sur elle-même. La charge du noyau en rotation peut être assimilée à un courant électrique produisant un champ magnétique également appelé moment magnétique. Le noyau peut donc être assimilé à un aimant présentant deux pôles. Cette caractéristique du noyau des atomes est appelée moment magnétique de spin.

Les champs magnétiques des noyaux contenus dans un échantillon étant orientés de manière totalement aléatoire et la résultante de ces champs magnétiques pour l'ensemble de l'échantillon étant nulle, cet effet n'est pas observable à l'échelle macroscopique. Dans le cadre d'une expérience de RMN, l'échantillon est plongé dans un champ magnétique intense (plusieurs dizaines de milliers de fois le champ magnétique terrestre) noté B_0 . Sous l'effet de ce champ magnétique, les moments magnétiques de spin ont tendance à s'aligner dans la direction du champ magnétique B_0 (comme les boussoles des aiguilles s'alignent sur le champ magnétique terrestre).

Les moments magnétiques de spin $\frac{1}{2}$ (comme dans le cas des protons) ne peuvent prendre que deux orientations. L'une proche du sens du champ magnétique externe B_0 (α) et l'autre proche du sens opposé de ce champ magnétique B_0 (β) (Figure 26 a).

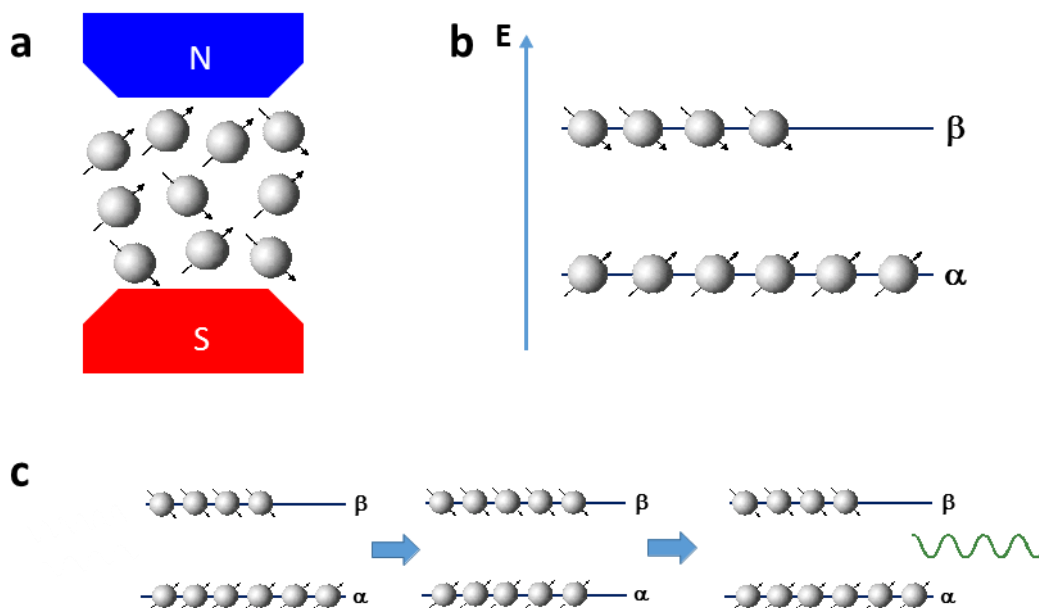


Figure 26. Illustration du principe de la RMN. a) Orientation des moments magnétiques de spin ; b) niveaux d'énergies des états α et β ; c) Egalisation des populations des états α et β sous l'influence du champ magnétique B_1 et retour à l'état d'équilibre induisant l'émission du FID (en vert) (Coat et al. 2018).

L'orientation des noyaux se traduit par l'existence de deux niveaux d'énergie (effet Zeeman) (Figure 26 b). Le niveau inférieur ou état α (correspondant aux noyaux orientés dans la direction du champ magnétique) est le plus stable. Le niveau supérieur ou état β devrait être vide, mais sous l'effet de l'agitation thermique, certains noyaux vont obtenir l'énergie nécessaire au changement d'état. Le nombre de noyaux dans l'état α étant légèrement supérieur au nombre de noyaux dans l'état β , la somme vectorielle de tous ces moments magnétiques nucléaires est non nulle et dirigée dans la direction du champ magnétique externe B_0 . Cette somme est nommée aimantation nucléaire, et est proportionnelle au nombre de noyaux. C'est elle qui est mesurée lors d'une expérience de RMN. L'aimantation nucléaire n'étant pas observable quand elle est parallèle au champ magnétique externe B_0 , on applique un deuxième champ magnétique B_1 dirigé à 90° de B_0 . Dès qu'une rotation de 90° de l'aimantation nucléaire a été obtenue, le champ B_1 est coupé. Après l'application du champ B_1 les populations des états α et β sont identiques (Figure 26 c). L'onde électromagnétique employée doit avoir une fréquence précise pour provoquer cette transition énergétique (phénomène de résonance). Après l'arrêt du champ magnétique B_1 , l'aimantation retourne progressivement à sa position d'équilibre en émettant une onde dont la fréquence dépend de l'écart entre les niveaux d'énergie. Cette onde mesurée forme le signal de RMN, appelé signal de précession libre ou FID (Free Induction Decay). Ce FID est composé d'une superposition de fréquences qui caractérisent l'environnement chimique des noyaux constituant l'échantillon. En spectroscopie RMN, la transformée de Fourier de ce signal permet d'obtenir un spectre (Figure 27 a) dont l'analyse peut permettre de déterminer la

structure des molécules contenues dans l'échantillon analysé. Les expériences de RMN sont réalisées sur des spectromètres RMN souvent équipés d'un aimant supraconducteur à très haut champ (Figure 27 b). L'instrumentation des spectromètres RMN ne sera pas détaillée dans ce manuscrit. Des informations détaillées sur le principe de la RMN et son instrumentation sont disponibles dans la littérature (Ernst *et al.* 1987; Canet *et al.* 2002; Keeler 2010).

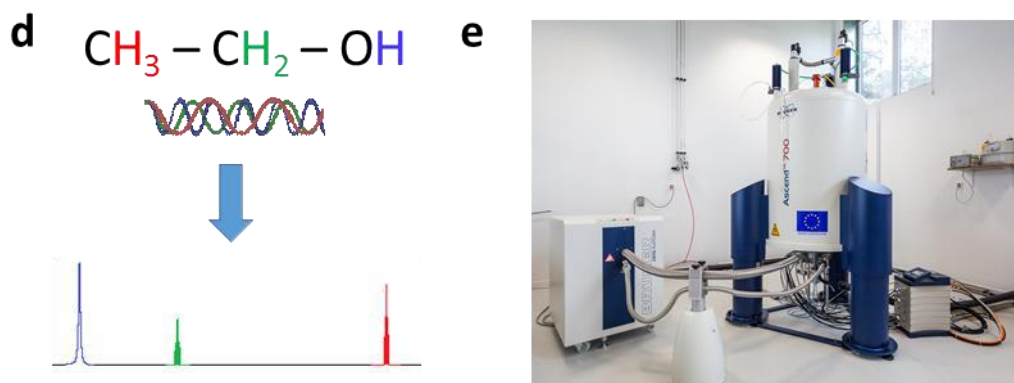


Figure 27. Illustration du principe de la RMN a) Représentation d'un spectre (ici l'éthanol) après réalisation d'une transformée de Fourier sur le FID ; b) Exemple de spectromètre RMN à haut champ à 16,4 Teslas (au laboratoire Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation, à l'Université de Nantes)(Coat *et al.* 2018).

La RMN regroupe une grande diversité d'approches comme la spectroscopie RMN (présentée ci-dessus), la relaxométrie par RMN exploitant directement le FID de l'expérience RMN, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettant l'obtention d'information en deux ou trois dimensions à l'aide d'une approche spécifique d'excitation des noyaux et d'un traitement du signal adapté,... Cette grande diversité d'approches permet à la RMN d'être une méthode très versatile et capable d'analyser des échantillons solides, liquides et gazeux.

4.2.3.2 Application à l'étude de l'altération des EL

Bien qu'elle soit un outil particulièrement adapté à l'étude de matrices complexes telles que les ovoproduits, les rares applications décrites dans la littérature concernent l'analyse de l'œuf coquille par imagerie ou relaxométrie. De rares études portant sur l'analyse de la structure et de la dynamique des protéines de l'œuf (Redfield et Dobson 1988), ou des modèles permettant d'affiner notre compréhension de la formation des vésicules constituées de phosphatidylcholine (Finer, Flook, et Hauser 1971), sont présentes dans la littérature. A notre connaissance, en dehors d'une étude utilisant la RMN ^1H quantitative pour le contrôle qualité d'une liqueur à base d'œuf (Finer, Flook, et Hauser 1971), aucune référence à l'utilisation de la RMN pour l'étude des ovoproduits ou de leur altération n'est présente dans la littérature. La capacité d'élucidation structurale et le potentiel quantitatif de la RMN en font pourtant un outil particulièrement efficace pour l'analyse et le profilage d'échantillons d'EL ou de fractions spécifiques de ces échantillons.

5 Analyse critique des marqueurs d'altération identifiés et sélection des techniques à employer

Comme nous l'avons vu dans la partie portant sur l'analyse réglementaire des ovoproduits (3.3.3), les critères réglementaires actuels sont principalement basés sur des tests microbiologiques et sur la détection des acides succinique et acétique pour ce qui est des contaminations bactériennes. Ces tests permettent de se prémunir de l'utilisation de matière première contaminée mais ne permettent pas d'évaluer l'état de fraîcheur ou de détecter une possible altération microbiologique en cours. Les différentes approches développées pour l'étude de la qualité des œufs et de l'altération des ovoproduits au cours des dernières décennies n'ont pas mené à la redéfinition ou à l'ajout de critères réglementaires suffisants pour compléter ceux existants. Les développements dans le domaine de l'analyse de la qualité et de l'altération des œufs et des ovoproduits au cours des dernières décennies et décrits dans la littérature donnent souvent des informations contradictoires quant à l'utilité ou au potentiel d'un même marqueur, rendant difficile leur évaluation et leur utilisation. Certains des marqueurs proposés présentent des inconvénients majeurs, d'autres impliquent des difficultés techniques pour la détection et l'analyse. Un récapitulatif des avantages et inconvénients présentés dans la littérature pour les principaux marqueurs identifiés comme représentatifs de l'altération des œufs ou ovoproduits est présenté dans le Tableau 24.

Marqueur	Avantages	Inconvénients	Type d'altération
Acide pyroglutamique	Augmentation au cours du stockage	Variabilité naturelle, contraintes techniques pour l'analyse par spectrométrie de masse	Physico-chimique
Furosine	Augmentation au cours du stockage, Hautement spécifique des réactions précoces de Maillard, non impacté par la pasteurisation	Faible augmentation dans des conditions de conservation normales – plus adapté pour des produits à base d'œuf ou ovoproduits ayant subi des traitements thermiques (ex: séchage par atomisation)	
Tocophérols et rétinols	Augmentation au cours du stockage		
Cholestérol et COP's			
Uracile	Métabolite bactérien, non affecté par la pasteurisation	Détectable uniquement dans le cas de produits très contaminés	Microbiologique
Acides acétique et lactique	Métabolites bactériens, non affectés par la pasteurisation	Sensibilité des méthodes de détection employées	
Acide succinique	Métabolite bactérien	Thermosensible (sensible à la pasteurisation)	

Tableau 24. Récapitulatif des avantages et inconvénients présentés dans la littérature pour les principaux marqueurs identifiés comme représentatifs de l'altération des œufs ou des ovoproduits.

A l'exception de l'acide acétique et de l'acide lactique, actuellement utilisés comme critères réglementaires relatifs à la production et à la commercialisation des ovoproduits, les marqueurs proposés concernant l'altération microbiologique présentent tous des inconvénients importants n'ayant jusqu'ici pas permis leur application pour la détection de l'altération des EL en milieu industriel.

La découverte de nouveaux marqueurs d'altération permettant la détection précoce de l'altération est donc nécessaire au développement de nouveaux systèmes de conduite de procédés permettant un meilleur contrôle de la qualité et de l'altération des ovoproduits en milieu industriel. Un certain nombre de marqueurs identifiés dans le cadre de ces travaux bibliographiques (Tableau 25) présenteraient le potentiel suffisant pour servir de marqueurs précoces de l'altération microbiologique.

Tableau 25. Marqueurs potentiels de l'altération des EL

Composé	Origine du composé
Acides gras d'origine bactérienne	Elément structurel bactérien
N-acyl Homosérine lactones et AI2	Composés impliqués dans la communication bactérienne
Glucose	Substrat bactérien
Acide lactique	
Acide formique	
Ethanol	
3-hydroxybutanone (acétoïne)	
2,3-butanedione (diacétyle)	
Acide acétique	
1-hexanol	
Acide hexanoïque	
Acide butanoïque	Composés du catabolisme bactérien
2-butanone	
2-heptanol	
2-méthylpropanol	
3-méthylbutanal	
Disulfure de diméthyle	
Benzaldéhyde	
Trisulfure de diméthyle	
Propanoate d'éthyle	
Butanoate d'éthyle	

Les techniques sélectionnées dans le cadre de ce projet pour l'analyse des échantillons devront donc offrir la meilleure couverture possible de ces composés et ce, dans le but de confirmer ou non leur potentiel pour la détection de l'altération (approche ciblée) tout en permettant la mise en évidence de nouveaux composés qui n'étaient jusqu'ici pas décrits comme impliqués ou représentatifs de l'altération des ovoproduits (approche non ciblée).

Un récapitulatif des avantages et inconvénients des principales techniques de métabolomique pour l'étude de l'altération des ovoproduits est présenté dans le Tableau 26.

Tableau 26. Avantages et inconvénients des principales techniques de métabolomique pour l'étude de l'altération des EL

Technique	Avantages	Inconvénients	Type d'approche
Spectroscopie vibrationnelle	Préparation simple de l'échantillon, permet d'identifier et de quantifier (en relatif) les grandes classes de molécules	Ne donne pas accès aux informations détaillées sur les métabolites, faible sensibilité	non ciblée
MIR (FTIR)	Analyse rapide, bases de données des vibrateurs disponibles	Impact de l'eau	
SPIR		Etalonnage complexe, sensibilité faible	
Raman	Analyse rapide	Manque de bases de données spécifiques au domaine agroalimentaire, sensible aux phénomènes de fluorescence des échantillons	
Spectrométrie de masse et RMN	Sensibilité, finesse	Nécessité d'ajouter des étapes de préparation des échantillons (déprotéination, séparation en fractions métaboliques), temps d'analyse, analyse des données complexe	ciblée / non ciblée
GC-MS	Sensibilité, bases de données de spectres largement disponibles, capacité de profilage non ciblé	Nécessité d'ajouter une étape de dérivation pour l'étude des composés polaires et thermolabiles	
LCMS	Sensibilité, capacités de profilage ciblé	Présence de nombreux adduits rendant l'interprétation plus complexe	
RMN	Non sélectivité, répétabilité	Sensibilité plus faible que la MS	

Les techniques de spectroscopies vibrationnelles et les techniques plus résolutive basées sur la spectrométrie de masse ou la RMN sont complémentaires et permettraient d'étudier l'altération des EL de deux façons distinctes : une approche plus macroscopique correspondrait à la caractérisation des principaux groupes de macromolécules présents dans l'échantillon et employant la spectroscopie vibrationnelle et une approche plus fine de caractérisation des profils de métabolites qui emploierait des méthodes plus résolutive (RMN ou MS).

Pour l'approche par spectroscopie vibrationnelle, bien que ces techniques soient complémentaires, la spectroscopie MIR (FTIR) semble présenter le meilleur compromis parmi les

techniques présentées dans le Tableau 26. La forte contribution de l'eau à ces analyses peut être simplement contournée par l'ajout d'une étape de séchage non destructive, et la disponibilité des tables d'annotation de vibrateurs simplifie l'interprétation des analyses effectuées. De plus cette technique est simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas d'étalonnage complexe. Un spectromètre FTIR équipé d'un lecteur de microplaque 384 puits est disponible au laboratoire GEPEA, ce qui permettra une utilisation régulière de cette technique pour le suivi de routine de l'altération.

Dans le cadre de l'approche fine de caractérisation des profils de métabolites, la technique la plus adaptée pour effectuer à la fois un profilage ciblé et non ciblé semblerait être la GC-MS. La possibilité d'accéder à des bases de données étoffées pour l'annotation des composés inconnus, associée à une importante reproductibilité des résultats analytiques sont des arguments allant dans ce sens. La disponibilité d'un système GC-MS au laboratoire en ferait de plus un outil de routine adapté pour les investigations sur l'étude de l'altération des ovoproduits, moyennant des développements méthodologiques adaptés aux spécificités de cette matrice (préparation des échantillons, optimisation des paramètres d'analyse, ...).

Des analyses complémentaires en RMN à haut champ magnétique pourraient de plus permettre de confirmer l'identification des marqueurs potentiels détectés et de mettre en évidence des marqueurs complémentaires non mesurés par GC-MS. La possibilité d'établir des prestations avec le service d'analyse métabolomique par RMN porté par la cellule de compétences Spectromaîtrise du CEISAM (équipe EBSI), nous permettrait également d'envisager d'accéder, de manière plus ponctuelle, à des spectromètres RMN à haut ou très haut champ magnétique (500 ou 700MHz, équipés de cryo-sondes).

Des analyses complémentaires par LC-MS pourraient également permettre de confirmer l'identification des marqueurs détectés par GC-MS (obtention des formules brutes, élucidation structurale) et de profiler plus finement certains composés ciblés, notamment ceux présents en quantité très faible comme les molécules du quorum sensing.

6 Conclusion du chapitre et rappel des objectifs

L'industrie française des ovoproduits est un secteur important en termes de volumes de production et d'échanges. Elle présente également d'importantes perspectives de croissance. L'ovoproduit représentant le plus gros volume d'échange et de production est l'entier liquide, pour lequel des phénomènes ponctuels d'altération sont constatés en industrie, engendrant ainsi de régulières pertes de produits et des complications pour les clients.

Il est aujourd'hui nécessaire de mieux comprendre et de mieux maîtriser ces phénomènes d'altération. Les marqueurs d'altération étudiés jusqu'ici (concernant l'altération microbiologique) présentent tous des inconvénients importants et ne peuvent pas être utilisés pour la détection ou la prédiction de ce phénomène en milieu industriel. L'évaluation de la pertinence des marqueurs identifiés dans la bibliographie et/ou la découverte de nouveaux précurseurs qui permettraient la détection précoce de l'altération des ovoproduits est donc nécessaire au développement de nouveaux systèmes de contrôles de procédés.

On se propose donc dans ce projet de thèse d'évaluer les techniques sélectionnées à l'issue de l'étude bibliographique (GC-MS, RMN, FTIR). Elles devront offrir la meilleure couverture possible de ces composés d'intérêt et ce dans le but de confirmer ou non leur potentiel pour la prédiction ou la détection d'une altération (approche ciblée). Ces approches seront également considérées sous un second angle, pour la mise en évidence de nouveaux marqueurs qui n'étaient jusqu'ici pas décrits comme impliqués ou représentatifs de ce phénomène (approche non ciblée). Pour atteindre ces objectifs, il sera nécessaire de proposer de nouveaux développements méthodologiques. Un protocole de préparation des échantillons avant analyse (prétraitements) devra être développé de façon à induire le minimum de biais lors des évaluations des techniques d'analyses. Une fois ces dernières validées en termes de robustesse et de pertinence, il sera envisagé de les tester sur échantillons industriels puis de les exploiter lors de cinétiques d'altération pour la découverte de marqueurs précoces de l'altération. Les informations recueillies dans ces travaux de thèse et croisées avec les données microbiologiques, biochimiques, et physico-chimiques des partenaires du projet ALTOVOP devraient finalement permettre de proposer des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans les phénomènes d'altération.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes

1 Produits chimiques et réactifs

L'eau ultra pure est produite à l'aide d'un système Milli-Q (Elix Technology inside advantage 3, Millipore, France). Tous les standards, réactifs et solvants proviennent de chez Sigma-Aldrich (France) et sont au minimum de qualité HPLC. Les milieux de cultures et additifs pour milieux de cultures proviennent de Sigma-Aldrich (France) et Merk (France). Les filtres utilisés pour la filtration des EL proviennent de Sarstedt (France). Les solutions d'étalonnage du pH-mètre Sentron SI600 proviennent de Sentron NL (Pays bas). Les tubes Falcons 15mL et 50mL, les tubes centrifuges 2mL, les vials 8mL et vials d'injections 2mL et 0,2 mL à insert proviennent de Fisher Scientific (France) et VWR (France).

2 Origine des échantillons d'EL

Les entiers liquides analysés proviennent des partenaires industriels et académiques du projet ou ont été préparés à façon au laboratoire à partir d'œufs en coquille du commerce.

2.1 Echantillons industriels

Les échantillons industriels sont collectés en fonction de leur état et de leur usage final. Une collecte d'échantillons sains et altérés (à différents stades d'altération) a été réalisée en 2015 auprès des partenaires industriels du projet. Ils ont été acheminés par transport frigorifique à 4°C aux laboratoires de la société ADRIA Développement pour analyse où ils ont été conservés au congélateur à -20°C dans des pots à prélèvement stériles de 200mL, puis transférés au laboratoire GEPEA par transport frigorifique à une température inférieure à -20°C. Des échantillons sains provenant des chaînes de production des différents industriels partenaires ont été acheminés au laboratoire GEPEA au besoin par transport frigorifique à 4°C, conditionnés en bouteilles d'un litre, pour le développement des protocoles analytiques.

2.2 Echantillons préparés en laboratoire

2.2.1 Préparation d'EL au laboratoire

Des échantillons d'EL stériles (préparés dans des conditions strictes de stérilité) et non stériles sont préparés en laboratoire (selon le protocole de S.Jan) pour l'analyse de la variabilité de la matière

première, de l'impact de la congélation ainsi que pour l'analyse cinétique de la dégradation microbiologique à partir d'œufs coquilles achetés en grande surface. Les œufs utilisés sont de calibre moyen et issus de systèmes d'élevage en cage (afin de limiter la contamination externe des œufs et de faciliter leur lavage). Les œufs sales ou présentant des fêlures ou micro-fêlures sont éliminés. Tous les œufs utilisés pour chacune des analyses proviennent du même lot de production et la préparation des EL est réalisée sept à dix jours après le jour de ponte.

Les œufs sont nettoyés par frottement à l'aide d'un papier absorbant afin d'éliminer les souillures puis enduits d'éthanol 70% à la pissette dans un contenant préalablement nettoyé à l'éthanol 70%. Une allumette est ensuite placée dans le contenant afin de flamber très rapidement la surface des œufs (moins de 10 s), la flamme est éteinte à l'aide d'un couvercle nettoyé à l'éthanol 70%. La suite des manipulations est réalisée dans des conditions de stricte stérilité (dans la zone de stérilité d'un bec Bunsen). Les œufs sont cassés sur un bécher stérile de façon à éviter le contact entre le contenu interne de l'œuf et l'extérieur de la coquille, le contenu de l'œuf est versé dans un bécher de 250 mL. L'opération est répétée jusqu'à quatre fois en fonction du volume d'EL souhaité. Le contenu des béchers contenant des fragments de coquille issus de l'étape de cassage est éliminé. La préparation est ensuite homogénéisée à l'aide d'un Ultraturax IKA T18 (IKA, Allemagne) équipé d'un axe stérile à usage unique (S18D-14G, IKA, Allemagne) à 9500 rpm pendant une min. Si plus de 200 mL sont nécessaires, l'EL est préparé en plusieurs opérations afin de limiter les pertes occasionnées par la détection de fragments de coquilles dans les EL.

L'EL est ensuite aliquoté en tubes Falcon stériles de 15 mL ou 50 mL en fonction du volume de culture souhaité.

2.2.2 Contrôle de stérilité des EL

La stérilité des échantillons d'EL stériles préparés au laboratoire est vérifiée après ensemencement d'un mL dans la masse d'une gélose de tryptone de soja ou TSA (Trypton Soy Agar, Merck) et incubation 24h à 37°C. Si aucune colonie n'est présente après 24h d'incubation l'EL préparé est considéré comme stérile, dans le cas contraire les échantillons sont éliminés.

3 Cultures microbiologiques

3.1 Origine des souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées pour l'étude cinétique de l'altération microbiologique des EL proviennent du laboratoire STLO de l'INRA. Elles ont été préparées pour inoculation par la société ADRIA Développement. Ces souches proviennent d'échantillons d'EL industriels issus d'une large

collecte d'échantillons sains et altérés réalisée auprès des partenaires industriels du projet et sont représentatives de deux modes de dégradation distincts identifiés par ces derniers. Les deux souches bactériennes utilisées dans le cadre de ce projet sont une souche de *Bacillus weihenstephanensis* et une souche d'*Enterococcus faecium*.

3.2 Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes fournies par la société ADRIA Développement conditionnées en tubes Falcon 15 mL stériles sont stockées à -20°C en présence de glycérol et sont décongelées à façon pour la réalisation des études cinétiques de l'altération microbiologique des EL.

3.3 Milieux de culture

La décongélation et le repiquage sont réalisés dans un milieu BHI (Brain Heart Infusion, Sigma-Aldrich, France) additionné d'extrait de levure (BHI-YE). Le contrôle de stérilité des EL est réalisé dans une gélose TSA (Merck, France) et le milieu tryptone sel (TS) est lui utilisé pour les dilutions en cascade de l'inoculum. La composition des milieux modifiés ou préparés au laboratoire est présentée dans le Tableau 27.

Tableau 27. Composition des milieux de culture modifiés ou préparés au laboratoire

BHI-YE	Tryptone Sel (TS)
On ajoute 10 g/L d'extrait de levure au milieu BHI agar (Sigma-Aldrich, France)	1g/L de tryptone, 8,5 g/L de NaCL

3.4 Précultures

Les souches bactériennes sont décongelées deux jours avant le lancement d'une étude cinétique de l'altération microbiologique des EL (selon le protocole de S. Jan). 10 mL de milieu BHI-YE sont ajoutés dans un tube Falcon de 15 mL contenant la souche (préalablement sorti du congélateur) à l'aide d'une pipette 10 mL à usage unique. Le tube est agité au vortex 10 s à 3000 rpm et incubé 24h à 30°C sans agitation. Les souches sont repiquées à l'issue de cette période d'incubation. 10mL de milieu BHI-YE sont placés dans un tube Falcon stérile de 15 mL. 200 µL de la suspension bactérienne mise en culture la veille sont ajoutés, le tube est agité par vortex pendant 10 s à 3000 rpm et incubé 18h à 30°C sans agitation.

3.5 Ensemencement

L'ensemencement est réalisé sur les échantillons d'EL préparés stérilement, aliquotés en tubes Falcon 15 ou 50 mL (selon de protocole de S. Jan). Les suspensions bactériennes sont diluées au dixième en cascade afin d'effectuer l'inoculation à 3,3 log UFC.mL⁻¹. Pour la souche *Bacillus*

weihenstephanensis dont la concentration est d'environ $8 \log.\text{mL}^{-1}$ après 18h de croissance en conditions optimales, trois dilutions au dixième sont réalisées en milieu de conservation TS afin de ramener la concentration cellulaire à environ $5 \log.\text{mL}^{-1}$. Pour la souche d'*Enterococcus faecium* dont la concentration est d'environ $9 \log.\text{mL}^{-1}$ après 18h de croissance en conditions optimales, quatre dilutions aux dixièmes sont réalisées. La dilution finale est ensuite inoculée à 2% dans un échantillon d'EL. 200 μL de cette solution sont placés dans un tube contenant 10 mL d'EL stérile en conditions de stricte stérilité. Le tube est ensuite agité au vortex pendant 10 s à 3000 rpm et placé dans un bac de glace jusqu'à inoculation du nombre souhaité de tubes. Une fois tous les tubes prêts ils sont incubés sans agitation à la température souhaitée (8°C pour les études cinétiques de l'altération). Pour chaque tube ensemencé, un tube préparé selon le même protocole à l'exception de l'étape d'inoculation est également incubé pour servir de témoin négatif.

3.6 Contrôle des paramètres de culture

3.6.1 Contrôle de la stérilité des souches

La stérilité des souches est vérifiée visuellement après incubation 24h à 37 °C d'un étalement au râteau de 0,1 mL de préculture sur une gélose TSA. Les caractéristiques macroscopiques des colonies (taille, forme, couleur, bords crénelés ou lisses, etc.) sont observées. Si plus d'un type de colonie est présent, les échantillons bactériens et les échantillons d'EL ensemencé sont éliminés.

3.6.2 Croissance des souches

La croissance des souches ne fait pas l'objet d'un suivi au cours des précultures ou des études cinétiques d'altération microbiologique des EL. Leur croissance a été caractérisée par les laboratoires STLO et LUBEM et la société ADRIA Développement dans des conditions strictement identiques à celles employées dans le cadre de ces études en termes de conditions de décongélation et de repiquage, de milieu de culture et de température d'incubation.

Les cultures correspondant aux deux études cinétiques d'altération microbiologique des EL sont réalisées à 8°C dans une étuve à double cuve INCU-Line® Tower (VWR, France). Les tubes sont disposés de manière à ne pas bloquer les flux d'air à l'intérieur de l'étuve. La température n'est pas suivie au cours des manipulations. Elle a été vérifiée sur l'étuve chargée de tubes contenant de l'eau en quantité équivalente au volume maximum d'EL utilisé lors d'une étude cinétique. Pour cela un thermocouple relié à un système d'enregistrement des données est employé durant une semaine à température ambiante (correspondant à la température de la pièce (climatisée)) au cours des études cinétiques d'altération microbiologique de l'EL. Une amplitude de variation inférieure à 1°C a été observée sur cette période.

4 Méthodes de préparation des échantillons

L'EL est une matrice complexe, opaque, présentant une viscosité importante et contenant des macromolécules abondantes pouvant être un handicap dans le cadre de l'utilisation de certaines techniques d'analyse hautement résolutive (GC-MS, RMN). Ainsi certaines étapes de préparation d'échantillons ont été développées avant de procéder à leur analyse.

4.1 Prétraitements

4.1.1 Déprotéination des échantillons

4.1.1.1 *Déprotéination à l'acide perchlorique*

2g d'EL sont placés dans un tube Falcon 15 mL ; 1,8 mL d'eau ultrapure, 4,8 mL de solution d'acide perchlorique à 6% et 0,6mL d'acétonitrile sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé sur un balancier à 40 rpm. Après 15 min de repos suivies de 30 s d'agitation au balancier à 40 rpm, l'homogénéité du tube est vérifiée (absence de matière non solubilisée dans le fond du tube). Si toute la matière n'est pas solubilisée, l'agitation est complétée de façon manuelle jusqu'à dissolution complète. La solution est transférée dans des tubes centrifuges 2mL afin d'être centrifugée à 10400 rpm (7250 RCF) dans une centrifugeuse Minispin® (Eppendorf, France). Le surnageant est récupéré par versement et filtré à travers une membrane ou un filtre présentant des pores de 0,45 µm. Les échantillons sont ensuite séchés (4.1.3).

4.1.1.2 *Déprotéination à l'acétone / éthanol*

1g d'EL est placé dans un tube Falcon 15 mL, 4 mL d'acétone ou d'éthanol à -20°C sont ajoutés. Le mélange est agité au vortex pendant 30 s à 3000 rpm. Après 1 h de stockage à -20°C le contenu des tubes est transféré dans des tubes centrifuges 2 mL afin d'être centrifugé à 13400 rpm (12000 RCF) dans une centrifugeuse Minispin® (Eppendorf, France). Le surnageant est récupéré par versement. Les échantillons sont ensuite séchés (4.1.3).

4.1.1.3 *Déprotéination à l'acétone / éthanol – protocole pour l'étude de l'impact du taux de solvant*

400µL d'EL sont placés dans un tube centrifuge 2mL, un vial de 8mL ou un tube Falcon de 50mL dans lesquels une quantité précise d'acétone / éthanol à -20°C sont ajoutés (Tableau 28). L'échantillon est agité au vortex pendant 30 s à 3000 rpm, après une durée précise d'incubation à -20°C, (30 min, 1 h, 2 h ou 4 h), les échantillons sont centrifugés 10 min à 13400 rpm (12000 RCF) dans une centrifugeuse Minispin® (Eppendorf, France) pour les tubes de 2 mL ou à 6000 rpm (4400

RCF) dans une centrifugeuse Mikro 22-R (Hettich, Allemagne) pour les vials de 8 mL et les tubes de 50 mL. Le surnageant est récupéré dans un tube de même type par versement à travers une pipette pasteur dans laquelle on a formé un filtre en laine de verre tassée. Les échantillons sont ensuite séchés (4.1.3).

Tableau 28. Ratios de solvants de déprotéination

EL	Solvant de déprotéination	Ratio Solvant / EL	Ratio Matière Sèche	Type de tube
400µl	1,6ml	X4	X20	Centrifuge 2ml
400µl	3,2ml	X8	X40	Vial 8ml
400µl	4ml	X10	X40	Vial 8ml
400µl	6ml	X15	X56	Vial 8ml
400µl	32ml	X80	x400	Falcon 50 ml

4.1.1.4 Déprotéination à l'acétone / éthanol – protocole pour l'étude cinétique d'altération des EL

400µL d'EL sont placés dans un tube centrifuge 2 mL ; 1,6 mL d'acétone / éthanol à -20°C sont ajoutés. L'échantillon est ensuite agité au vortex pendant 30 s à 3000 RPM. Après une durée de 30 min à -20°C, les échantillons sont centrifugés à 13400 rpm (12100 RCF) dans une centrifugeuse Minispin® (Eppendorf, France). Le surnageant est récupéré par versement dans un nouveau tube centrifuge 2mL. Les échantillons sont ensuite séchés (4.1.3).

4.1.2 Séparation en fractions métaboliques

4.1.2.1 Séparation à l'aide d'un mélange de solvants ternaire

Différents mélanges ternaires MCW (pour Méthanol / Chloroforme / Eau) sont utilisés, leur composition initiale est présentée dans le Tableau 29.

Tableau 29. Composition initiale des mélanges MCW (donnée pour 100ml de mélange)

	Méthanol		Chloroforme		Eau	
	Fraction volumique	Volume (mL)	Fraction volumique	Volume (mL)	Fraction volumique	Volume (mL)
MCW - A (10/3/1)	10	71,43	3	21,43	1	7,14
MCW - B (4/3/1)	4	50,00	3	37,50	1	12,50
MCW - C (1/1/0,1)	1	47,62	1	47,62	0,1	4,76

On ajoute 1 mL de mélange MCW à l'échantillon séché (à l'issue de l'étape de déprotéination). L'échantillon est agité au vortex pendant 5 s à 3000 rpm puis plongé dans un bain à ultrason (Fisherbrand FB15046, Fischer-Scientific, France) trois fois 5 s avec 5 s hors du bain entre

chaque plongée, avant d'être à nouveau agité au vortex pendant 5 s à 3000 rpm. Une fois l'échantillon complètement dissout, il est transféré dans un tube centrifuge 2mL. Une quantité précise d'eau est ajoutée en fonction du mélange MCW (Tableau 30), puis l'échantillon est à nouveau agité au vortex pendant 5 s à 3000 rpm. L'échantillon est ensuite centrifugé à 13400 rpm (12100 RCF) dans une centrifugeuse Minispin® (Eppendorf, France) afin de faciliter la séparation des phases induite par la nouvelle composition du mélange ternaire (Tableau 31). Un volume précis de phase polaire est récupéré à l'aide d'une micropipette à dépression positive et placée dans un vial 2 mL. La fin de la phase polaire est éliminée (avec les quelques résidus protéiques qui peuvent se former à l'interphase) à l'aide d'une pipette pasteur. Une faible quantité de phase apolaire est également éliminée lors du processus afin de limiter la contamination de cette dernière par les restes de phase polaire lors du prélèvement. Un volume précis de la phase apolaire est ensuite récupéré à l'aide d'une micropipette à dépression positive et transféré dans un vial 2 mL. Les échantillons sont ensuite séchés (4.1.3) après ajout de l'étalon interne (5.2.1.4).

Tableau 30. Quantité d'eau ajoutée pour déphasage des mélanges MCW

	Eau (mL)
MCW - A	0,750
MCW - B	0,125
MCW - C	0,250

Tableau 31. Composition finale des mélanges MCW (données pour 100 mL de mélange)

	Méthanol		Chloroforme		Eau	
	Fraction volumique	Volume (mL)	Fraction volumique	Volume (mL)	Fraction volumique	Volume (mL)
MCW - A (10/3/11,5)	10	40,82	3	12,24	11,5	46,94
MCW - B (4/3/2)	4	44,44	3	33,33	2	22,22
MCW - C (1/1/0,625)	1	38,10	1	38,10	0,625	23,81

4.1.3 Séchage des échantillons

Les échantillons doivent être séchés après différentes étapes de préparation (déprotéination, fractionnement MCW, dépôt sur microplaque en silice). Ils sont évaporés sous flux d'azote, à l'aide d'un évaporateur centrifuge de type Speedvac (4.1.3.2), par lyophilisation ou encore séchés sous vide dans un dessiccateur en fonction de leur nature, de leur volume et de leur utilisation finale.

4.1.3.1 *Evaporation sous flux d'azote*

L'évaporation sous flux d'azote est une méthode largement répandue et très accessible. Elle est simple d'utilisation et ne nécessite que peu de matériel, c'est une méthode d'évaporation très

efficace pour les solutions volatiles mais parfois chronophage pour les solutions moins volatiles, les lots d'échantillons et les volumes importants.

L'évaporateur sous flux d'azote est constitué d'une bouteille d'azote L50 de 9,9 m³ (Airliquide, France), de trois manomètres, un principal servant à contrôler la pression de la bouteille, un secondaire monté en ligne permettant de réguler le débit du flux d'azote et un tertiaire plus fin (doté d'unités arbitraires) positionné à l'entrée de l'évaporateur et permettant d'affiner le contrôle du flux dans les échantillons, d'un filtre à air et d'un évaporateur à azote cylindrique à aiguille à 12 canaux monté dans un bain marie équipé d'un système d'élévation des échantillons servant à faciliter leur immersion partielle pendant le séchage (Figure 28).



Figure 28. Évaporateur sous flux d'azote

- *Préparation et déroulement d'un cycle d'évaporation*

Le manomètre principal est totalement ouvert, le manomètre secondaire est réglé à 0,25 bar, le manomètre tertiaire est réglé de visu en constatant le trouble de la surface de l'échantillon provoqué par le flux d'azote. Le bain marie est réglé à 38°C afin de permettre une évaporation rapide tout en limitant la dégradation des composés thermolabiles au cours de l'étape de séchage. Les aiguilles sont nettoyées à l'aide d'un papier absorbant imbibé d'acétone et plongées dans un vial 8mL contenant de l'acétone sur une profondeur d'au moins 4 centimètres, afin d'éviter les problèmes de contamination

inter échantillons liés à l'évaporation successive de plusieurs échantillons sur une même aiguille. Les échantillons sont ouverts et placés légèrement inclinés dans les emplacements du portoir de l'évaporateur. Les aiguilles sont placées à quelques millimètres de la surface du liquide et abaissée régulièrement à ce même niveau au cours du séchage. L'apparence des échantillons est régulièrement contrôlée et ils sont retirés du portoir et refermés sous atmosphère azotée une fois secs. Les échantillons sont ensuite traités de façon extemporanée ou conservés de manière adaptée (4.2).

4.1.3.2 *Evaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif*

Dans le cas de l'évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif, le séchage est effectué à basse pression. Les tubes sont placés dans un rotor dont la vitesse de rotation (environ 1000 rpm) permet de maintenir les solutions au fond des tubes et d'éviter la perte d'échantillon en cas d'ébullition. C'est une méthode couramment utilisée pour les applications ou les culots (matière restante après séchage) doivent être remis en solution (comme en protéomique) et pour les campagnes d'expérience incluant de nombreux échantillons. Cette méthode de séchage est plus complexe à l'utilisation car elle nécessite différents essais avant d'être mise en place pour éviter, par exemple des pertes de matière liées à la projection d'une partie des échantillons hors des tubes lors de l'ébullition des composés denses et volatils (comme le chloroforme).

L'évaporateur rotatif est constitué d'un évaporateur centrifuge de type SpeedVac (SPD121P, Savant, France) équipé d'un système de chauffage radiatif par infrarouge monté dans le couvercle de la chambre d'évaporation, d'un piège à solvants de type SpeedTrap (Mivac, Gennevac, France) et d'une pompe à vide à palette (ILMVAC 115024, Welch, Allemagne) (Figure 29). La liaison des différents éléments du montage est effectuée de manière à ce que l'air aspiré par la pompe à vide traverse le SpeedTrap dès la sortie de la chambre d'évaporation. Différents rotors sont utilisés en fonction de la forme et du volume des tubes, RH24-18 (Savant, France) pour les vials de 4 mL et RH60-1240 (Savant, France) pour les vials de 2mL et les tubes Eppendorf de 2 mL.



Figure 29. Evaporateur de type SpeedVac

- *Préparation et déroulement d'un cycle d'évaporation*

Le piège à solvant est allumé 20 min avant le lancement d'une manipulation de séchage afin qu'il ait atteint sa température de travail et effectué un dégivrage automatique au moment du lancement. La pompe à vide est préchauffée pendant 20 min. La cuve de l'évaporateur est préchauffée par conduction, rotor installé, avec le système de préchauffage intégré à la chambre d'évaporation. L'étanchéité du système est systématiquement vérifiée par le lancement d'un cycle à vide, le cycle de vérification est interrompu dès que l'opérateur constate que la pression interne du système chute à vitesse habituelle (environ 10 mbar par s entre 1000 et 800 mbar). Les échantillons sont ouverts et placés sur le portoir de l'évaporateur centrifuge, de manière équilibrée, le plus rapidement possible afin de limiter la variation de température entre les échantillons. La porte de la chambre est ensuite fermée et le cycle de l'évaporateur lancé. Une fois la vitesse nominale du rotor atteinte (environ 1000 rpm), le système de chauffage radiatif par infrarouge est activé et un clapet s'ouvre afin de permettre la chute de pression dans la chambre d'évaporation. Le cycle de la pompe à vide est alors lancé automatiquement.

Différents paramètres sont configurés lors du lancement d'un cycle d'évaporation, les paramètres correspondant aux cycles utilisés sont décrits dans le Tableau 32.

Tableau 32. Paramétrage des cycles d'évaporation à l'aide de l'évaporateur rotatif

	Volume (μ L)	Tubes	Température de préchauffage (°C)	Durée du cycle d'évaporation (min)	Temps de chauffage radiatif (min)
Standards	100 μ L	Vial 2mL / Vial 400 μ L	40 (45*)	60	45
Surnageants de déprotéination	$\approx$ 1,6 mL	Tube Eppendorf 2 mL	40 (45*)	90	90
Fractions polaires issues de la séparation MCW	500 μ L	Vial 2mL	40(45*)	35	30

* Le système est préchauffé à 45°C puis refroidi à 40 °C à l'air ambiant afin d'optimiser l'homogénéité de la température dans la chambre d'évaporation.

- *Paramétrage de la pompe à vide*

Les cycles de la pompe à vide peuvent être effectués à pression fixe, contrôlée manuellement ou configurée sous forme de rampes de pression. Les rampes de pression employées sont présentées dans le Tableau 33.

Tableau 33. Paramétrage des rampes de pression

	Volume (μ L)	Pression de départ (mbar)	Durée de la rampe (min)	Pression finale (mbar)	Durée du cycle de pompage (min)	Temps de chauffage radiatif (min)
Standards	100 μ L	72	30	32	60	45*
Surnageants de déprotéination	$\approx$ 1,6 mL	8	-	8	90	80*
Fractions polaires issues de la séparation MCW	500 μ L	100	5	8	35	30*

*Le temps de chauffage est indicatif, le système de chauffage radiatif doit être arrêté si la température de la chambre dépasse 56°C (risques de perte d'échantillons). Les échantillons doivent être sortis du portoir dès l'arrêt du cycle en raison de la température finale élevée du rotor.

4.1.3.3 Lyophilisation

Les échantillons d'EL destinés à certaines analyses spectroscopiques sont lyophilisés dans un lyophilisateur Alpha 1-2 LD (Christ, Allemagne) équipé d'une pompe à vide à palette RZ 2.5 (Vacuubrand, Allemagne). Les échantillons sont congelés à -20°C pendant au moins une nuit puis placés dans des portoirs, assez distants les uns des autres, afin de limiter les risques de contamination inter échantillons en cas d'éjection de matière lors de la baisse de pression. Les tubes sont entrouverts de manière à laisser passer les gaz (environ un demi-tour de bouchon). Le cycle de lyophilisation est alors lancé. Ce dernier comporte deux phases : une dessiccation primaire de 24 h et une dessiccation secondaire de 72 h. Ces durées peuvent être réduites pour les faibles volumes d'échantillon (<10 mL).

4.1.3.4 Séchage sous vide

Les microplaques d'analyse par IRTF sur lesquelles ont été déposés des échantillons d'EL dilués au 1/10ème sont placées sur quatre septums de vials d'injection (petite pièce non abrasive assurant initialement l'étanchéité de certains tubes et servant ici de support non destructeur pour les plaques) disposés sous les angles de cette dernière dans une enceinte hermétique dont l'étage inférieur est chargé de cristaux dessiccateurs. L'enceinte est équipée d'un couvercle, d'un robinet ainsi que d'un manomètre et est reliée à une trompe à eau elle-même montée sur un robinet. Une fois la plaque positionnée, l'enceinte est fermée à l'aide d'un couvercle disposé sur un joint torique. Un flux d'eau

est ensuite envoyé par la trompe à eau afin de faire baisser la pression dans l'enceinte. Le robinet est fermé et le flux arrêté une fois que la chambre atteint une pression inférieure à 0,2 bar. La plaque est laissée dans la chambre pour une durée minimale de 2 h après quoi la lecture des puits peut être effectuée.

4.2 Conservation des échantillons

Les échantillons d'EL industriels pasteurisés sains en conditionnement bouteille, destinés à être analysés au cours de la semaine, sont stockés à 4°C. Les échantillons altérés et ceux stockés pendant des périodes de temps plus longues sont stockés à -20°C dans des pots à prélèvement stériles. Les échantillons stériles préparés en laboratoire, conservés à 4°C, sont utilisés dans les h qui suivent leur préparation (au maximum 4h). Les échantillons lyophilisés sont conservés à -20°C dans des tubes Falcon 50 mL stériles passés sous flux d'azote. Les échantillons qui ont dû être stockés au cours de leur préparation l'ont été à une étape du protocole où ces derniers sont secs (après une des étapes d'évaporation), après passage sous flux d'azote et à -20°C pour des périodes de conservation courtes (moins de 48h) ou à -80°C pour des périodes de conservation plus longues. Les échantillons prêts à être injectés en GC-MS sont stockés secs en présence de l'étalon interne avant l'étape de dérivation à -80°C après passage sous flux d'azote.

5 Techniques d'analyses employées

5.1 Approche macroscopique

5.1.1 Mesure du pH

Le potentiel hydrogène (pH) des échantillons est mesuré à l'aide d'un pH-mètre SENTRON SI-600 (SENTRON NL, Pays Bas) équipé d'une sonde MicroFET (SENTRON NL, Pays Bas). Un étalonnage sur trois points (4-7-10) couvrant la zone de travail (5-7,5) est réalisé quotidiennement ou à chaque allumage du pH-mètre. La calibration doit atteindre un score de corrélation de 0,95. Les échantillons sont analysés directement dans leurs tubes après trois fois 5 s d'agitation au vortex à 3000 rpm. La mesure est réalisée trois fois par échantillon dans la zone centrale du tube d'analyse.

5.1.2 Colorimétrie CIE L*a*b*

Les propriétés colorimétriques des échantillons sont mesurées dans le modèle CIE L*a*b*. Le modèle CIE L*a*b* est un espace de couleur utilisé pour la caractérisation des couleurs de surface, adopté par la commission internationale de l'éclairage en 1976. Il modélise la vision humaine et permet une analyse reproductible et objective des couleurs. Ces dernières y sont décrites selon trois

composantes : la clarté L^* qui présente les informations de luminosité sur l'axe L, et les composantes a^* et b^* qui représentent les informations de couleurs sur le plan défini par les axes a (vert – rouge) et b (jaune – bleu). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un colorimètre portable PCE CSM 4 (PCE Instruments, France). L'analyse est réalisée dans des boîtes de Pétri stériles de diamètre 35mm contenant 3 mL d'échantillon. Les mesures composées de trois lectures moyennées sont effectuées trois fois par échantillon. Le colorimètre est nettoyé à l'eau, à l'éthanol 75% puis séché entre chaque mesure.

5.1.3 Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres infrarouges sont enregistrés en mode réflexion totale atténuée (ATR) pour les fractions métaboliques ou en mode transmission pour les échantillons d'EL dilués. Les mesures sont effectuées sur un spectrophotomètre IRTF (Tensor 27, Bruker, Allemagne) équipé d'un détecteur RT-DLaTGS (Room Température - Deuterated, L-alanine doped tryglycine sulfate), d'un cristal diamant (ATR platinum, Bruker, Allemagne) et d'un lecteur de microplaque HTS-XT (Bruker, Allemagne). L'acquisition, le contrôle, l'évaluation des données spectrales et les corrections de ligne de base par lot d'échantillon sont réalisés avec le logiciel OPUS/LAB v7.0122 (Bruker, Allemagne). Les paramètres d'acquisition sont fixés à 16 scans par spectre en ATR et à 30 scans par spectre pour les analyses sur microplaques (en transmission) avec une résolution de 4 cm^{-1} pour les nombres d'ondes compris entre 4000 et 400 cm^{-1} (domaine spectral du moyen infrarouge). La vitesse de balayage est de 10 kHz et l'ouverture du diaphragme est fixée à 6 mm en ATR et 3 mm en transmission.

5.1.3.1 ATR

Pour les fractions métaboliques, 5 μL d'échantillon sont déposés directement sur le centre du cristal ATR et séchés quelques s à température ambiante. Le bruit de fond est mesuré à vide sur l'air ambiant avant chaque lecture et soustrait au spectre enregistré pour l'échantillon. Les mesures sont effectuées trois fois par échantillon.

Pour les échantillons lyophilisés, une pointe de spatule d'échantillon est déposée au centre du cristal ATR et écrasée à l'aide d'un piston statique de manière à produire une couche homogène d'une épaisseur reproductible. Le bruit de fond est mesuré à vide sur l'air ambiant avant chaque lecture et soustrait au spectre enregistré pour l'échantillon. Les mesures sont effectuées trois fois par échantillon.

5.1.3.2 Transmission HTS-XT

Les échantillons d'EL sont dilués au $1/10^{\text{ème}}$ avec de l'eau ultrapure dans un tube centrifuge de 2 mL et mélangés au vortex à 3000 rpm pendant 30 s. 5 μL sont déposés sur chaque puits d'une microplaque 384 puits en silicone, (Bruker, Allemagne). La plaque est ensuite séchée (4.1.3.4), le bruit

de fond mesuré sur le puits A1 de la plaque 384 (ce puits n'est jamais utilisé pour effectuer des dépôts afin de garantir la précision de cette étape). Les mesures en mode transmission sont effectuées sur 10 puits pour chaque échantillon.

5.2 Analyses métabolomiques

5.2.1 GC-MS

Les échantillons sont analysés avec un chromatographe en phase gazeuse Trace GC Ultra (Thermo Scientific, France) couplé à un spectromètre de masse simple quadripôle ISQ (Thermo Scientific, France).

5.2.1.1 *Standards*

Différents composés d'intérêt issus du métabolisme central ou représentant un intérêt spécifique dans le cadre de cette étude ont fait l'objet d'une étude spécifique avec pour objectif le développement de la capacité d'identification formelle et de quantification de ces métabolites. Ces composés sont listés dans le Tableau 34.

Tableau 34. Liste des composés d'intérêt par famille chimique pour l'analyse par GC-MS

Acides aminés	Acides organiques	Saccharides	Acides gras	Autres
Proline	acide fumarique	glucose	5-cholesten-3B-ol-7-one	N-(B-Cetocaproyl)-DL-homoserine lactone
L-cystéine	acide succinique	arabinose	cholestérol	N-(3-Oxododécanoyl)-L-homoserine lactone
Glutamine	acide malique	xylose		
Acide glutamique	acide oxaloacétique	mannose		
L-lysine	acide oxalique	fucose		
Tryptophane	acide citrique	acide glucuronique		
L-thréonine	acide isocitrique	galactose		
L-serine	acide glyoxilique	myoInositol		
L-tyrosine	acide pyruvique	rhamnose		
L-glycine	acide a-cétoglutarique	acide galacturonique		
L-isoleucine	acide 3-indole acétique	glucosamine		
L-alanine	acide D-glycérique	fructose		
L-valine	acide lactique	acide gluconique		
L-leucine	acide 3-hydroxybutyrique			

5.2.1.2 Paramètres d'analyse

La colonne utilisée est une HP-5MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm, Agilent Technologies, France). Une injection d'un volume de 1 µL est réalisée avec un passeur d'échantillons AI/AS 3000 (Thermo Scientific, France) suivie d'un split de 25:1. Le gaz vecteur est l'hydrogène dont le débit est réglé à 1,2 mL.min⁻¹. La température de l'injecteur est de 260°C. La programmation en température employée pour l'analyse des composés silylés consiste à maintenir la température initiale de la colonne à 50°C pendant 5 min puis à l'augmenter à 280°C à une vitesse de 5°C.min⁻¹ pour être finalement conservée à 280 °C pendant 10 min. L'analyse dure environ 65 min.

La température de la ligne de transfert vers le spectromètre de masse est fixée à 250°C. La température de la source est de 300°C. Le spectromètre de masse est programmé en mode full scan avec un balayage des masses variant de 50 à 800 m/z à 0,2 s.scan⁻¹.

5.2.1.3 *Dérivation des échantillons*

Les réactifs silylants utilisés sont le BSTFA et le MSTFA, seuls ou avec un catalyseur (TMCS ou TMIS). Les réactifs sont préparés de la façon suivante : BSTFA+TMIS (1000:5, v/v), BSTFA+TMCS (99:1, v/v), BSTFA+TMCS+pyridine (99:1:100, v/v), MSTFA+TMIS (1000:1, v/v).

Les solutions de standards contenant les composés cibles et l'étalon interne (5.2.1.4) sont préparées dans l'eau ultrapure. Pour chacune des solutions de standards, on utilise la procédure suivante. 100 µL de solution standard sont séchés dans un vial de 200 µL à l'aide d'un évaporateur rotatif (4.1.3.2). Après séchage complet, 200 µL de réactifs de silylation sont ajoutés. Après dissolution complète par agitation au vortex, le vial est placé dans un bloc chauffant SBH130D (Stuart Scientific, France) à 60°C pendant 30 min, puis injecté en GC-MS.

Pour les fractions métaboliques séchées, 200 µL de réactif de silylation (MSTFA) sont ajoutés à l'échantillon. Les tubes contenant les fractions apolaires sont agités au vortex à 3000 rpm trois fois 5 s. Ceux contenant les fractions polaires sont soumis à trois cycles de la méthode suivante : l'échantillon est agité au vortex 5 s à 3000 rpm puis plongé dans un bain à ultrason Fisherbrand (Fisher-Scientific, France) trois fois 5 s avec 5 s hors du bain entre chaque plongée. Après cette étape de solubilisation, le vial est placé dans un bloc chauffant à 60°C pendant 30 min puis injecté en GC-MS.

5.2.1.4 *Etalonnage interne*

Le ribitol a été utilisé comme standard interne pour toutes les analyses de fractions métaboliques d'EL à une concentration de 0,025 g.L⁻¹. L'ajout de l'étalon interne se fait dans un échantillon liquide avant la dernière étape de séchage (précédent le stockage ou la dérivation des échantillons pour analyse).

5.2.1.5 *Analyse quantitative*

Des gammes d'étalonnage sont réalisées pour chaque standard, seul ou en mélange par famille chimique (oses, acides aminés, acides organiques) dans une gamme de concentration située entre 0,03 et 0,25 g.L⁻¹. Ces gammes d'étalonnage sont présentées dans le chapitre 3 de ce manuscrit (voir Quantification absolue des composés analysables).

5.2.1.6 *Traitement des chromatogrammes obtenus par GC-MS*

L'acquisition des chromatogrammes au format « .RAW » est effectuée avec le logiciel Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, France). Les chromatogrammes sont traités de façon manuelle pour les analyses de standards ou de façon automatique pour les analyses de fractions métaboliques.

- *Traitement manuel*

Les chromatogrammes correspondant aux analyses de standards seuls ou en mélange sont traités manuellement avec les logiciels Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) pour l'analyse visuelle et l'intégration des pics et AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, National Institute of Standard and Technology, USA) pour la déconvolution des signaux. Les pseudocomposés sont identifiés à l'aide du logiciel MS Search (National Institute of Standard and Technology, USA) par recherche de correspondance dans la base de données NIST 08 (National Institute of Standard and Technology, USA) ou dans une base de données constituée au laboratoire pour l'analyse des standards.

- *Traitement automatisé*

Les chromatogrammes correspondant aux analyses des fractions métaboliques sont transformés en fichiers NetCDF (Unidata, USA) à l'aide de l'outil de transformation intégré à Xcalibur 2.1 afin d'être traités de manière automatisée grâce à l'outil W4M (Workflow4Metabolomics)(Giacomoni *et al.* 2014). W4M est un outil collaboratif notamment basé sur le savoir-faire et les équipements de l'institut français de bio-informatique et de l'infrastructure nationale en métabolomique et fluxomique MétaboHub. Il propose des outils permettant le prétraitement des données, leur analyse statistique ainsi que leur interprétation. Différents outils de transformation ou d'analyse paramétrables sont disponibles pour chacune des opérations de traitement des données (déconvolution, filtration, normalisation, analyse statistique, annotation). Ces outils peuvent être assemblés en « workflows » d'analyses permettant l'analyse rapide et automatisée de groupes d'échantillons avec des paramètres standards préenregistrés. Le traitement des chromatogrammes est effectué via le module de prétraitement metaMS.runGC (Wehrens *et al.* 2014), utilisant une combinaison des outils CAMERA (Kuhl *et al.* 2012) et XCMS (Smith *et al.* 2006). Il permet l'obtention de tableaux de données contenant les noms et groupes des échantillons, l'intensité du signal des pseudo-composés détectés dans ces derniers, ainsi que la liste des pseudo-composés contenant leurs profils de masse et leurs index de rétention. Le traitement des données est présenté de manière plus approfondie dans le chapitre 3 de ce manuscrit (Chapitre 3, partie 3.5.3).

5.2.2 RMN ^1H

5.2.2.1 Analyses préliminaires

Les analyses par RMN sont effectuées sur des échantillons d'EL sains et altérés à différents stades de préparation. Les échantillons d'EL stériles et non stériles sont analysés sans aucune préparation, après une étape de lyophilisation et après une étape de déprotéination à l'acétone suivie d'un séchage sous flux d'azote et d'une solubilisation dans un solvant deutéré adapté. Des fractions métaboliques polaires et apolaires provenant d'échantillons déprotéinés à l'acétone ou à l'éthanol à froid sont également analysées après solubilisation dans un solvant deutéré adapté à chaque fraction.

- RMN Haut champ

Les analyses sont réalisées par E. Martineau¹⁶ sur un spectromètre RMN Avance HD 700 MHz (Bruker, Allemagne) équipé d'un aimant ASCENT (16,4 T) et d'une sonde cryogénique ATMA gradZ 5mm au laboratoire Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation, à l'Université de Nantes. Les spectres sont calibrés sur le pic résiduel de solvant (chloroforme deutéré) pour les fractions acétone apolaire et sur la raie de l'alanine pour la fraction éthanol polaire. Aucune calibration n'est réalisée pour les échantillons d'œuf lyophilisé, œuf liquide et œuf liquide stérile. Les échantillons ne sont pas tamponnés, leur pH n'est pas mesuré. Les échantillons d'EL stérile et non stérile sont dilués dans le D₂O à volume égal (350 µL d'EL et 350 µL de D₂O). Les échantillons d'EL lyophilisés sont repris dans 1 mL de D₂O ; les fractions déprotéinées à l'acétone à froid et la fraction apolaire de cette dernière sont reprises dans 700 µL d'acétone D₆. Les fractions polaires d'échantillons déprotéinés à l'éthanol à froid sont reprises dans 700 µL de D₂O. Les durées d'enregistrement varient de 14 min à 1h30. Les analyses sont réalisées en 1D (^1H , ^{13}C), en 2D homonucléaire (^1H) ou en 2D hétéronucléaire (^1H , ^{13}C) avec des séquences de type ZG30, CPMG, COSY et NOISY.

- RMN Bas Champ

Les analyses sont réalisées par B. Gouilleux¹⁷ sur un spectromètre RMN Bas Champ SPINSOLVE 43 MHz (Magritek, France) au laboratoire Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation, à l'Université de Nantes. Les échantillons étudiés sont les mêmes que les

¹⁶ SpectroMaitrise, CAPACITES SAS, Nantes, France

¹⁷ CEISAM, UMR CNRS 6230, Nantes, France

échantillons utilisés pour l'étude en RMN haut champ à l'exception des EL bruts qui sont également analysés sans ajout de D₂O en RMN bas champ. Les analyses sont réalisées en 1D (¹H) et en 2D homonucléaire (¹H).

5.2.2.2 *Analyse cinétique de l'altération microbiologique des EL*

Les analyses sont réalisées par E. Martineau sur un spectromètre RMN Avance III 500 MHz (Bruker, Allemagne) équipé d'une sonde cryogénique double accord ¹H/¹³C 5mm au laboratoire Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation, à l'Université de Nantes.

- *Préparation des échantillons*

Les échantillons sont décongelés puis on y additionne un tampon phosphate (pH 7,4) à une concentration de 0,1 mol/L dans du D₂O dans le but de favoriser la superposition des spectres. Cette solution tampon contient également de l'acide triméthylsilylpropanoïque (TSP) à une concentration de 0,987 mmol/L. Le TSP sert ici de référence pour la calibration des spectres, toujours dans l'optique de faciliter leur superposition.

- *Expérience de RMN ¹H*

L'acquisition des données est réalisée à une fréquence proton de 500,13 MHz et à une température de 303 K à l'aide du logiciel Topspin 2.1 (Bruker, Allemagne). La séquence employée est de type CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), possédant un motif de saturation du signal de l'eau sur le canal F1 (permettant l'élimination du signal nuisible des grosses molécules non filtrées lors de l'extraction des métabolites). Le nombre d'accumulations est fixé à 64.

- *Traitement des données*

Une opération de phasage des spectres et de correction de ligne de base est réalisée. Les spectres sont ensuite calibrés et les données d'intensité normalisées sur le signal du TSP à $\delta = 0$ ppm. Les données sont traitées via une étape de bucketing à l'aide du logiciel AMIX 3.8.4 (Bruker, Allemagne). L'annotation est effectuée via le logiciel NMRProcFlow (Jacob *et al.* 2017).

6 Analyses statistiques des données

Différentes méthodes d'analyses statistiques sont employées, issues des statistiques univariées et multivariées. Ces analyses sont réalisées avec les logiciels R 3.2.1 (the R Project), Sigmaplot 12.5 (Systat Software, USA) et via la plateforme Workflow4Metabolomics hébergée par l'institut français de bio-informatique et porté par Métabohub.

Les techniques de métabolomique, principalement les techniques hautement résolutives telles que la RMN ou la MS engendrent de grandes quantités de données lors d'une analyse (jusqu'à plusieurs centaines de Mo pour une analyse). Le recours à des techniques plus ou moins complexes d'analyse de données devient nécessaire à l'interprétation des données biologiques mesurées.

Deux principaux types d'approches peuvent être utilisés. Des approches de statistiques univariées et des approches de statistiques multivariées. Les statistiques univariées s'intéressent à une seule variable (ex : l'abondance d'un seul métabolite) et qualifient son évolution en fonction de sa moyenne et de sa variance. Les tests univariés incluent des tests pour comparer différents lots d'échantillons comme le t-test de Student ou l'ANOVA. Les statistiques multivariées permettent d'analyser simultanément plusieurs variables (ex : l'abondance de plusieurs métabolites), elles permettent d'étudier les moyennes et variances de chacune des variables la covariance et la corrélation entre les différentes variables mesurées (Saccenti *et al.* 2014). L'analyse par composante principale ou ACP et l'analyse discriminante des moindres carrés partiels ou PLS-DA (de l'anglais partial least squares - discriminant analysis) sont parmi les tests les plus utilisés pour l'analyse des données de métabolomique. Les approches univariées et multivariées sont complémentaires car elles permettent d'analyser l'évolution de l'abondance des marqueurs suivis de façon indépendante et en prenant en compte leur interactions.

Les principaux tests statistiques employés dans le cadre de ces travaux appartiennent aux statistiques univariées pour les mesures simples (pH, colorimétrie, suivi de culture,...) et aux statistiques univariées et multivariées pour les analyses métabolomiques. Les méthodes de calculs des indicateurs descriptifs ainsi que la liste des tests employés sont présentés dans cette partie.

6.1 Statistiques descriptives

6.1.1 Mesure du coefficient de variation

La mesure du coefficient de variation permet d'évaluer simplement la répétabilité d'une mesure ou d'un test. Cet indicateur permet d'évaluer le rapport entre l'écart type et la moyenne sous forme d'un pourcentage et de comparer simplement la répétabilité d'une analyse dans des conditions distinctes ou la répétabilité de différentes analyses.

La formule de calcul du coefficient de variation est la suivante :

$$CV = \frac{\sigma}{\mu}$$

Avec CV le coefficient de variation, σ l'écart type et μ la moyenne.

6.1.2 Mesure du Fold Change

La mesure du Fold Change permet de quantifier simplement la variation d'une mesure entre un état initial et un état final. Il permet d'évaluer le rapport entre la variation d'intensité d'une variable et la variable elle-même. Dans le cadre de cette étude, elle permet notamment de caractériser les composés détectés à travers la variation de leur abondance en fonction de leur abondance initiale. La formule de calcul du Fold Change est la suivante :

$$FC = \frac{Etat\ final - Etat\ initial}{Etat\ initial}$$

Dans le cadre de cette étude, les états initiaux et finaux vont correspondre à des abondances mesurées pour des composés donnés à différents stades de l'altération (début d'altération pour l'état initial et fin d'altération pour l'état final par exemple). Le résultat du Fold Change est une valeur numérique. Si aucune variation n'est mesurée entre l'état initial et l'état final, le Fold Change sera de 0, si une variation de +100% est observée (si la valeur double), le Fold Change sera alors de 1, si une variation de -50% est observée (si la valeur est diminuée de moitié) le Fold Change sera alors de -0,5.

6.1.3 Calcul de l'Ecart Interquartile (EI)

Dans un souci de lisibilité, les distributions sont présentées sous la forme de box plots (boîtes à moustaches), des données descriptives sont également présentées en complément. Parmi ces données sont présentés les moyennes, les médianes et les écarts interquartiles permettant de quantifier simplement la dispersion de la distribution. La formule de calcul de ces écarts interquartiles est la suivante :

$$EI = Q_3 - Q_1$$

Avec EI l'écart interquartile (ou étendue interquartile), Q3 le troisième quartile et Q1 le premier quartile. Les quartiles étant les valeurs d'une distribution qui divisent les données en quatre parts égales.

6.2 Statistiques univariées

6.2.1 Explication d'une variable quantitative en fonction d'une variable qualitative

Pour étudier une variable quantitative en fonction d'une variable qualitative à deux paramètres (par exemple deux distributions correspondant à deux groupes distincts) deux cas peuvent se présenter. Si les distributions suivent une loi normale, on emploie le test de Student (paramétrique), si les

distributions ne suivent pas une loi normale, on emploie le test de Wilcoxon-Mann-Whitney ou test U de Mann-Whitney (non paramétrique).

Pour étudier une variable quantitative en fonction d'une variable qualitative à plus de deux paramètres (par exemple cinq distributions correspondant à cinq groupes distincts) deux cas peuvent se présenter. Si les distributions suivent une loi normale, on emploie l'analyse de variance ANOVA (de l'anglais analysis of variance, paramétrique) qui est une généralisation du test t de Student à plus de deux groupes, si les distributions ne suivent pas une loi normale, on emploie le test de Kruskal-Wallis qui est une généralisation du test U de Mann-Whitney à plus de deux groupes.

Dans ces tests on formule une hypothèse H_0 qu'on peut résumer de la façon suivante : « la différence entre les distributions observée n'est pas significative » qu'on peut dans le contexte de ce projet reformuler comme suit « la différence entre les populations observées n'est pas plus grande que celle que nous pourrions observer dans une même population en raison du hasard (variabilité interne, fluctuation des instruments de mesure) ». On fixe un seuil de p-value qui représente la significativité du test, ici 0,05. Si la p-value du test est supérieure au seuil, l'hypothèse H_0 est rejetée, et on peut en conclure que les différences observées entre les deux distributions ne sont pas dues au hasard (avec une chance d'erreur inférieure à 5%). Si la p-value du test est inférieure à 0,05, l'hypothèse H_0 n'est pas rejetée, permettant de conclure que les différences observées entre les deux distributions sont significatives (plus importantes que ce que l'on attendrait si elles étaient dues au hasard).

6.2.2 Détermination des matrices de corrélation

Les coefficients de corrélation permettent de quantifier le degré de liaison linéaire entre deux variables quantitatives. Le coefficient calculé varie de -1 à 1. L'absence de liaison correspondant à la valeur 0 et le signe du résultat indique si les valeurs varient en sens identique ou contraire. Pour les distributions normales, on utilise le coefficient de corrélation de Pearson calculé sur les valeurs (test paramétrique), pour les distributions non normales on utilise le test de Spearman calculé sur les rangs (test non paramétrique).

Les tests de corrélation de Pearson et Spearman sont utilisés pour évaluer la corrélation entre deux variables quantitatives (par exemple l'abondance de deux composés dans un même groupe d'échantillon). Dans le cadre de ce projet ils sont utilisés pour évaluer la corrélation entre les données spectrales d'IRTF dans les répliques d'un même groupe d'échantillons. Les intensités des pics sont donc ici considérées comme une variable quantitative indépendamment de leur nombre d'onde dans le but de caractériser la proximité entre les spectres. Les tests de corrélation sont effectués pour chaque paire d'échantillons possibles (45 paires pour un groupe contenant 10 échantillons). Les matrices de corrélation sont très volumineuses, la distribution des valeurs de corrélation qu'elles contiennent pour

chaque groupe d'échantillon est présentée sous forme de box plots (boîtes à moustaches) dans un souci de lisibilité.

6.3 Statistiques multivariées

Les approches présentées dans cette partie sont utilisées pour l'exploration et la visualisation de la dispersion des données issues des analyses métabolomiques. Il s'agit de méthodes d'analyse factorielles (PCA), d'analyses discriminantes (PLS-DA) et de classification (HC). Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme W4M (Workflow 4 Metabolomics) ou avec l'outil en ligne Metaboanalyst 4.0.

- *Analyse par composante principale ou ACP*

Il s'agit d'une méthode d'analyse factorielle permettant de réduire le nombre de variables à un nombre donné de variables appelées composantes principales et représentant au mieux la dispersion des échantillons. La projection des échantillons selon deux de ces composantes (généralement celles représentant le plus de variance) sur deux axes permet une visualisation simple des données et de leur dispersion. Cette représentation permet d'identifier des tendances, des biais expérimentaux et de voir si les échantillons forment des groupes « naturellement ». Les ACP présentées dans ces travaux sont non supervisées.

- *PLS-DA*

La PLS-DA est une analyse discriminante qui permet comme l'ACP de réduire le nombre de variables à un nombre donné de nouvelles variables. L'ACP permet également une visualisation simple des données selon deux axes. La PLS-DA exploite cependant également des variables qualitatives (ex : groupe d'échantillon) et permet donc une analyse plus orientée que l'ACP. Cette analyse permet de confirmer ou non si les données quantitatives étudiées permettent de classer efficacement les échantillons dans le groupe auquel ils appartiennent.

- *Classification ascendante hiérarchique*

La classification ascendante hiérarchique ou HC (hierarchical clustering) permet une classification des échantillons en effectuant différents groupements en fonction de leur similarité. La représentation graphique d'un HC est un dendrogramme. La représentation de deux dendrogrammes (l'un correspondant à une analyse de type HC sur les variables et l'autre à une même analyse sur les échantillons) sur deux axes permet de former une carte sur laquelle on peut représenter l'intensité relative des variables (ici l'abondance relative des composés) par un code couleur en fonction de la chaleur de ces dernières (rouge pour une forte présence, et bleu pour une absence). On parle alors de cartes de chaleur.

Chapitre 3 – Mise en place des outils de caractérisation physico-chimique de l'altération des entiers liquides

1 Mise en place des approches de phénotypage et de chémotypage des entiers liquides

1.1 Introduction

La caractérisation physico-chimique de l'entier liquide pour le suivi de l'altération constitue un champ d'investigation largement ouvert puisqu'à l'h actuelle les approches normées développées sur le blanc ou sur le jaune sont quasiment les seules stratégies exploitées. Ces normes visent généralement à caractériser les effets d'une dégradation physico-chimique de la matrice œuf et plus particulièrement de ses composants considérés indépendamment, c'est à dire le jaune ou le blanc. Ces approches peuvent se classer en deux catégories, proposant ainsi des indicateurs macroscopiques ou des informations plus fines sur des composés chimiques ciblés. D'un point de vue macroscopique, la couleur, la texture, ou encore le pH sont souvent exploités comme mesure des propriétés phénotypiques. Par contre d'un point de vue chémotypique, les approches utilisant le profilage des grandes familles biochimiques ou des petites molécules constituent un champ d'étude peu exploré pour cette matrice. En effet, les développements menés sur la composition chimique fine de l'œuf disponibles dans la littérature proposent souvent des protocoles analytiques employés sur une fraction spécifique de l'œuf, l'albumen ou le vitellus (Hidalgo *et al.* 1995 ; Kang *et al.* 1998 ; Elswyk *et al.* 1992 ; Laca *et al.* 2010 ; Sisak *et al.* 2006 ; Milinsk *et al.* 2003). Les approches développées pour l'étude d'ovoproduits entier liquides sont généralement destinées à quantifier un nombre limité de métabolites (<5) (Morris 1987 ; Hidalgo *et al.* 1995 ; Lai *et al.* 1995 ; Rossi *et al.* 2010) et ne ciblent que très rarement les groupes de petites molécules qui sont le reflet fidèle des transformations métaboliques liées à l'altération des produits. Les approches issues de la métabolomique permettraient d'observer les variations de ces petits composés, de les identifier et éventuellement de les quantifier. Dans le cadre de l'altération des entiers liquides (EL) ces informations pourraient permettre de mettre en évidence les composés impliqués dans les réactions d'altération et d'en déterminer les mécanismes. L'apparition de métabolites bactériens, la consommation de substrats nutritifs ou encore la variation de la concentration des métabolites impliqués dans le métabolisme carboné des microorganismes

responsables de l'altération (comme ceux du métabolisme central) ou des composés identifiés comme impliqués dans l'altération des EL pourraient révéler la présence d'organismes altérants indésirables.

1.2 Objectifs

A l'h où nous écrivons ces pages, aucune étude employant une approche de type métabolomique appliquée à l'altération des EL n'a pu être répertoriée. Dans le cadre de l'étude de modifications physico-chimiques liées à ces effets, il a donc été nécessaire d'adapter et de développer ces protocoles. Ce chapitre présente les développements méthodologiques menés durant ces travaux de thèse. Cela concerne à la fois les efforts menés sur l'adaptation des protocoles de mesure macroscopiques reflétant les variations de couleur ou de pH au cours de l'altération des EL, mais aussi et surtout les efforts menés sur le développement des approches de profilage métabolique. Pour ces dernières, les choix se sont portés sur les méthodes de métabotypage exploitant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), combinée à la résonance magnétique nucléaire (RMN). Les étapes de préparation des échantillons d'EL (déprotéination, fractionnement, évaporation et dérivation pour l'analyse par GC-MS) seront principalement exposées car elles sont un prérequis indispensable à la mesure des petites molécules par ces techniques. L'approche employée sera décrite en détail, incluant le choix des critères d'évaluation, l'étude de la répétabilité des différentes méthodes d'analyses employées sur standards et finalement sur échantillons d'EL « vrais », afin d'en estimer la robustesse. La mesure de la variabilité globale du protocole analytique, incluant la variabilité interne des échantillons d'EL ainsi que l'impact du mode de conservation des échantillons d'EL bruts (reflétant notamment l'effet du transport à -20°C et donc de la logistique entre les membres du consortium sur la qualité des échantillons profilés) sera également exposée car elle détermine à la fois la qualité des données enregistrées et la pertinence que l'on pourra leur accorder.

1.3 Approches phénotypiques proposées par les partenaires du projet ALTOVOP

Les partenaires du projet ALTOVOP ont effectué des analyses complémentaires à celles effectuées dans le cadre de cette thèse de doctorat, et ce en fonction de leurs spécialités respectives. Ces essais ont permis de sélectionner les souches altérantes employées dans la suite du projet comme micro-organismes modèles pour les études cinétiques du phénomène d'altération. Les résultats de ces différentes mesures sont également employés pour effectuer une analyse intégrée des données du projet et permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'altération des EL.

- *Analyses macroscopiques*

Des mesures de pH et de colorimétrie sont réalisées par le laboratoire STLO et la société ADRIA développement pour servir d'outil d'inter-calibration et de suivi de l'altération et ainsi assurer la pertinence de l'analyse croisée des données obtenues par les différentes équipes.

- *Analyses microbiologiques*

Les analyses microbiologiques sont réalisées par le laboratoire STLO de l'INRA – Agrocampus Ouest et la société ADRIA Développement. La société ADRIA centralise les échantillons industriels pour les redistribuer au besoin aux autres partenaires du projet. Les échantillons collectés lors d'une enquête auprès des industriels de l'ADRO OUEST dans le cadre du lancement du projet (Sous Projet 1) ont permis l'identification de différentes souches. Après isolement, certaines souches retenues comme représentatives de l'altération des EL en milieu industriel ont été sélectionnées pour reproduire les phénomènes d'altération en laboratoire. La croissance de ces souches a été caractérisée dans l'EL à différentes températures, notamment à 8°C (température choisie pour étudier au mieux l'altération en laboratoire). Le laboratoire STLO a également développé et transmis un protocole de préparation et d'inoculation des EL stériles. Les inocula employés dans le cadre des études cinétiques de l'altération ont été préparés et envoyés congelés par la société ADRIA Développement.

- *Analyses enzymatiques*

Des analyses d'activité enzymatique ont été réalisées pour les protéases, les collagénases et les lipases pour les souches sélectionnées dans un milieu inducteur par le laboratoire LUBEM.

- *Analyses des propriétés fonctionnelles*

L'impact de l'altération des EL par les souches sélectionnées sur leurs propriétés fonctionnelles a également été étudié par la société ADRIA Développement. Les propriétés moussantes et émulsifiantes, les capacités de gélification à 4 et 20°C ont été mesurées aux différents stades de l'altération.

2 Adaptation des protocoles de caractérisation des propriétés physico-chimiques (macroscopiques) des œufs : vers le phénotypage de l'altération des EL

2.1 Introduction

L'approche de caractérisation phénotypique employée doit répondre à deux principaux objectifs. Tout d'abord suivre l'évolution de l'altération des matrices de façon simple, rapide et reproductible (détection du développement microbiologique et des changements importants d'états physico-chimiques), deuxièmement permettre l'inter-calibration des différents laboratoires partenaires travaillant sur le projet. Les mesures exploitant le pH et la colorimétrie en référentiel CIE Lab ont été choisies comme représentatives des effets d'une altération microbiologique telle que constatée en industrie. En effet, la mesure du pH est une des mesures les plus simples à mettre en place dans le monde industriel et est donc récurrente en agroalimentaire. Le pH représente un indicateur fort des modifications physico-chimiques et du développement microbiologique dans différentes matrices (Johnson *et al.* 2009 ; Solé *et al.* 2000) en raison de l'acidification du milieu couramment associée à la croissance bactérienne (Salminen 2012). La mesure de la colorimétrie est quant à elle, couramment employée en industrie agroalimentaire pour le contrôle de conformité des aliments (des dégradations ou altérations sont souvent associées à une modification de l'aspect de l'aliment et surtout de sa couleur) en raison de sa simplicité et du coût relativement faible de l'instrumentation (<10k€). De plus cette technique ne requiert pas d'expertise particulière et peut être utilisée en ligne sur certaines chaînes de production. Dans le cas de l'altération microbiologique des EL, la colorimétrie s'est révélée être un indicateur pertinent en raison des changements de couleur couramment observés par les industriels (blanchiment).

Ainsi ces deux techniques ont été utilisées pour suivre de l'altération par tous les partenaires du projet afin d'assurer l'inter-calibration entre les laboratoires. Ces mesures ont été effectuées dans chacun des laboratoires impliqués, sur chaque lot d'échantillons industriels et pour chacune des étapes de l'altération dans le cadre de la reproduction contrôlée du phénomène en laboratoire (études cinétiques de l'altération). Ces mesures ont permis de vérifier que les matrices étudiées étaient dans des états identiques pour les échantillons industriels. Dans le cadre des études cinétiques de l'altération (effectuées selon des protocoles standardisés), ces mesures ont permis de vérifier la synchronisation des expériences entre les différents partenaires, pour pouvoir finalement analyser de façon intégrée les résultats des études microbiologiques, enzymatiques, chimiques et des propriétés fonctionnelles réalisées dans le cadre du projet.

Dans ce qui suit, la répétabilité de chacune des méthodes a été mesurée de façon à évaluer la significativité d'une mesure au regard de la variabilité associée à la technique et à celle propre à l'échantillon (nommée ici variabilité interne). La même approche a été exploitée pour estimer l'impact du mode de préservation choisi pour la conservation et le transport des échantillons entre partenaires (variabilité associée à la congélation à -20°C).

2.2 Préparation des EL

Pour cette étude, les échantillons d'EL ont été analysés immédiatement ou congelés pendant 7 jours à -20°C puis décongelés pour analyse. Les EL ont été préparés indépendamment suivant le protocole de fabrication des EL stériles (voir Préparation d'EL). Les œufs utilisés sont de la marque « Œufs de nos régions » (achetés dans un supermarché), code 3, calibre moyen, analysés environ 7 jours après la ponte. Dix échantillons indépendants ont été ainsi préparés, la moitié congelée à -20°C, puis après 7 jours de stockage placés à 4°C pour la nuit pour subir une décongélation lente avant analyse.

2.3 pHmétrie

La Figure 30 présente la dispersion des mesures pHmétriques effectuées sur des lots d'EL frais et après congélation. Ces analyses ont été réalisées sur six échantillons indépendants.

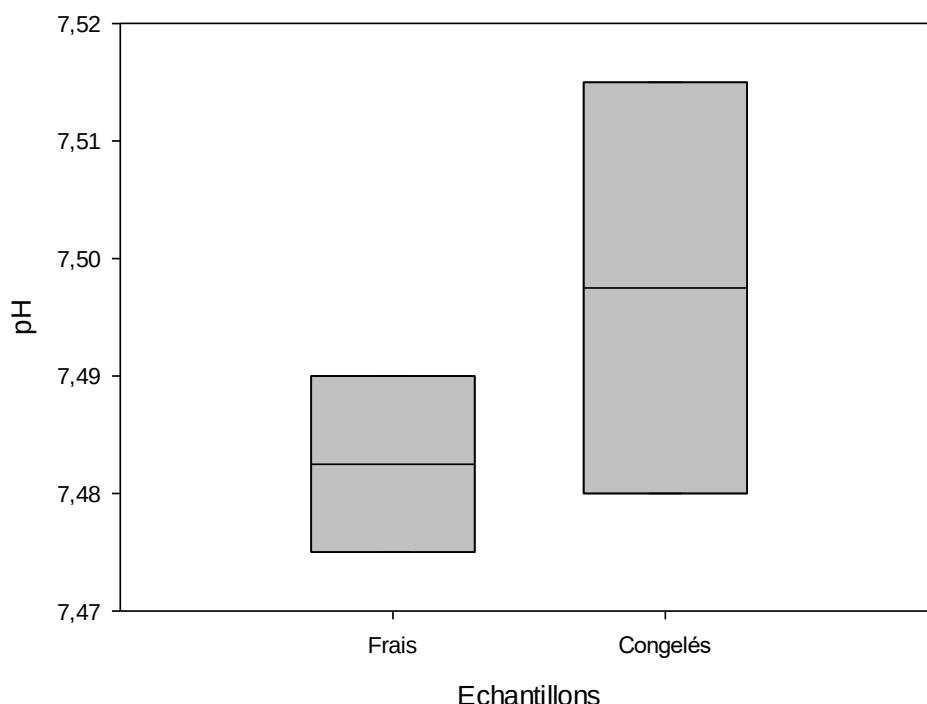


Figure 30. Distribution des valeurs de pH mesurées sur des échantillons d'EL frais et congelés (n=6)

Les mesures présentées incluent à la fois la variabilité propre à chaque échantillon (liée au mode de préparation des EL, aux œufs utilisés, etc.) et celle associée à la mesure.

Les données présentent une très faible variabilité, avec des coefficients de variation calculés pour les échantillons frais et congelés de respectivement 0,092% et 0,23%. Ces variations correspondent à une variation de la valeur de pH de 0,02 pour les échantillons frais et de 0,05 pour les échantillons congelés. Ainsi, dans le cas de l'analyse d'échantillons frais, si une modification de 0,04 unité de pH était constatée, celle-ci serait considérée comme significative car 2 fois supérieure à la variabilité interne mesurée. Pour les échantillons congelés, une modification du pH ne sera considérée comme significative qu'au-dessus de 0,1 unité de pH.

Les distributions « frais – congelés » présentent des paramètres de position (médiane et moyenne) et de dispersion (écart entre les quartiles) proches. Les valeurs moyennes et médianes de chacune des distributions sont identiques, 7,482 pour les échantillons frais et 7,498 pour les échantillons congelés. L'écart interquartile est de 0,015 pour les échantillons frais et de 0,035 pour les échantillons congelés. Les résultats du test de comparaison des rangs de Mahn-Whitney n'a pas permis de rejeter l'hypothèse nulle de population identique, suggérant que les deux distributions ne présentent pas de différence significative.

La congélation de l'échantillon n'as donc pas d'effet significatif sur la pesure du pH, confirmant ainsi la robustesse de cet indicateur, y compris pour l'analyse d'échantillons congelés.

2.4 Colorimétrie en référentiel CIE lab

Le système de mesure CIE lab utilisé étant portatif (voir - Colorimétrie CIE $L^*a^*b^*$), cela génère une variabilité technique liée au positionnement de la lentille de mesure du colorimètre au contact du produit à analyser. Afin de minimiser cette incertitude expérimentale, le colorimètre est configuré pour effectuer trois mesures successives par échantillons et moyenner ces résultats. Ce processus est effectué trois fois par échantillon et les résultats obtenus moyennés par l'instrument de mesure. Cela représente au total 9 mesures indépendantes dont trois sont moyennées automatiquement. La Figure 31 présente la dispersion des mesures de colorimétrie classées par composante pour des échantillons d'EL frais (haut) et congelés (bas). Il est ainsi possible d'estimer la variabilité interne propre aux mesures de colorimétrie (haut) et pour les données enregistrées sur les EL issus de la décongélation, d'accéder à l'effet du mode de préservation des échantillons (bas). Les données présentées ont été acquises pour cinq réplicats indépendants, soit en tout 45 mesures (15 mesures qui sont chacune une moyenne de trois mesures).

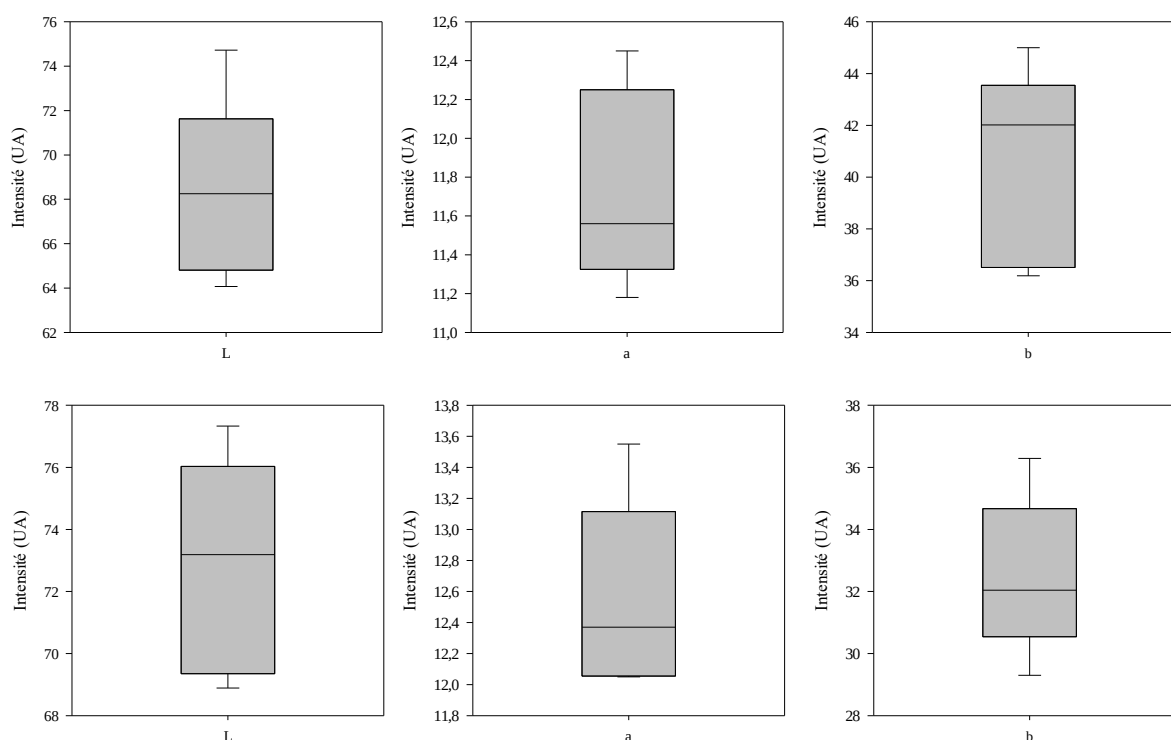


Figure 31. Distribution des valeurs de colorimétrie par composante mesurées sur des échantillons d'EL frais (haut) et décongelés après 7 jours (bas). (n=5)

Le Tableau 35 présente un récapitulatif des données de dispersion et les coefficients de variation (CV).

Tableau 35. Récapitulatif des données de centrage et de dispersion.

Frais	L	a	b	Congelé	L	a	b
Moyenne	68,22	11,74	40,43	Moyenne	72,79	12,54	32,49
Médiane	68,25	11,56	42,02	Médiane	73,19	12,37	32,04
Ecart type	4,09	0,51	3,78	Ecart type	3,49	0,62	2,53
CV (%)	5,99	4,30	9,35	CV (%)	4,79	4,94	7,79
1er quartile	64,81	11,33	36,51	1er quartile%	69,35	12,06	30,54
2ème quartile	71,63	12,25	43,55	2ème quartile%	76,03	13,12	34,67
Ecart inter quartile	6,82	0,93	7,04	Ecart inter quartile	6,68	1,06	4,13

Pour les échantillons frais, la composante b présente la plus grande variabilité avec un CV de 9,35% pour une médiane de 42,02%. Les composantes L et a présentent quant à elles, des CV de 5,99% et 4,30 % pour des médianes de 68,25 et 11,56. Ainsi, on considèrera une variation significative si les composantes L, a et b varient respectivement de plus de 12%, 10% et 20%.

Les distributions « frais – congelés » présentent des paramètres de dispersion (écart entre les quartiles) très voisins, voire similaires mais des paramètres de position (médianes et moyennes) différents (Tableau 35). Ainsi, pour les échantillons congelés, la composante L présente une médiane à 73,19 avec un CV de 4,79%. La composante a présente une médiane de 12,37 et un CV de 4,94%. Enfin la composante b présente une médiane de 32,04 et un CV de 7,79%. Comme pour les

échantillons frais, on remarque que la composante présentant le plus de variabilité est la composante b. Les résultats des tests de Student pour la comparaison des distributions n'a pas permis de rejeter l'hypothèse nulle de population identique à 0,05% de confiance pour les composantes L et a, (p-value de 0,0938 et 0,056), suggérant que les distributions « frais – congelés » ne présentent pas de différences significatives pour ces composantes. Pour la composante b, présentant la plus grande variabilité, le résultat du test de Student a permis de rejeter l'hypothèse nulle, mettant en évidence une différence de distribution significative entre les groupes frais et congelés. La congélation de l'échantillon n'as pas d'effet significatif sur la mesure des composantes L et a et un effet significatif sur la composante b du référentiel CIE lab.

3 Développement des approches de chémotypage des EL : vers des études par métabolomique ciblée et non-ciblée de l'altération des EL

3.1 Introduction

La métabolomique a pour objectif la caractérisation chimique la plus exhaustive possible des échantillons analysés. Différentes approches peuvent être employées, dont le profilage métabolique, qui consiste à identifier et à quantifier de manière relative plusieurs dizaines de composés cibles à la fois. Les techniques couramment utilisées exploitent la résonance magnétique nucléaire à haut champ magnétique (HR-RMN) ou la chromatographie couplée à la spectroscopie de masse à haute résolution (LC-HRMS, GC-HRMS,...). Chacune de ces techniques présente différents avantages et contraintes succinctement présentés dans le chapitre I de ce manuscrit (voir Principales techniques analytiques employées en métabolomique). La RMN est l'outil le plus versatile en raison de la grande diversité de méthodes employables pour l'analyse d'un même échantillon, et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-HRMS) est l'outil le plus sensible, pouvant atteindre des seuils de détection de l'ordre du ng (Strano-Rossi *et al.* 2015). Cependant, RMN et LC-MS présentent l'inconvénient de nécessiter une instrumentation onéreuse et hautement spécifique. Cela impose donc un degré d'expertise élevé, tant pour l'utilisation que pour la maintenance des instruments, les rendant rarement disponibles en analyse de routine en laboratoire. Le recours à des prestations proposées par des plateformes d'analyse extérieures de type « plateaux techniques » est alors incontournable si on souhaite exploiter cette puissance d'analyse. La collaboration avec ces plateformes permet une analyse plus fine des échantillons étudiés mais est parfois mal adaptée en tant que soutien au développement d'un protocole analytique en raison des délais et des coûts d'analyse qui, cumulés, peuvent devenir prohibitifs.

Une alternative viable aux méthodes précédemment citées consisterait à utiliser en routine la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse basse résolution (GC-MS). Cette technique, plus accessible car moins onéreuse à l'achat tout comme à l'entretien (Wittmann 2007), présente de nombreux avantages en termes de robustesse, sensibilité et polyvalence des composés analysables (Bölling et Fiehn 2005). Même si elle ne présente pas la même puissance de couverture des voies métaboliques que la LC-MS, la GC-MS reste très adaptée pour le suivi en routine d'une partie des composés du métabolisme central bactérien (primaire et secondaire) (Kindt *et al.* 2009). Des approches moins résolutes issues des spectroscopies vibrationnelles peuvent être également employées afin d'obtenir, simplement et sans préparation complexe d'échantillon une signature chimique caractéristique des principaux groupements chimiques présents dans la matrice analysée. Les spectroscopies Raman ou moyen et proche infra-rouge peuvent ainsi être exploitées pour le profilage des grandes familles de macromolécules comme les protéines, les polysaccharides ou encore les lipides.

On se propose de présenter dans cette partie les développements méthodologiques associés aux techniques de profilage chimique retenues dans le cadre de ce projet. L'objectif principal étant d'identifier des marqueurs chimiques ou biochimiques de l'altération microbiologique des EL, des niveaux d'analyse complémentaires ont été choisis. Ainsi, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été investiguée pour sa capacité à estimer rapidement les variations relatives des protéines, polysaccharides et lipides (profilage biochimique) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour sa capacité à profiler les petites molécules (profilage métabolique et prise d'empreinte métabolique). La GC-MS a été exploitée en routine et combinée avec la RMN haute résolution (prestation avec le plateau technique de Spectromaitrise de l'université de Nantes) pour confirmer et compléter les informations mesurées.

3.2 Profilage biochimique des EL par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)

3.2.1 Choix du mode d'échantillonnage des EL

Les techniques de spectroscopie vibrationnelles (voir - La spectroscopie vibrationnelle) telles que la spectroscopie IRTF peuvent fournir rapidement des informations sur la présence et l'abondance relative des grandes familles biochimiques présentes dans l'échantillon (protéines, carbohydrates, lipides,...). Les échantillons d'EL étant principalement composés d'eau (74%), une étape de séchage ou de dessiccation est nécessaire avant l'analyse par IRTF. Cela permet d'éviter notamment que les bandes d'absorption de l'eau ne masquent tout le spectre (Coat *et al.* 2018). Les modes d'échantillonnages testés, par réflexion totale atténuée et par transmission sur microplaque sont illustrés dans la Figure 32.

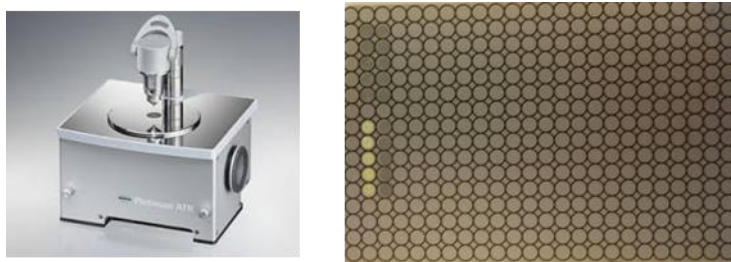


Figure 32. Platine de lecture ATR-platinum (à gauche) et microplaque 384 puits en silicium utilisée pour les lectures en transmission (à droite).

Dans ces deux cas, l'utilisation de la matrice brute sans aucun prétraitement, juste après séchage, n'a pas permis de conduire à la formation d'un dépôt homogène, empêchant ainsi l'acquisition de spectres IRTF exploitables. Que le séchage de l'EL ait été effectué sous irradiation infra-rouge ou mené sous cloche à vide, les mêmes constatations ont été effectuées.

3.2.2 Variabilité associée à la matrice EL et à la mesure IRTF

Afin d'améliorer la répétabilité des mesures, un protocole impliquant la dilution dans l'eau de l'échantillon d'EL au 1/10 suivi d'un séchage sous vide directement sur microplaque a été employé (voir - Transmission HTS-XT). Cette approche a permis d'obtenir des spectres résolus et informatifs. Un exemple de spectres bruts enregistrés sur 10 dépôts d'un échantillon d'EL est présenté sur la Figure 33.

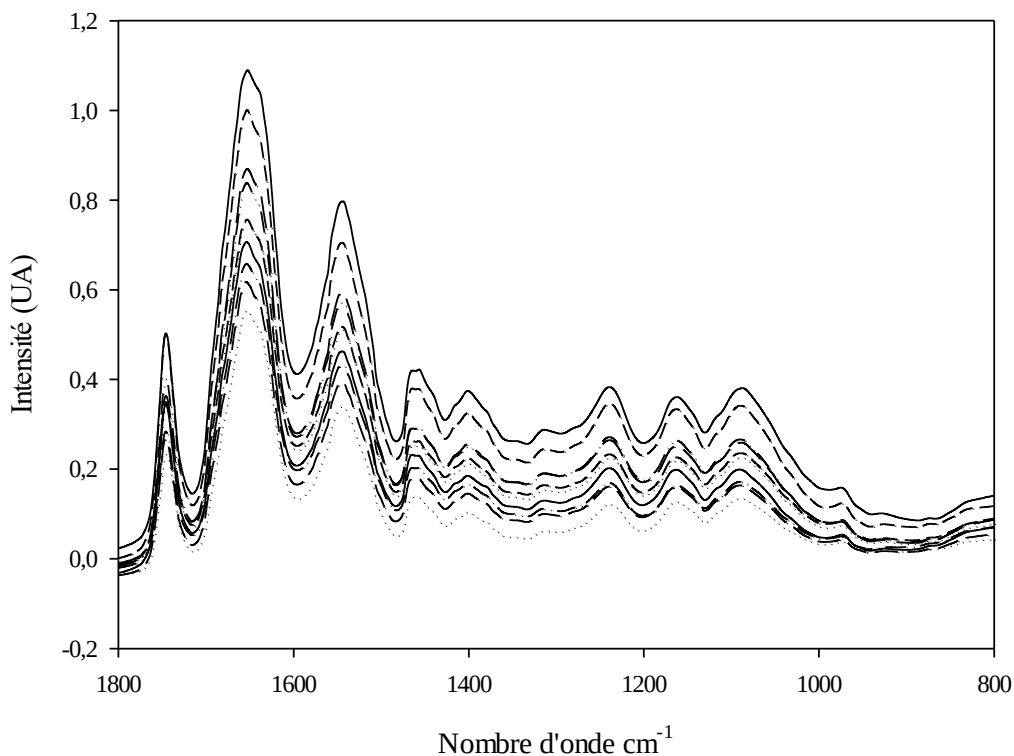


Figure 33. Exemple de spectres bruts enregistrés pour 10 dépôts d'un échantillon d'EL. Une correction de ligne de base a été appliquée sous le logiciel OPUS 7 (Bruker, France). Seule la zone d'intérêt représentative de la composition biochimique est représentée (800 – 1800 cm⁻¹).

Qualitativement, les profils IRTF obtenus pour les dix dépôts sont très similaires. Les intensités sont importantes mais les signaux sont résolus et ne présentent pas de signes de saturation. Seule la ligne de base présente une variation non négligeable. Les spectres, après normalisation des intensités sur le signal des triacylglycerols (TAG, 1740 cm^{-1}) sont présentés sur la Figure 34.

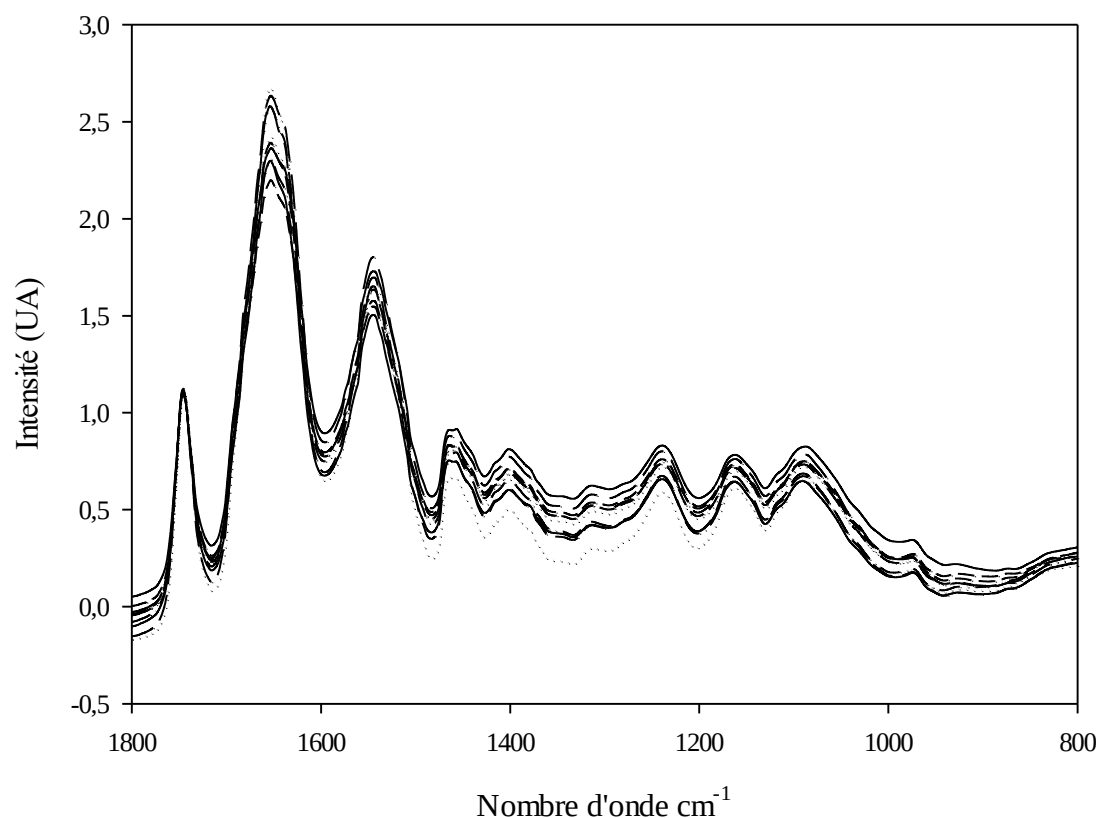


Figure 34. Exemple de spectres enregistrés sur 10 dépôts d'un échantillon d'EL. Une correction de ligne de base a été appliquée et les signaux normalisés sur l'intensité du vibreur présent à 1740 cm^{-1} .

Cette étape de normalisation permet d'apprécier la dispersion des spectres principalement associée aux abondances relatives des grands groupes biochimiques, en s'affranchissant de la contribution associée à la variation de ligne de base. Une fois normalisés, les profils sont très proches et ne laissent apparaître que des variations minimales d'intensité globale. Afin de quantifier la similitude de ces spectres, des analyses de corrélation (calcul des coefficients de Pearson) et de variabilité ont été effectuées pour estimer la variabilité interne propre à l'EL et à la mesure IRTF. La Figure 35 présente la distribution de ces résultats.

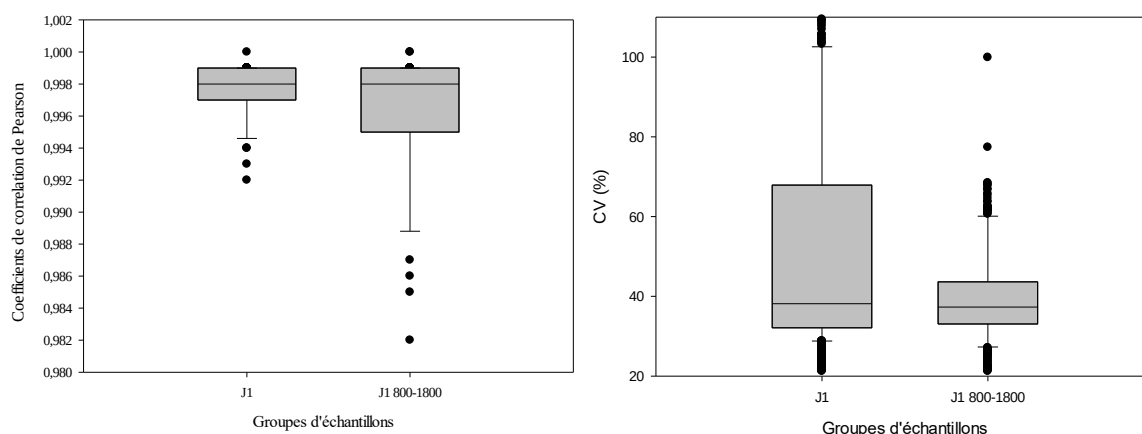


Figure 35. Distribution des coefficients de corrélations de Pearson pour lesquels les échantillons ont été analysés par paires (gauche) et des coefficients de variation (droite) sur l'ensemble des données spectrales (groupe J1) et sur la zone d'intérêt des signatures biochimiques situées entre 800 et 1800 cm^{-1} (groupe J1 800-1800).

Le Tableau 36 présente un récapitulatif des données de dispersion et des coefficients de variation (CV).

Tableau 36. Récapitulatif des données de dispersion des coefficients de variation (CV en %)

	J1	J1 800-1800
Moyenne	115,27	82,11
Médiane	38,16	37,31
1er quartile%	32,11	33,07
2ème quartile%	67,92	43,63
Ecart inter quartile	35,81	10,56

On peut noter un très haut degré de corrélation des données spectrales des différents réplicas, les scores de corrélation médians étant de 0.998 pour les deux zones spectrales étudiées, avec des p-value proches de 0, donc des résultats statistiquement significatifs. Les dispersions semblent cependant s'accroître lorsque l'on se focalise sur la signature biochimique des EL, mais n'affectent en rien les très hautes corrélations mesurées ici. Afin de quantifier précisément la variabilité propre à l'EL et à la technique de profilage biochimique par IRTF, des calculs de coefficients de variations sur les intensités mesurées par vibreurs ont également été effectués. Les résultats présentent une distribution très étendue pour les données associées au spectre entier, avec un coefficient moyen de 115% et médian de 38%. La zone spectrale située entre 800 et 1800 cm^{-1} présente quant à elle des coefficients de variation moyens de 82% et médians de 37%, mais avec une étendue mesurée par les écarts interquartiles trois fois moindre (10,56 pour la zone spectrale 800-1800 contre 35,81 pour le spectre complet). Le fait de restreindre la fenêtre spectrale analysée permet donc de diminuer la variabilité globale de l'analyse à un niveau acceptable. Au vu des coefficients de variation mesurés, une variation d'intensité d'un vibreur sera considérée significative si elle est supérieure à 80%.

3.2.3 Impact de la congélation sur la variabilité des mesures IRTF

La Figure 36 présente les spectres bruts enregistrés sur 5 dépôts d'EL dilué au 1/10, frais et congelés selon le protocole d'analyse des EL dilués par IRTF (voir Transmission HTS-Xt).

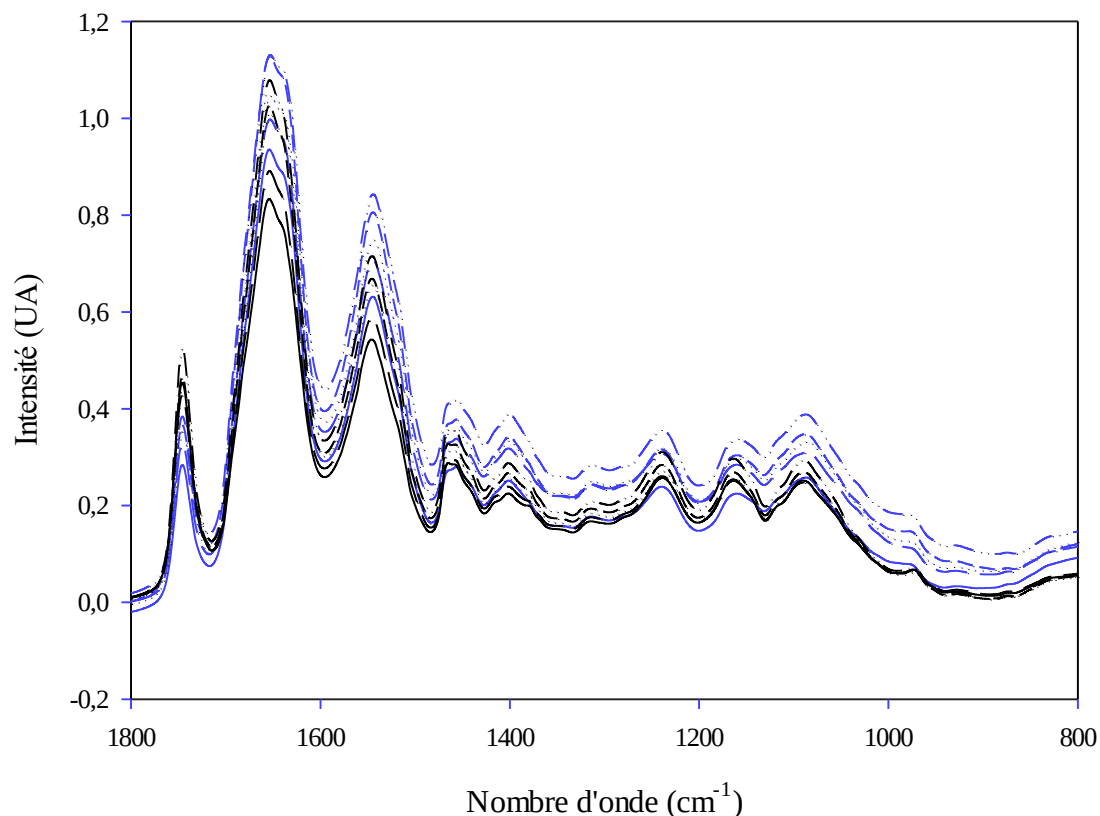


Figure 36. Profils IRTF d'échantillons d'EL frais (bleu) et congelés (noir) réalisés sur 5 réplicas et déposés sur microplaque 384. Seule la zone de la signature biochimique est représentée (800-1800 cm^{-1}).

Qualitativement, les profils IRTF sont très proches pour les échantillons frais et congelés, l'étape de congélation semblant donc ne pas avoir d'impact majeur. La proximité entre ces spectres a été estimée par le calcul des coefficients de Spearman et la répétabilité par le calcul des coefficients de variation. Ces analyses ont été effectuées indépendamment sur les échantillons frais et congelés et après regroupement de l'ensemble des échantillons (frais et congelés) dans le but d'estimer la variabilité induite par l'analyse d'échantillons frais et congelés lors d'une même analyse. Les distributions de ces résultats sont présentées dans la Figure 37.

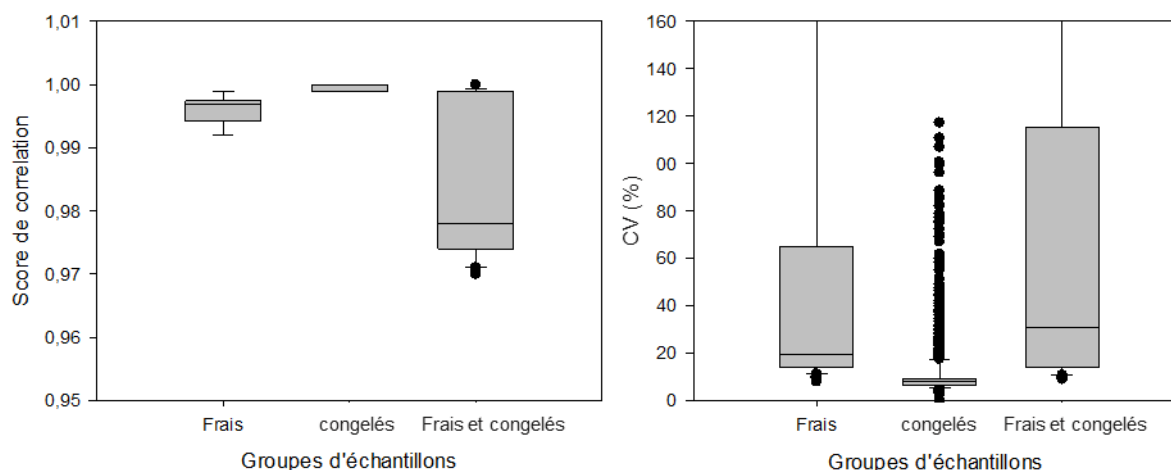


Figure 37. Distribution des coefficients de corrélation de Spearman (gauche) et des coefficients de variation (CV %) calculés sur les données spectrales d'IRTF. Les échantillons ont été analysés par paires, uniquement les échantillons frais pour le premier groupe (Frais), les échantillons congelés pour le deuxième groupe (Congelé) puis un mélange des deux lots pour le troisième groupe (Frais et congelé).

Le Tableau 37 présente un récapitulatif des données de dispersion et les coefficients de variation (CV).

Tableau 37. Récapitulatif des données de dispersion des coefficients de variation (CV)

	Frais	Congelés	Frais et congelés
Moyenne	100,35	12,50	463,44
Médiane	19,32	8,15	30,71
1er quartile%	13,94	6,31	14,03
2ème quartile%	65,18	9,23	115,17
Ecart inter quartile	51,24	2,92	101,13

Les scores de corrélation obtenus pour les échantillons frais sont supérieurs à 0,99 (moyenne à 0,996), ceux correspondant aux échantillons congelés sont encore plus importants avec un score moyen de 0,999 (la p-value de ces test est proche de 0 ($<0,05$)). Il apparait donc que la congélation ait un impact très positif sur la répétabilité des mesures IRTF. Lorsque l'on regroupe toutes ces données (frais et congelés) des scores de corrélation inférieurs (montrant bien une légère différence de profils entre échantillons frais et congelés) mais toujours très élevés (avec une moyenne de 0,985) sont obtenus. Des calculs de coefficients de variation sur les intensités mesurées par vibreurs ont également été effectués. Les résultats présentent des distributions différentes selon les groupes considérés. Une première observation concerne l'étendue des distributions pour l'ensemble des groupes d'échantillons. Le groupe correspondant aux échantillons frais présente un CV moyen de 100,35% et médian de 19,32%, le groupe correspondant aux échantillons congelés présente quant à lui des CV moyen de 12,50% et médian de 8,15%, enfin le groupe composé de l'ensemble des échantillons présente un CV moyen de 463,45% et médian de 30,71%. La disparité des valeurs moyennes et médianes pour les groupes d'échantillons « frais » et « frais et congelés » témoignent d'une distribution non homogène des valeurs et la présence de valeurs extrêmes influençant fortement

les résultats. L'hétérogénéité de la distribution est confirmée pour ces deux groupes par la mesure des distances interquartiles, une valeur de 51,24% ayant été calculée pour le groupe frais et 101,14% pour le groupe frais et congelé. Comme précédemment il apparaît que la congélation ait un impact positif sur la variabilité des mesures effectuées par IRTF sur les EL dilués. Les valeurs moyennes et médianes des coefficients de variations (respectivement 12,5% et 8,15%) mesurées sur le groupe congelé sont en effet bien inférieures à celles mesurées sur le groupe frais. La distance interquartile est également bien plus faible que pour le groupe frais (2,92 au lieu de 51,24).

On peut formuler l'hypothèse que la congélation participe à la dispersion de la matrice, entraînant une meilleure homogénéité du dépôt dilué et donc une meilleure qualité d'analyse en IRTF. Les mécanismes de gélification associés à la congélation décongélation de l'œuf ne sont pas caractérisés avec certitude. Cependant il semblerait pour le jaune que la formation des cristaux de glace provoque la déshydratation des protéines des LDL, favorisant un réarrangement puis une agrégation des protéines (V. Lechevalier *et al.* 2010) ce qui pourrait appuyer l'hypothèse précédente.

Les calculs effectués sur les données spectrales pouvant être facilement impactés par des modifications de ligne de base associées à des biais d'échantillonnage (signature de l'eau et des gaz ambiants entre 4000 et 2000 cm^{-1}), les calculs des coefficients de variation ont donc été repris pour les mêmes échantillons, mais sur la zone spectrale correspondant à la signature biochimique des EL (800-1800 cm^{-1}). La Figure 38 présente la distribution des résultats pour les analyses de coefficients de corrélation et de CV.

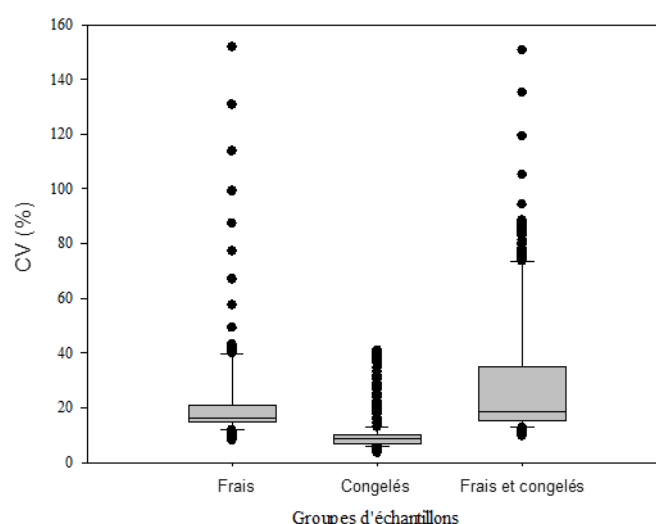


Figure 38. Distributions des coefficients de variation calculés sur les données spectrales de la signature biochimique (800-1800 cm^{-1}). Les données sont présentées par groupes, uniquement les échantillons frais pour le premier groupe (Frais), les échantillons congelés pour le deuxième groupe (Congelé) puis un mélange des deux lots pour le troisième groupe (Frais et congelés).

Le Tableau 38 présente un récapitulatif des données de dispersion et les coefficients de variation (CV).

Tableau 38. Récapitulatif des données de dispersion des coefficients de variation (CV)

	Frais	Congelés	Frais et congelés
Moyenne	37,58	9,86	29,08
Médiane	16,27	8,50	18,39
1er quartile%	14,70	6,89	15,04
2ème quartile%	20,93	10,25	34,78
Ecart inter quartile	6,23	3,35	19,74

Les distributions apparaissent clairement moins étendues pour les groupes « frais » et « frais et congelés » avec des écarts interquartiles diminuant très clairement de 51,24 à 6,23 pour le groupe « frais » et de 101,13 à 19,74 pour le groupe « frais et congelés » et très légèrement plus étendue pour le groupe congelés avec un écart interquartile augmentant de 2,92 à 3,35. Les coefficients de variation médians évoluent de la même façon que les écarts interquartiles mais avec une amplitude moindre, passant respectivement pour les groupes « frais », « congelés » et « frais et congelés » de 19,32 ; 8,15 et 30,71 à 16,27 ; 8,50 et 18,39. L'évolution des coefficients de variation moyens est toute aussi significative que celle des distances interquartiles, les valeurs pour les groupes « frais », « congelés » et « frais et congelés » passant respectivement de 100,35 ; 12,5 et 463,44 à 37,58 ; 9,86 et 29,08. Le rapprochement des valeurs médianes et moyennes dans la zone spectrale restreinte permet de confirmer l'élimination de valeurs extrêmes correspondant sûrement à des zones vides du spectre où la contribution du bruit de fond peut engendrer des coefficients de variation élevés.

Le résultat du test de Mann-Whitney entre les groupes « frais et congelés » a permis de rejeter l'hypothèse nulle de population identique à 0,05% de confiance ($p\text{-value} < 0,05$), suggérant que les groupes « frais » et « congelés » présentent des différences significatives. La congélation de l'échantillon a donc un impact significatif sur la mesure des signatures biochimiques par IRTF, la comparaison des résultats d'analyse sur des échantillons dans ces deux états différents (« frais » et « congelés ») est donc déconseillée et ne sera pas réalisée dans le cadre de ces travaux.

3.3 Profilage métabolique et prise d'empreinte métabolique des EL par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

3.3.1 Introduction

L'analyse ciblée par GC-MS a pour objectif de détecter et/ou de quantifier les composés identifiés dans la littérature comme impliqués dans le processus d'altération des œufs que l'on

supposera extrapolables à l'altération des EL (marqueurs d'altération). Cela inclut également les métabolites du métabolisme central, car ils sont le reflet des activités métaboliques bactériennes. La méthodologie de profilage par GC-MS développée dans le cadre de cette thèse sera décrite en détail, avec notamment le choix des critères d'évaluation et les résultats des performances mesurées pour le protocole finalement retenu. Cela inclut la liste des métabolites analysables et quantifiables, la sensibilité et la répétabilité qui leur sont associées. La stratégie employée pour le développement de cette méthode a consisté à optimiser les étapes limitantes (déprotéination, séparation en fractions métaboliques, dérivation, analyse des composés dérivés) du protocole de profilage métabolique par GC-MS. Il a été nécessaire de procéder à la déprotéination des EL avant de pouvoir envisager la séparation des métabolites par groupes de polarité et leur analyse à proprement parler. Plusieurs approches ont été employées afin de sélectionner les méthodes de prétraitements (déprotéination, séparation en fractions métaboliques, séchage) les plus appropriées.

La liste des composés ciblés en priorité est présentée dans le Tableau 39. Ce sont les métabolites centraux (incluant les métabolites précurseurs et des intermédiaires métaboliques du métabolisme central) d'une part, des composés appartenant aux familles des monosaccharides, acides aminés, acides organiques, et des composés spécifiques de l'altération des EL d'autre part, des acides gras, dérivés du cholestérol, nucléosides ou bases pyrimidiques et molécules du Quorum Sensing. Cela représente 54 composés avec des propriétés physiques (polarité, température d'ébullition, masse molaire) et chimiques (réactivité, groupements fonctionnels) différentes qu'il faut analyser en même temps et avec une seule méthode. Ces composés sont majoritairement polaires et peu volatils. Tous ces métabolites présentent des réactivités différentes selon les groupes fonctionnels qui les caractérisent : acide carboxylique pour les acides aminés et les acides organiques, amine secondaire ou tertiaire pour les acides aminés, alcool et aldéhyde pour les oses et autres composés.

Tableau 39. Liste des composés d'intérêt par famille chimique pour l'analyse par GC-MS. Les composés détectables par GC-MS sont en bleu, les composés non détectables par GC-MS sont en noir, les composés détectables mais non quantifiables sont en violet, les composés pour lesquels les standards ne sont pas disponibles sont en rouge.

Acides aminés	Acides organiques	Saccharides	Autres	Autres
Proline	acide fumarique	Glucose	5-cholesten-3B-ol-7-one	N-acyl-homoserine lactone
L-cystéine	acide succinique	Arabinose	Acide pyroglutamique	Autoinducer II
Glutamine	acide malique	xylose	Furosine	Uridine
acide glutamique	acide oxaloacétique	mannose	Tocophérol	Uracile
L-lysine	acide oxalique	fucose	Rétinol	Furosine
tryptophane	acide citrique	acide glucuronique		Acides Gras c17 iso
L-thréonine	acide isocitrique	galactose		
L-serine	acide glyoxilique	myoInositol		
L-tyrosine	acide pyruvique	rhamnose		
L-glycine	acide a-cétoglutarique	acide galacturonique		
L-isoleucine	acide 3-indole acétique	glucosamine		
L-alanine	acide D-glycérique	fructose		
	acide lactique			
L-valine	acide acétique	Acide gluconique		
	acide succinique			
L-leucine	acide 3-hydroxybutyrique			

Un certain nombre de marqueurs spécifiques du métabolisme des espèces bactériennes impliquées dans l'altération des EL en milieu industriel n'étaient pas disponibles commercialement ou ont été identifiés trop tard pour être intégrés au développement de l'approche analytique ciblée. Ces marqueurs seront explorés dans le cadre de l'analyse non ciblée après annotation des signaux. La liste des marqueurs potentiels de l'altération des EL qui n'ont pas été intégrés au développement de l'approche analytique ciblée est présentée dans le Tableau 40.

Tableau 40. Liste des marqueurs potentiels de l'altération des EL qui n'ont pas été intégrés au développement de l'approche analytique ciblée.

Issus du catabolisme des sucres	Issus du catabolisme des acides aminés
3-hydroxybutanone (acétoïne)	2-méthylpropanol
2,3-butanedione (diacétyle)	3-méthylbutanal
1-hexanol	Disulfure de diméthyle
Acide hexanoïque	Benzaldéhyde
Acide butanoïque	Trisulfure de diméthyle
2-butanone	Propanoate d'éthyle
2-heptanol	Butanoate d'éthyle
Acide formique	
Ethanol	

3.3.2 Optimisation de l'analyse des composés ciblés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les résultats des développements présentés ici ont tous été réalisés sur standards commerciaux. Ils sont voués à estimer leur détectabilité et donc le potentiel de couverture de la GC-MS pour le profilage des composés ciblés. Cette partie se focalise également sur l'optimisation de leur quantification absolue.

3.3.2.1 Séparation et détection des composés cibles

Afin d'estimer le potentiel analytique de la GC-MS au regard de la liste de composés que l'on souhaite profiler, il a été nécessaire de développer une méthode de séparation optimisée pour un maximum de composés. En chromatographie en phase gazeuse, le facteur influençant principalement la qualité de la séparation est le choix des rampes de température (à phase stationnaire identique). En effet, cela permet d'envisager une séparation optimale des composés avec le minimum de recouvrement entre les pics et donc une détection optimale des métabolites ciblés. Les valeurs utilisées comme point de départ à ces travaux ont été directement inspirées des développements de Phéllippé *et al.* (2018). Ces rampes ont en effet été optimisées pour obtenir le meilleur taux de couverture possible des voies métaboliques du métabolisme central et de ses briques élémentaires, les chromatogrammes les moins complexes et une séparation optimale des composés cibles tout en limitant la variabilité analytique du protocole. La silylation au MSTFA a été retenue comme système de dérivation car il a été démontré qu'elle présentait les meilleures qualités analytiques pour faire face à une telle complexité chimique (Phéllippé *et al.* 2018). La Figure 39 présente le chromatogramme obtenu après optimisation et permet de visualiser la qualité de la séparation pour un mélange de 32 standards correspondant à des briques élémentaires, intermédiaires métaboliques et produits finaux des voies du métabolisme central. Au final, 31 composés sur les 32 contenus dans le mélange ont pu être détectés avec cette approche optimisée.

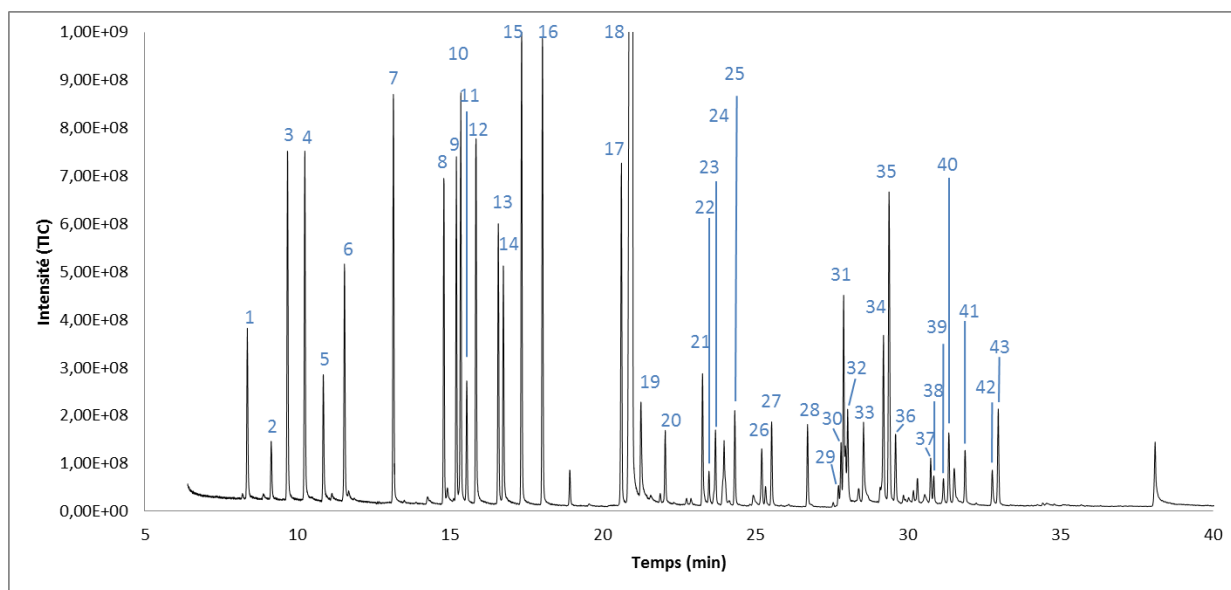


Figure 39. Courant ionique total obtenu pour un mélange de 32 standards. Les classes de composés analysées pour cet exemple sont les monosaccharides, les acides aminés et les acides organiques.

Les composés détectés, leurs temps de rétention, aires, annotations et identifiants des pics sont présentés dans le Tableau 41.

Tableau 41. Résumé des temps de rétention, aires, annotation et identifiants des pics identifiés dans l'exemple de chromatogramme obtenu pour un mélange de 32 standards.

Temps de rétention	Aire	Annotation	Id
8,36	8,55E+08	acide lactique 2 TMS	1
9,14	2,48E+08	acide pyruvique 2 TMS	2
9,67	1,72E+09	alanine 2TMS	3
10,24	1,69E+09	glycine 2 TMS	4
10,85	5,70E+08	acide oxalique 2 TMS	5
11,54	1,21E+09	acide hydroxybutyrique 2 TMS	6
13,14	1,97E+09	valine 2TMS	7
14,79	1,46E+09	leucine 1 TMS	8
15,21	1,50E+09	proline 2 TMS	9
15,35	1,89E+09	leucine 2 TMS	10
15,55	5,88E+08	glycine 3 TMS	11
15,85	1,80E+09	acide succinique 2 TMS	12
16,58	1,33E+09	acide glycérique 3 TMS	13
16,74	1,15E+09	acide fumarique 2 TMS	14
17,34	2,33E+09	serine 3 TMS	15
18,03	2,35E+09	thréonine 3 TMS	16
20,62	1,71E+09	acide malique 3 TMS	17
20,96	2,08E+10	acide pyroglutamique 2 TMS	18
21,25	5,97E+08	acide glutamique 2 TMS	19
22,05	3,59E+08	acide oxaloacétique 2TMS	20
23,27	7,01E+08	acide α -cétoglutarique 2 TMS	21
23,48	1,62E+08	acide glutamique 3 TMS	22

23,69	3,94E+08	arabinose tetrakis-TMS	23
23,98	5,39E+08	rhamnose 4 TMS	24
24,33	4,81E+08	arabinose 4 TMS	25
25,21	3,18E+08	Fucose tetrakis-TMS	26
25,53	4,41E+08	xylose 3 TMS	27
26,71	4,11E+08	xylose 4 TMS	28
27,72	1,07E+08	acide glucuronique lactone 2TMS	29
27,81	3,26E+08	mannose 5 TMS	30
27,89	1,02E+09	acide citrique 4 TMS	31
28,02	4,51E+08	acide isocitrique 4 TMS	32
28,54	4,48E+08	tyrosine 2 TMS	33
29,2	8,91E+08	acide gluconique- δ lactone 4 TMS	34
29,38	1,94E+09	acide gluconique-lactone 4 TMS	35
29,59	3,69E+08	glucose 5 TMS	36
30,74	2,14E+08	chiro-inositol hexakis TMS	37
30,85	1,21E+08	acide galacturonique 5 TMS	38
31,16	1,40E+08	scyllo-inositol hexakis-TMS	39
31,34	3,84E+08	glucose pentakis TMS	40
31,87	3,01E+08	acide glucuronique 5 TMS	41
32,76	2,02E+08	myo-inositol 6 TMS	42
32,96	5,42E+08	myo-inositol hexakis TMS	43

La séparation est globalement très satisfaisante, avec peu de recouvrements identifiés sur l'ensemble des pics. Les seuls signaux présentant ici une co-élution sont ceux situés entre 27,7 et 28 min et correspondant aux composés suivants : l'acide glucuronique lactone 2TMS, le mannose 5 TMS, l'acide citrique 4 TMS et l'acide isocitrique 4 TMS. Les deux premiers composés peuvent être malgré tout très bien différenciés selon leur profil de fragmentation par déconvolution des spectres de masse via des logiciels comme AMDIS (Davies 1998). Seuls l'acide citrique et l'acide isocitrique, qui présentent le même schéma de fragmentation, ne peuvent pas être clairement identifiés car ils partagent la même masse de 192,027 uma (composés isobares).

La liste de métabolites détectables pour l'objet de cette étude est très légèrement différente de celle proposée par Phéllipé *et al.* (2018). Afin de vérifier la robustesse du protocole exploité, une optimisation des conditions de dérivation et de séparation a également été effectuée pour les composés cibles pour lesquels des standards étaient disponibles : 5-cholesten-3 β -ol-7-one, N-(B-Ketocaproyl)-DL-homoserine lactone, N-(3-Oxododécanyol)-L-homoserine lactone, Uracile. Ces composés n'ayant pas pu être détectés sur le système GC-MS utilisé, les paramètres développés dans le cadre des travaux de Phéllipé *et al.* (2018) ont été employés. Le MSTFA présentant toujours les meilleurs résultats sur l'ensemble des indicateurs de performances employés pour ce développement méthodologique (Tableau 42), il a été utilisé comme réactif de silylation pour l'ensemble des analyses par GC-MS sur standards. Il sera également exploité tel quel pour les profilages sur matrice EL. Les indicateurs de performance ont été calculés comme suit. Le taux de couverture correspond au taux de couverture des

voies du métabolisme central, il est calculé en faisant le ratio du nombre de composés détectés par rapport au nombre de métabolites ciblés dans les voies investiguées. La complexité correspondant à la complexité du chromatogramme est calculée en rapportant le nombre total de pics sur le nombre total de composés détectés. Les coefficients de réponse correspondent au ratio de l'aire du pic du composé étudié sur la quantité du même composé injecté dans la colonne (exprimée en ng). Les coefficients de variations sont mesurés sur 5 réplicas indépendants.

Tableau 42. Valeur des indicateurs de performance de la dérivation des composés cible pour le MSTFA.

Indicateurs	MSTFA
Taux de couverture	60%
Complexité	1,2
Coefficients de réponse	4.107
Coefficients de variation	0,19

3.3.2.2 Quantification absolue des composés analysables

Les analyses ciblées et non ciblées devant être réalisées en une seule injection pour des raisons pratiques, la quantification doit être effectuée en mode fullscan (FS, mode d'acquisition des données de spectrométrie de masse où l'on enregistre tous les ions sur une large gamme de masse 50-800m/z) et non pas en mode Single Ion Monitoring (SIM, mode d'acquisition des données de spectrométrie de masse où l'on enregistre des ions spécifiques à une famille de composés) comme il est généralement recommandé de le faire. Le mode SIM permet en effet une augmentation du ratio signal sur bruit et donc une meilleure précision lors de la quantification absolue de composés. Il réduit cependant le nombre d'ions analysés par le détecteur de masse et diminue ce faisant l'exhaustivité de l'analyse nécessaire au profilage non ciblé. Les courbes de calibration, limites de détection et de quantification présentées dans cette partie correspondent donc à des données calculées sur des analyses en mode FS.

Les courbes de calibration ont été tracées pour l'ensemble des composés détectables, la Figure 40 présente quelques exemples de ces courbes (l'ensemble de ces courbes est présenté dans l'Annexe B). La limite de quantification a été sélectionnée de manière à ce que le point le plus faible corresponde au moins à la quantité de matière minimum pour obtenir un signal suffisamment répétable (CV<80%). La quantité de matière maximum est une quantité proche de la limite de saturation du détecteur sans pour autant l'atteindre. Toutes les intensités mesurées (quintuplicats indépendants) sont rapportées à celle du standard interne utilisé pour corriger la variabilité analytique.

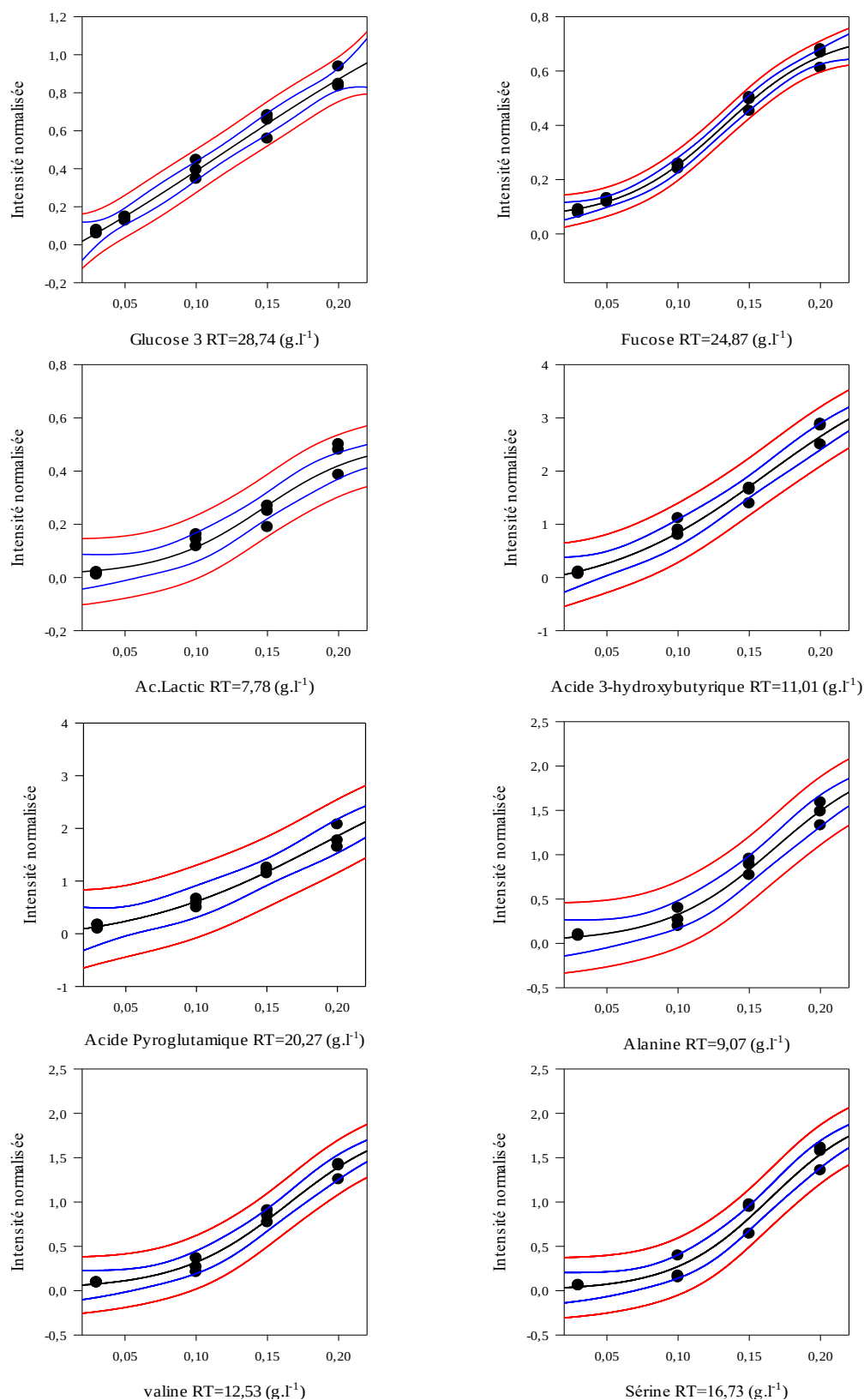


Figure 40. Exemples de courbes de calibration pour les glucose, fucose, acide lactique, acide hydroxybutyrique, acide pyroglutamique, alanine, valine et sérine après dérivation au MSTFA et analyse en mode Full Scan. La réponse (trait noir) suit une courbe sigmoïdale d'équation $y=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$. Lorsque les tracés des courbes sigmoïdales théoriques ne sont pas confondus avec les intervalles de confiance et de prédiction à 95% ceux-ci sont respectivement représentés en bleu et en rouge.

Les limites de détection, de quantification et de saturation ont été également calculées pour l'ensemble des composés quantifiables, ces valeurs sont présentées dans le Tableau 43.

Tableau 43. Limites de détection et quantification, coefficient de variation et temps de rétention des composés cibles. Les valeurs de R^2 et de R^2 ajusté correspondent à une régression sigmoïdale à 4 paramètres d'équation $f = y_0 + a/(1 + \exp(-(x-x_0)/b))$. Les limites de détection (LOD) de quantification (LOQ) et de saturation (LOS) sont exprimées en ng de composés injectés dans le système analytique.

	LOD ng inj	LOQ ng inj	LOS ng inj	R^2	R^2 ajusté
Monosaccharides					
Arabinose	< 0,6	0,6	> 4	0,985	0,981
Rhamnose	< 0,6	0,6	> 4	0,966	0,956
Fucose	0,6	2	> 4	0,992	0,99
Xylose	< 0,6	0,6	> 4	0,987	0,983
Mannose	< 0,6	0,6	> 4	0,981	0,975
Fructose	< 0,6	0,6	3	0,935	0,918
Galactose	0,6	1	> 4	0,933	0,915
Myo-inositol	< 0,6	0,6	> 4	0,972	0,965
Glucose	< 0,6	0,6	3	0,951	0,937
Acide gluconique	2	-	-	-	-
Acides organiques					
Ac lactique	< 0,6	0,6	> 4	0,948	0,933
Ac pyruvique	< 0,6	0,6	> 4	0,919	0,895
Ac 3-OH butyrique	< 0,6	0,6	> 4	0,974	0,967
Ac succinique	0,6	2	> 4	0,947	0,933
Ac glyoxylique	0,6	2	> 4	0,958	0,947
Ac fumarique	< 0,6	0,6	> 4	0,894	0,865
Ac malique	0,6	2	> 4	0,934	0,916
Ac pyroglutamique	< 0,6	0,6	> 4	0,925	0,905
Ac alpha ceto glutarique	< 0,6	0,6	> 4	0,917	0,895
Ac citrique	0,6	2	> 4	0,757	0,69
Ac isocitrique	0,6	2	> 4	0,797	0,741
Acides aminés					
Alanine	0,6	2	> 4	0,965	0,955
Glycine	0,6	2	> 4	0,973	0,966
valine	0,6	2	> 4	0,973	0,965
Leucine	0,6	2	> 4	0,976	0,97
Proline	0,6	2	> 4	0,959	0,948
Isoleucine	0,6	2	> 4	0,974	0,967
Sérine	0,6	2	> 4	0,975	0,969
Thréonine	0,6	2	> 4	0,977	0,971
Cystéine	0,6	2	> 4	0,981	0,976
Acide glutamique	0,6	2	> 4	0,96	0,949
Lysine	0,6	2	> 4	0,941	0,924
Glutamine	0,6	2	> 4	0,952	0,936
Tyrosine	2	2	> 4	0,994	0,992
Tryptophane	0,6	2	> 4	0,965	0,955

Les limites de détection, de quantification, ainsi que la linéarité des réponses des métabolites silylés ont été mesurées. Les courbes de calibration obtenues pour les 39 composés analysables suivent une allure sigmoïdale à 4 paramètres comme illustré sur la Figure 40. Ces résultats indiquent une gamme dynamique s'étalant sur au moins un ordre de grandeur avec une limite basse inférieure à 0,6 ng et haute située au-dessus de 4 ng pour la majeure partie des composés.

La famille des acides organiques présente les limites de détection les plus basses (égale ou inférieure à 0,6 ng pour l'ensemble des composés). Tous les acides aminés présentent la même limite de détection ($\leq 0,6$ ng) à l'exception de la tyrosine détectable à partir de 2 ng. Les monosaccharides présentent également tous une limite de détection inférieure ou égale à 0,6 ng à l'exception de l'acide gluconique. Finalement, ces résultats sont similaires aux tendances déjà observées pour la réactivité du MSTFA vis-à-vis de ces différentes familles de composés (Phélippé *et al.* 2018).

3.3.3 Echantillonnage des EL pour le profilage de ses métabolites

Dans cette partie sont présentées les étapes du protocole spécifiquement développées pour l'analyse des EL frais et dégradés. Pour des raisons pratiques de simplicité d'accès aux outils analytiques et de rapidité de traitement des données enregistrées, les développements de ces différentes étapes de préparation des échantillons ont été réalisés en se basant sur les résultats de GC-MS, technique peu versatile et très sensible. Ils ont été considérés comme étant complémentaires au profilage par RMN (technique versatile et sensible) dans la suite du projet.

- *Analyse combinée déprotéination / séparation en fractions métaboliques*

On se propose dans ce développement méthodologique d'optimiser de façon concertée le protocole de déprotéination avec le protocole de production de fractions métaboliques de polarités complémentaires, et ce pour obtenir la plus grande chimiodiversité possible. Cette chimiodiversité sera mesurée par profilage GC-MS avec la méthode développée au paragraphe 3.3.2.1. Elle sera appréciée à travers une double approche. Une première en « aveugle » se focalisera sur la distribution des aires cumulées de l'ensemble des signaux et les coefficients de variation associés aux différents paramètres expérimentaux indépendamment de l'annotation des composés. La seconde approche sera réalisée après une première annotation des composés identifiables pour être ensuite employée dans le but d'identifier l'impact des paramètres expérimentaux sur la capacité à détecter des métabolites spécifiques. On appellera ici « protocole de fragmentation », un protocole d'extraction liquide-liquide biphasique permettant d'extraire de l'EL déprotéiné les métabolites selon leur polarité. Ainsi en séparant les composés polaires des composés apolaires, on simplifiera la lecture des analyses,

principalement en limitant le nombre de signaux enregistrés sur les courants ioniques totaux. Un mélange ternaire Méthanol / Chloroforme / Eau permettant une extraction efficace des métabolites bactériens a été employé (voir Séparation / Extraction dans un mélange ternaire de solvants organiques). Il s'agira ici de sélectionner un optimum pour le taux de solvant de déprotéination et la composition du mélange ternaire Méthanol / Chloroforme / Eau afin de maximiser la chimiodiversité accessible en GC-MS. Ces tests ont été réalisés à travers un plan d'expériences à deux facteurs (déprotéination – fractionnement) présentant respectivement 4 et 3 modalités. Les résultats concernant les fractions polaires et apolaires sont analysés de façon indépendante.

- *Choix des paramètres pour la déprotéination*

Suite aux essais réalisés en amont et présentés dans l'Annexe C seul le facteur taux de solvant a été retenu pour la déprotéination. Les modalités suivantes ont été testées : x16 x32 x56 et x80.

- *Composition du mélange ternaire*

Trois mélanges référencés dans la littérature ont été testés (voir Séparation / Extraction dans un mélange ternaire de solvants organiques) ; leur composition est présentée dans le Tableau 44.

Tableau 44. Composition des mélanges MCW exprimées pour 100mL (v/v)

	Méthanol		Chloroforme		Eau	
	Fraction volumique	Volume (mL)	Fraction volumique	Volume (mL)	Fraction volumique	Volume (mL)
MCW - A (10/3/1)	10	71,43	3	21,43	1	7,14
MCW - B (4/3/1)	4	50,00	3	37,50	1	12,50
MCW - C (1/1/0,1)	1	47,62	1	47,62	0,1	4,76

Les résultats détaillés des différents essais (analyses gravimétriques, profilages biochimiques par IRTF et profilages métaboliques par GC-MS) sont présentés dans l'Annexe D .

o *Sélection des paramètres de déprotéination et de fractionnement métabolique - Analyse de la qualité des chémotypes en aveugle*

L'impact des deux paramètres sélectionnés (taux de solvant de déprotéination et composition du mélange MCW) sur la qualité des chémotypes obtenus par GC-MS a été évalué dans le but de sélectionner les meilleurs paramètres de préparation de l'échantillon d'EL (déprotéination et fragmentation MCW). Le Tableau 45 présente un résumé des indicateurs de qualité mesurés ci-dessus sur les échantillons issus de chaque mode de préparation.

Tableau 45. Bilan des indicateurs de qualité pour la sélection de paramètres de déprotéination et de fragmentation MCW optimisés.

Moyenne des intensité des aires cumulées												
Mélange MCW	MCW A				MCW B				MCW C			
Ratio solvant de déprotéination / échantillon	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80
Fraction polaire	1,48E+08	1,05E+08	2,98E+08	1,88E+08	1,43E+08	1,61E+08	1,77E+08	1,54E+08	1,77E+08	1,42E+08	1,80E+08	2,37E+08
Fraction apolaire	1,06E+08	1,15E+08	1,03E+08	1,43E+08	2,08E+08	1,98E+08	1,59E+08	1,71E+08	1,70E+08	1,67E+08	1,53E+08	1,60E+08
Médiane des intensités des aires cumulées												
Mélange MCW	MCW A				MCW B				MCW C			
Ratio solvant de déprotéination / échantillon	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80
Fraction polaire	1,54E+08	9,21E+07	2,39E+08	1,65E+08	1,40E+08	1,74E+08	1,52E+08	1,28E+08	1,94E+08	1,40E+08	1,65E+08	1,79E+08
Fraction apolaire	1,02E+08	1,11E+08	1,01E+08	1,47E+08	2,04E+08	1,89E+08	1,65E+08	1,68E+08	1,70E+08	1,54E+08	1,57E+08	1,55E+08
Coefficient de variation des intensités des aires cumulées												
Mélange MCW	MCW A				MCW B				MCW C			
Ratio solvant de déprotéination / échantillon	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80
Fraction polaire	37,79	26,79	52,15	45,00	24,21	31,46	45,90	38,87	40,67	5,54	22,15	54,54
Fraction apolaire	11,21	21,80	22,92	14,68	6,99	13,45	12,91	12,14	26,61	26,05	8,73	19,87
Pour les composés détectés dans tous les réplicas uniquement												
Mélange MCW	MCW A				MCW B				MCW C			
Ratio solvant de déprotéination / échantillon	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80
Fractions polaires												
CV Moyen	46,58	44,67	45,12	50,20	34,68	45,87	36,02	26,79	44,09	28,51	25,07	43,81
CV Médian	44,83	46,81	46,72	50,51	37,28	46,71	33,65	22,66	40,26	27,45	23,05	43,08
Nb composés	23	23	24	23	27	29	25	22	24	31	26	22
Fractions apolaires												
CV Moyen	21,64	26,81	24,18	17,99	18,90	25,83	17,96	17,37	28,21	24,74	17,16	14,31
CV Médian	16,80	24,74	20,52	15,13	13,88	21,30	16,87	16,69	20,23	19,21	12,65	14,19
Nb composés	17	25	23	27	28	28	30	29	25	31	30	30

Les résultats de gravimétrie suggèrent que la quantité de matière récupérée augmente de manière significative avec l'accroissement des quantités de solvant utilisé pour la déprotéination, laissant supposer une augmentation du nombre de composés présents après déprotéination et donc de la chimiodiversité associée. Cependant les résultats sur l'estimation par GC-MS de la chimiodiversité de ces mêmes fractions, ne confirment pas du tout cette tendance. Au contraire, les indicateurs utilisés (Intensité des aires cumulées, coefficients de variation mesurés) semblent, pour une condition donnée ne pas subir de variation importante, suggérant ainsi un accès optimal à la chimiodiversité détectable par GC-MS et ce dès les premiers systèmes déprotéination/fractionnement métaboliques testés. Un ratio de solvant de déprotéination de x16 serait à privilégier puisqu'en plus de proposer une chimiodiversité déjà optimale, il permet une gestion pratique des échantillons plus efficace (étapes d'évaporation moins chronophages entre autre). Les couples de paramètres présentant les meilleurs compromis seraient d'après les données du Tableau 45 le MCW B avec un ratio de x16 et le MCW C avec des ratios de x32 et x56. En effet ces trois couples de paramètres présentent des valeurs d'aires médianes cumulées (respectivement de $1,43.10^8$, $1,42.10^8$ et $1,80.10^8$ pour les fractions polaires avec des CV de 24,21% ; 5,54% et 22,15% , $2,04.10^8$, $1,67.10^8$ et $1,53.10^8$ pour les fractions apolaires

avec des CV de 6,99% , 26,05% et 8,73%) à la fois optimales et répétables. Le choix s'est finalement porté sur le MCW B avec un ratio de solvant de déprotéination de x16, en raison du plus faible taux de solvant impliquant une gestion plus rapide des échantillons. Cela permettra notamment, lors des études cinétiques de l'altération, une plus grande fréquence d'échantillonnage et la réalisation d'un nombre plus important de réplicats.

o *Conclusion – Validation des paramètres sélectionnés
par analyse des composés annotés dans les fractions polaires et apolaires*

La sélection des paramètres de déprotéination et de fractionnement métabolique en aveugle (sans procéder à l'identification des composés) a été confirmée après annotation d'une partie des composés des différentes fractions. Les composés ont été comparés à la base de données en ligne GMD à l'aide de la plateforme W4M (3.4.3). Une liste de 24 métabolites a pu être annotée dans les fractions polaires et apolaires des échantillons. Cette liste est présentée dans le Tableau 46.

Tableau 46. Liste des métabolites annotés dans l'ensemble des fractions polaires et apolaires

Fractions polaires	Fractions apolaires
Adipamide	Cholestérol
Isoleucine	Acide oléique
Norleucine	Acide tetracosénoïque
Norvaline	Acide sébacique
Glucopyranose	Acide phosphorique
Acide Sébacique	Tocophérol, alpha-
Proline	Norleucine
Erythrose	Isoleucine
Acide Phosphorique	
Tyrosine	
Phénylalanine	
Alanine	
Cholestérol	
Acide palmitique	
Octacosane	
Homoserine lactone, N-tetradecanoyl-	

La présence de ces métabolites dans les fractions métaboliques issues des protocoles de séparation en fonction des paramètres employés a ensuite été explorée dans le but de confirmer la sélection des paramètres permettant de maximiser l'exhaustivité de l'analyse. Un récapitulatif du nombre de composés de cette liste, détectés dans chaque fraction est présenté dans le Tableau 47.

Tableau 47. Nombre de composés détectés et identifiés dans chaque fraction en fonction des paramètres de déprotéination et de fractionnement métabolique

	MCW A				MCW B				MCW C			
Taux de solvant	X16	x32	x56	x80	X16	x32	x56	x80	X16	x32	x56	x80
Apolaire	6	6	7	7	8	8	8	8	8	8	8	7
Polaire	12	11	12	10	14	16	14	13	12	11	10	10

Sur les 17 métabolites identifiés dans la fraction polaire, les meilleurs taux de couverture correspondent au MCW B avec des ratios de x16, x32, x56 et x80 permettant respectivement la détection de 14, 16, 14 et 13 des 17 métabolites. Pour la fraction apolaire, le MCW B avec l'ensemble des ratios de solvants et le MCW C avec les ratios de x16, x32 et x56 permettent la détection de 8 des 9 composés identifiés.

Le MCW B apparaît clairement comme le mélange le plus adapté, en tout cas pour la détection des composés présentés dans le Tableau 46. Le mélange MCW B avec un ratio de solvant de x16 retenu dans le cadre de l'approche en aveugle d'optimisation des paramètres de déprotéination et de fragmentation métabolique présente ici une capacité de détection proche du maximum avec une couverture de 14 des 17 métabolites identifiés dans les fractions polaires et de 8 sur 9 métabolites identifiés dans les fractions apolaires. Le meilleur score ayant été obtenu avec le MCW x32 est contrebalancé par la plus grande variabilité observée dans la partie précédente quant au nombre de composés détectés dans la fraction polaire (CV de 26,28 % contre 9,01% pour le MCW x16).

En conclusion, les paramètres retenus pour l'optimisation de la déprotéination et de la fragmentation métabolique seront le MCW B avec un ratio de solvant de déprotéination de x16. Ces paramètres ont été sélectionnés en raison de leur capacité à générer l'analyse la plus exhaustive et répétable, tout en permettant un traitement relativement rapide des échantillons en raison du faible volume de solvant à évaporer.

3.3.4 Evaporation des extraits métaboliques obtenus après déprotéination et séparation en fractions métaboliques

Les protocoles de déprotéination et de fractionnement métabolique ont été micronisés de façon à minimiser le volume d'échantillon d'EL nécessaire à l'analyse. Cela permettra, lors de l'étude en cinétique contrôlée, d'optimiser le nombre de réplicats et de maximiser la fréquence d'échantillonnage pour les prises d'empreintes métaboliques. Les faibles masses ainsi obtenues étaient excessivement sensibles à la manipulation. Il a donc été nécessaire de contrôler toutes les étapes susceptibles de provoquer des pertes de matières, et plus particulièrement les phases d'évaporation. L'approche gravimétrique n'était pas pertinente pour l'étude des différentes approches d'évaporation des échantillons, en raison de la précision des balances disponibles (Δ 0,1mg). L'efficacité de ces

approches a donc dû être évaluée par analyse des données issues du protocole de chémotypage par GC-MS. Deux techniques de séchage ont été testées, le séchage sous flux d'azote et le séchage à l'évaporateur rotatif (speedVac) (voir Séchage des échantillons). Chacune des méthodes a été testée sur six échantillons modèles auxquels ont été ajoutés 19 µg de ribitol (molécule témoin) puis après séchage et dérivation, 10 µL d'une solution de pyridine contenant 4.05 µg/L de squalane soit 0,0405 µg. Le squalane étant ajouté après les étapes de séchage et de dérivation, il ne sera pas affecté par les paramètres de ces étapes et sera utilisé comme témoin pour corriger la variabilité liée à l'injection.

Les résultats présentés correspondent au ratio du signal du ribitol sur celui du squalane pour chaque échantillon. La Figure 41 présente la distribution des intensités normalisées obtenues pour chaque méthode de séchage.

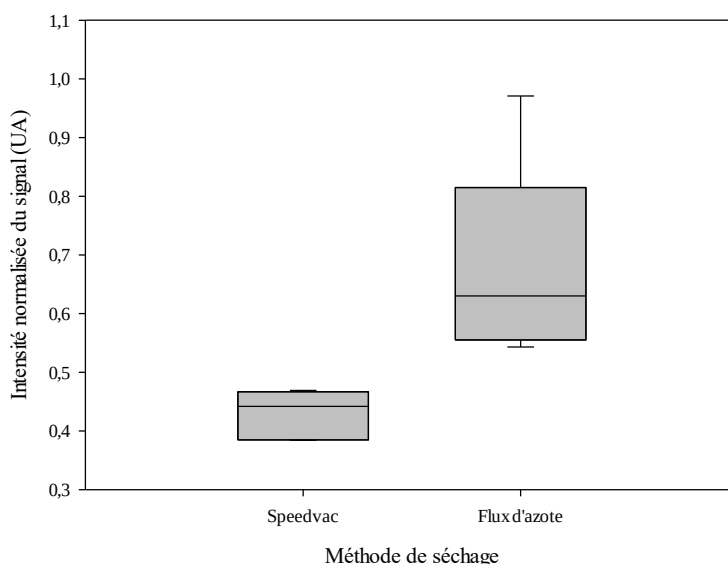


Figure 41. Distribution des intensités normalisées correspondant au signal du ribitol/squalane en fonction de la méthode de séchage employée, calculée sur 6 réplicats

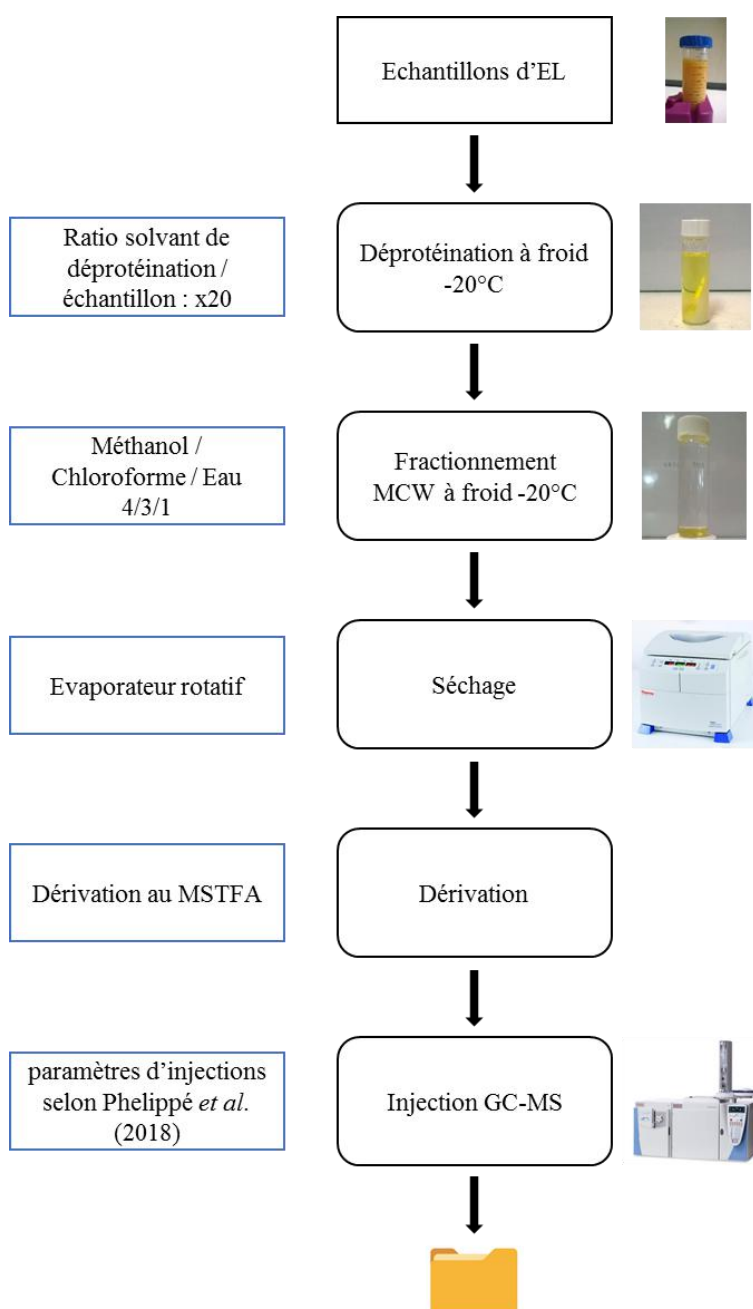
Les résultats obtenus suggèrent que les échantillons séchés sous flux d'azote présentent à la fois une intensité relative et une variabilité du signal plus importante que ceux traités avec un évaporateur rotatif (speedvac). L'intensité relative moyenne du signal est de 0,43 pour les échantillons séchés à l'aide d'un évaporateur rotatif, contre 0,68 pour ceux séchés sous flux d'azote. Les valeurs médianes sont proches des valeurs moyennes, indiquant une distribution relativement homogène (0,44 pour le SpeedVac et 0,63 pour de Flux d'azote). En moyenne, un séchage sous flux d'azote améliorerait la sensibilité des signaux de 58,3% par rapport à un séchage sous évaporateur rotatif. Le résultat du test de Student effectué sur les valeurs d'intensités normalisées du ribitol dans les échantillons de chaque groupe permet de conclure qu'une différence significative des valeurs moyennes est observée entre les deux groupes (p-value <0,05). Les coefficients de variations ont été également estimés pour chaque méthode de séchage. Ils sont de 8,84% pour les échantillons séchés à

l'aide d'un évaporateur rotatif contre 24,39% pour ceux séchés sous flux d'azote. Le passage du SV au flux d'azote impliquerait donc une augmentation médiane de l'intensité relative d'environ 58,1%, mais cette augmentation serait associée à un très fort accroissement du coefficient de variation et donc à une importante dégradation de la répétabilité du protocole (de plus de 175 %). Cette dégradation de la répétabilité pourrait être expliquée par un accroissement de la durée nécessaire pour le séchage sous flux d'azote des échantillons les moins volatils. En effet, les échantillons étant plongés dans un bain d'eau à 38°C pour faciliter leur évaporation, il est possible que certains composés thermolabiles soient dégradés au cours de cette étape. Afin de s'assurer de la robustesse globale de la prise d'empreinte métabolique, le séchage à l'évaporateur rotatif sera donc employé préférentiellement, privilégiant à une augmentation aléatoire des signaux enregistrés, la répétabilité globale du protocole et donc les chances d'obtenir des marqueurs statistiquement significatifs.

3.3.5 Protocole complet de prise d'empreintes métaboliques optimisé pour la matrice EL

Dans le but d'obtenir les profils métaboliques les plus exhaustifs possibles, il a été nécessaire d'adapter à la matrice EL toutes les étapes de préparation d'échantillon et d'analyse. Un récapitulatif des différentes étapes du protocole de prise d'empreinte métabolique ayant fait l'objet de développements est présenté sur la Figure 42. Les paramètres opératoires optimisés ayant permis l'obtention des meilleurs profils sont rappelés.

Figure 42. Schéma du protocole de prise d'empreintes métaboliques par GC-MS présentant les étapes ayant fait l'objet d'une démarche d'optimisation (blocs noirs) et les paramètres optimisés sélectionnés à l'issue de cette démarche (blocs bleus).



Les échantillons d'EL sains et altérés sont déprotéinés à -20°C en présence de solvants organiques (acétone et éthanol) avec un ratio solvant de déprotéination / échantillon de 20. Les échantillons sont ensuite séchés dans un évaporateur rotatif. Une fois sec, les échantillons sont solubilisés dans un mélange ternaire Méthanol / Chloroforme / Eau (4/3/1) à -20°C. Après l'ajout d'eau (Tableau 30) l'équilibre du système est perturbé, permettant la formation de deux phases et engendrant la répartition des métabolites polaires et apolaires dans les deux phases formées. La variabilité de cette étape a été mesurée à travers différents indicateurs : les nombres moyens et les coefficients de variation des composés détectés dans les réplicats, ainsi que les moyennes, médianes et coefficients de variation des intensités des aires cumulées mesurées dans les différents réplicats et enfin le nombre de composés détectés parmi une liste de 20 composés annotés. Le couple de paramètres présentant le meilleur compromis quant à ces différents indicateurs correspondait à une déprotéination avec un ratio de solvant de déprotéination / échantillon de 20 et l'utilisation d'un mélange MCW 4/3/1 pour la séparation en fractions métaboliques. Avec ces paramètres, le nombre moyen de composés détectés est de 48,25 dans la fraction polaire et de 42 dans la fraction apolaire, avec des CV respectifs de 9,01 et 7,53%. Les aires cumulées moyennes et médianes mesurées étaient de $1,4310^8$ et $1,4010^8$ pour la fraction polaire et de $2,0810^8$ et $2,0410^8$ pour la fraction apolaire avec des CV respectifs de 24,21 et 6,99%. Sur la liste des 26 composés identifiés dans cette analyse, ces mêmes paramètres permettent le meilleur taux de couverture avec la détection de 14 composés sur les 17 identifiés dans la fraction polaire et de 8 composés sur les 9 identifiés dans la fraction apolaire.

Les fractions métaboliques polaires et apolaires obtenues sont ensuite séchées. La variabilité induite par cette étape de séchage en fonction de la méthode utilisée (évaporation sous flux d'azote ou dans un évaporateur rotatif) a été évaluée à travers le calcul de l'intensité des signaux d'un composé témoin (le ribitol) et de leur coefficient de variation dans les différents réplicats. L'évaporation sous flux d'azote a permis l'obtention des intensités les plus importantes (intensité relative de 0,68) en comparaison de celles obtenus après séchage dans un évaporateur rotatif (intensité relative de 0,43). Cependant, cette augmentation des intensités mesurées est contrebalancée par une augmentation de la variabilité. En effet, des coefficients de variation mesurés pour l'évaporation au flux d'azote étaient de 24,39% contre 8,84% pour l'évaporation dans un évaporateur rotatif. L'utilisation de l'évaporateur rotatif a donc été retenue pour l'ensemble des étapes de séchage afin de privilégier la répétabilité de l'analyse à une augmentation aléatoire des signaux enregistrés.

La variabilité globale induite par le protocole de prise d'empreintes métaboliques peut être appréciée en analysant les coefficients de variation moyens observés pour les paramètres sélectionnés lors de l'étude combinée déprotéination / séparation en fractions métaboliques (-). Les coefficients de variation moyens et médians calculés sur les échantillons après analyse selon les paramètres décrits dans la Figure 42 étaient respectivement de 34,68 et 37,28 pour la fraction polaire et de 18,90 et 13,88

pour la fraction apolaire. La variabilité moyenne engendrée par le protocole complet de prise d'empreintes métaboliques est inférieure à 35 % pour les fractions polaires et inférieures à 20% pour les fractions apolaires. Ces valeurs de variabilité sont tout à fait acceptables dans le cadre d'analyses métabolomiques. En effet, dans l'étude de Phéllippé *et al.* (2018) où la même méthode de profilage par GC-MS (en dehors des étapes de préparation d'échantillons spécifiques à la matrice) a été employée, des coefficients de variation moyens de l'ordre de 35 % ont été observés dans les fractions métaboliques analysées en mode SIM. L'obtention de coefficients de variation de cet ordre pour les composés détectés lors d'une analyse non ciblée (en mode Full Scan) permet de confirmer la robustesse de la méthode de profilage des EL développée dans le cadre de ces travaux.

3.4 Traitement des données de prise d'empreinte et de profilage métabolique par GC-MS

A l'issue du protocole d'analyse des échantillons, les courants ioniques totaux ou TIC (Total Ion Current) sont stockés sous forme de fichiers « .RAW » par le logiciel Excalibur (Thermo, France), un exemple de TIC est présenté dans la

Figure 43. Le traitement de ces données brutes est ensuite réalisé en différentes étapes incluant la préparation des fichiers, le prétraitement des données, l'analyse à proprement parler et la production de graphiques permettant de visualiser les informations plus simplement.

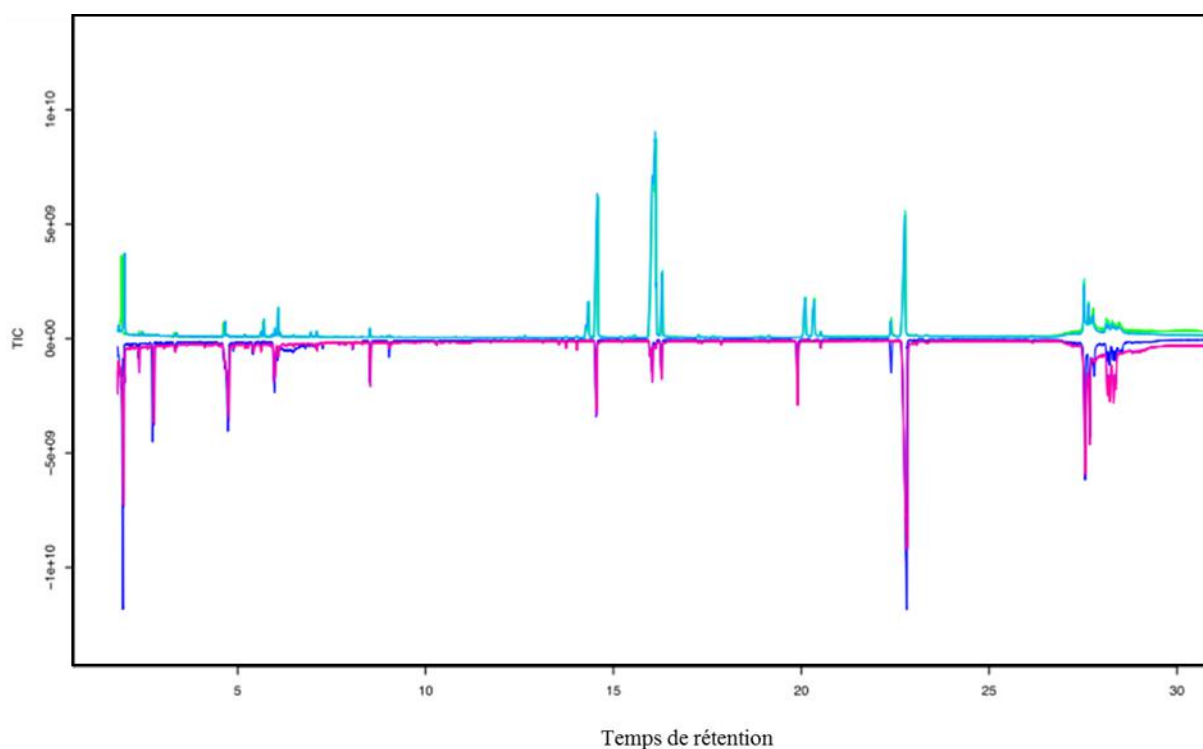


Figure 43. Exemple de TIC présentés en miroir pour les fractions polaires d'échantillons d'EL industriels sains en positif et altérés en négatif.

Différents prétraitements doivent être appliqués en amont du traitement des données issues du profilage métabolique des échantillons. Les étapes de filtration du bruit de fond et de normalisation des signaux sont les plus importantes. L'étape de filtration permet d'éliminer les artefacts correspondant aux signaux non désirables enregistrés au cours de l'acquisition ; l'étape de normalisation permet quant à elle de s'affranchir de la variabilité liée à l'injection et au système de séparation des composés (GC). L'impact de ces étapes de prétraitement sur les données enregistrées a été évalué dans le but de déterminer les paramètres de filtration optimaux et de confirmer la pertinence de la normalisation des signaux. Les résultats des essais de filtration et normalisation ainsi qu'un récapitulatif du protocole de traitement des données de profilage développé sont présentés dans cette partie.

3.4.1 Les données des empreintes métaboliques sont filtrées avant interprétation

Avant d'interpréter les données des empreintes métaboliques enregistrées par GC-MS, il a été nécessaire de filtrer les signaux extraits des chromatogrammes d'ions totaux ou TIC. Cela a permis de limiter la contribution du bruit de fond généré par des pics parasites (signaux liés au système analytique et non à la matrice étudiée). La sélection des paramètres de filtration a été développée sur la fraction présentant la plus grande variabilité analytique (sur données brute), la fraction apolaire issue d'une déprotéination à l'acétone ou fraction « acétone apolaire ». Deux paramètres de filtration ont été testés. L'indicateur de « Minimum Class Fraction » ou MCF qui correspond à l'occurrence minimum d'un signal dans tous les chromatogrammes analysés pour que ce dernier soit considéré comme pertinent. L'indicateur de « Minimum Class Size » ou MCS qui correspond au nombre absolu de spectres dans lesquels les signaux devront être présents pour être considérés comme pertinents. Dans la suite des analyses le paramètre MCF a été privilégié puisqu'il permet de s'affranchir du nombre de spectres présents par analyse lors des calculs. Les analyses de variabilité et d'impact de la congélation ayant été réalisées sur cinq répliques biologiques et deux répliques techniques, 10 échantillons ont été traités par classe. Les paramètres MCF et MCS ont été modulés comme décrit ci-dessous pour l'obtention d'un système de filtration plutôt drastique et d'un autre plutôt étendu :

- « MCF 0.5 / MCS 5 » Chaque signal devra être présent dans 5 des 10 chromatogrammes analysés pour être considéré comme pertinent. Ce paramétrage correspond ici à une sélection très stricte des données jugées comme significatives.
- « MCF 0.1 / MCS 1 » Chaque signal devra être présent dans 1 des 10 chromatogrammes analysés pour être considéré comme pertinent. Ce paramétrage correspond ici à une sélection étendue des données jugées comme significatives (toutes les données sont conservées).

Afin d'estimer la répétabilité des analyses réalisées à l'aide des deux systèmes de filtration décrits ci-dessus et de choisir le paramétrage le plus adéquat, les coefficients de corrélation de Spearman ont été calculés entre les différents réplicats pour une même empreinte métabolique. La distribution de ces coefficients de corrélation est présentée sur la

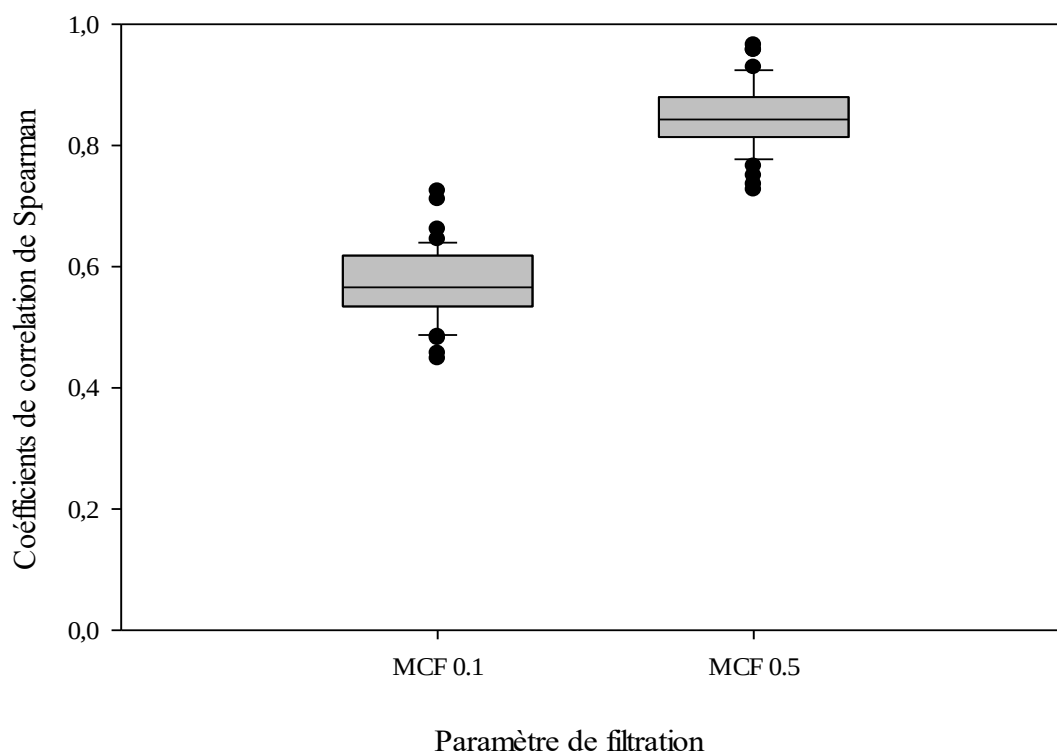


Figure 44.

Figure 44. Distribution des coefficients de corrélation de Spearman calculés sur les données spectrales (obtenues via l'outil MetaMSrun.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions acétone apolaire obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les échantillons ont été analysés par paire, sans étapes préalables de filtration pour le premier groupe (MCF 0.1) et après une étape de filtration des données selon le paramètre MCF 0.5 pour le second groupe (MCF 0.5).

Les scores de corrélation obtenus sont clairement plus élevés dans le cas d'une filtration utilisant le paramètre MCF 0.5. En effet, les valeurs moyennes et médianes des scores de corrélation du groupe MCF 0.1 sont de 0,57 et de 0,84 pour le groupe MCF 0.5. La proximité des médianes et des moyennes qui ne sont ici différenciables qu'à partir de la 3^{ème} décimale, permet de confirmer l'homogénéité de la distribution. Le calcul des coefficients de variation de ces scores de corrélation pour chacun des paramètres de filtration permet d'apprécier la dispersion de leur distribution. En effet, les coefficients de variation calculés sur ces scores de corrélation sont de 107% pour le groupe MCF 0.1 et de 6,53% pour le groupe MCF 0.5. Il apparaît ici que la filtration avec un paramètre MCF 0.5 permet de réduire drastiquement la variabilité rencontrée lors des différentes mesures. Cet effet pourrait être associé à l'élimination de signaux parasites ne correspondant pas à une information

chimique réelle, mais plus à une trace de pollution présente dans un faible nombre d'échantillons, ou générée par le système analytique lui-même. Quoiqu'il en soit, avec ce post traitement des données brutes, il devient possible d'éliminer le bruit de fond transitoire.

Afin de vérifier cette hypothèse, les coefficients de variation ont été calculés par pseudo-composés (signaux retenus après filtration) et en fonction du paramètre de filtration utilisé. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la Figure 45.

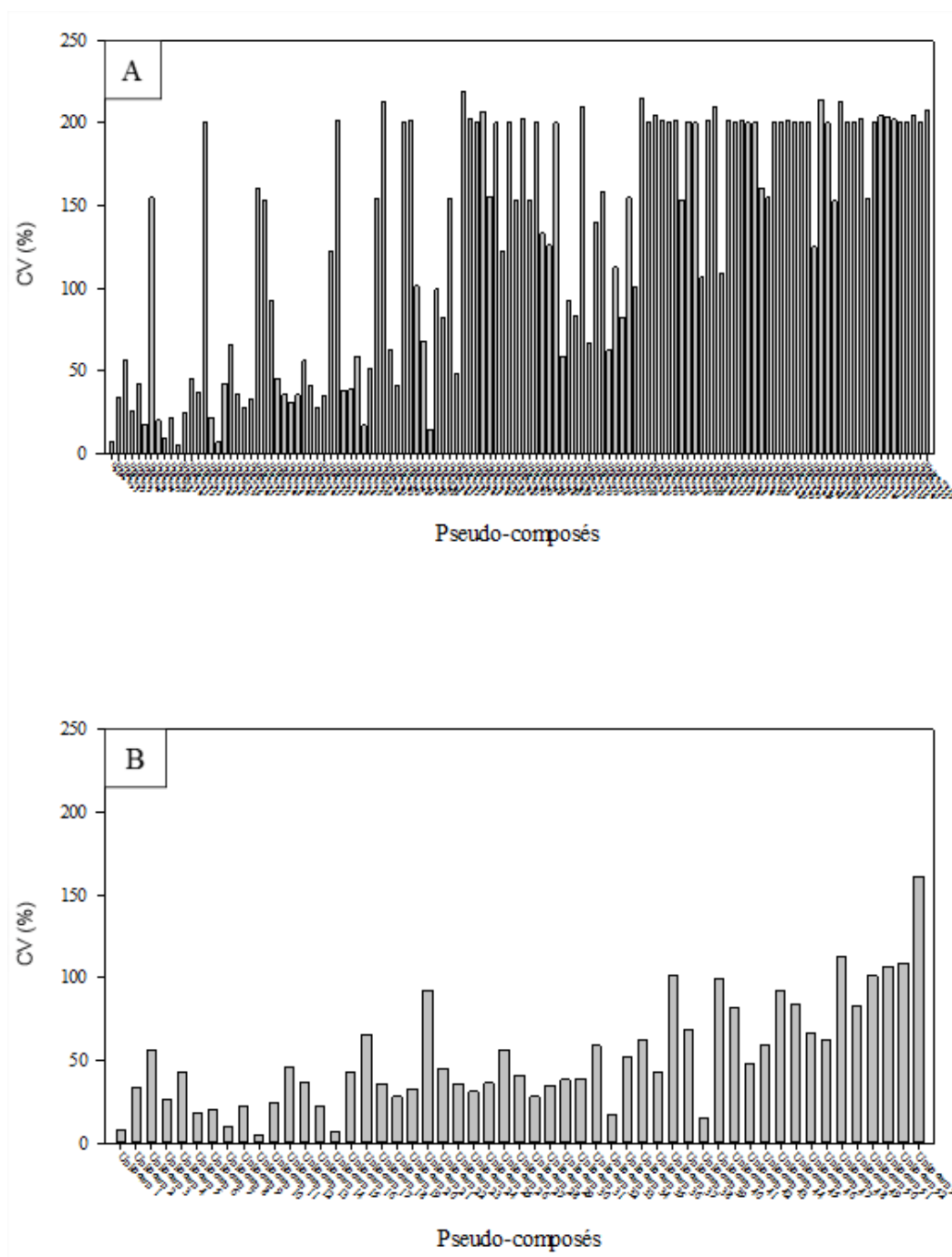


Figure 45. Coefficients de variations calculés par pseudo-composé pour les données spectrales (obtenues via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions acétone apolaires

obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées sans étape préalable de filtration (A) et après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 (B).

Une analyse qualitative de ces graphiques permet de mettre en évidence l'efficacité de la filtration MCS 0.5. En effet, la majorité des composés présentant les CV les plus élevés sont éliminés, comme en témoignent les CV beaucoup plus faibles détectés sur les composés à l'issue de la filtration. Le nombre de pseudo-composés passe ici de 125 à 53. La distribution de ces CV pour l'ensemble des pseudo-composés en fonction du paramètre de filtration utilisé est également représentée sur la Figure 46.

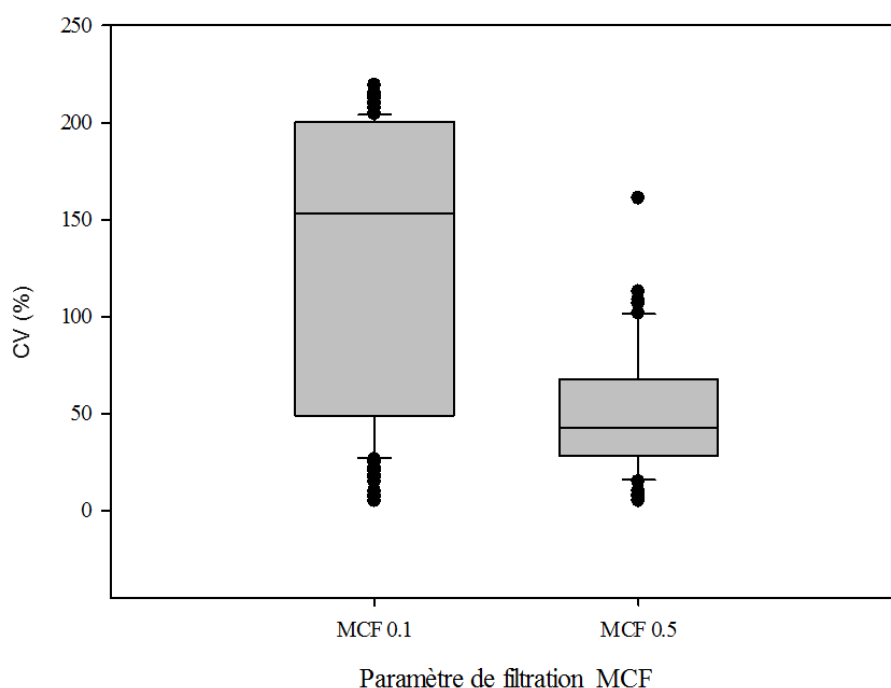


Figure 46. Distribution des coefficients de variations calculées sur les données spectrales (obtenues via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions acétone apolaire obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées sans étapes préalables de filtration pour le premier groupe (MCF 0.1) et après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 pour le deuxième groupe (MCF 0.5).

La distribution des CV présente ici une dispersion plus faible pour le groupe MCF 0.5 avec un CV médian beaucoup plus faible que celui calculé pour le groupe MCF 0.1. Les valeurs des CV médians et moyens sont de 153,4% et 129,3% pour le groupe MCF 0.1 et de 42,7% et 51,8% pour le groupe MCF 0.5. L'utilisation du paramètre de filtration MCF 0.5 apparaît donc ici comme particulièrement pertinente puisqu'il permet, en s'affranchissant des signaux présentant la plus forte variabilité, c'est à dire probablement associés à des artefacts analytiques (des exemples de spectres de masses de certains signaux éliminés sont présentés dans l'Annexe G), de diminuer les CV médians de 110,7% et moyens de 77,5%. Pour la suite des analyses les résultats seront donc filtrés selon ce paramètre.

3.4.2 Les données des empreintes métaboliques sont ensuite normalisées après l'étape de filtration

A la suite de l'étape de filtration, il a été également nécessaire de paramétrer l'étape de normalisation des données. Cette étape est primordiale puisqu'elle permet entre autre de s'affranchir de la variabilité analytique liée à l'instrument. Les résultats filtrés selon un paramètre MCF 0.5 ont été normalisés par rapport aux informations recueillies sur le standard interne (Ribitol). Toutes les intensités mesurées pour un échantillon donné ont été divisées par celle du Ribitol dans ce même échantillon. La Figure 47 présente les coefficients de variation calculés par pseudo-composé avant et après l'étape de normalisation.

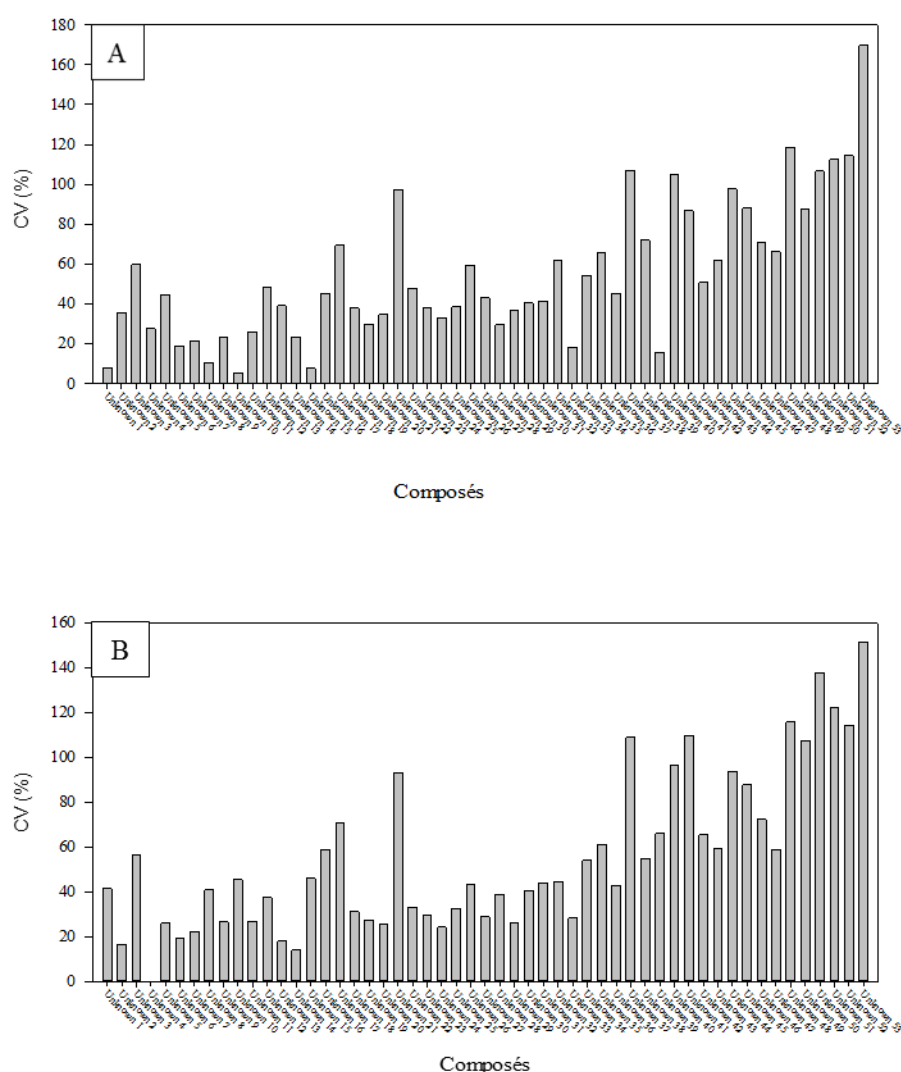


Figure 47. Coefficients de variations calculés par pseudo-composé pour les données spectrales (obtenues via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire acétone obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 sans normalisation (A) et après normalisation sur l'intensité du standard interne (B).

L'étape de normalisation ne génère pas de modification significative du CV moyen. Cependant certains pseudo-composés voient leur CV individuel fortement impacté (à la hausse ou à la baisse). Les deux premiers composés (Unknown 1 et 2) voient par exemple leur CV passer respectivement de 7,96 à 41,43% et de 35,64% à 16,37%. La distribution de ces résultats de CV pour l'ensemble des échantillons, présentée dans la Figure 48, permet une analyse de l'évolution du CV moyen de chaque groupe d'échantillons (normalisé et non normalisé).

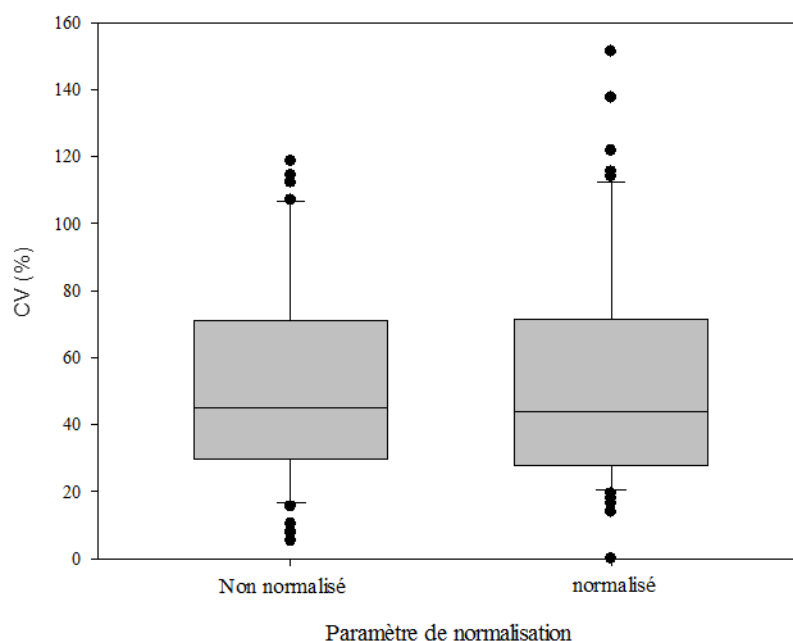


Figure 48. Distribution des coefficients de variations calculés pour les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire acétone obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 sans normalisation (Non normalisé) et après normalisation sur l'intensité du standard interne (Normalisé).

Les distributions des coefficients de variation moyens permettent ici de confirmer qu'aucune modification significative du CV moyen n'est détectée à l'issue de l'étape de normalisation. En effet les CV moyens et médians passent de 54,61% et 44,99% pour le groupe correspondant aux données non normalisées à 55,35% et 43,94% pour le groupe correspondant aux données normalisées. Le résultat d'un test de Wilcoxon Mann-Whintey permet de conclure qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux distributions. Même si le CV moyen n'est que très faiblement impacté par cette étape de normalisation, elle reste néanmoins primordiale pour une bonne interprétation des données par composé d'intérêt comme le confirment les modifications importantes des CV individuels constatées sur la Figure 47. Elle sera donc systématiquement appliquée aux profilages métaboliques des EL.

3.4.3 Protocole complet de traitement des données brutes extraites des empreintes métaboliques

Les fichiers correspondant aux données des analyses par GC-MS sont enregistrés au format « .RAW » par le logiciel d'acquisition Excalibur (Thermo, France). Les fichiers sont alors convertis au format « NetCDF » à l'aide de l'outil de conversion intégré à Excalibur. Une fois transformés, les fichiers sont organisés en dossiers par groupes d'échantillons pour l'analyse et compressés sous la forme d'une archive « .ZIP » pour le transfert vers l'infrastructure de calcul de la plateforme W4M (Giacomoni *et al.* 2014; Guitton *et al.* 2017). Un fichier contenant les temps de rétention des alcanes servant de références pour le système GC-MS utilisé est également transféré vers l'infrastructure de calcul afin de permettre la comparaison précise des temps de rétention enregistrés avec les index de rétentions des chromatogrammes de référence.

La plateforme W4M est un outil développé par l'institut français de bio-informatique et l'infrastructure nationale métaboHub dédié au traitement, à l'analyse et à l'annotation de données de métabolomiques (GC-MS, LCMS, RMN). Il a été choisi pour ses capacités de prétraitement et d'analyse semi automatisée des données issues d'analyses par GC-MS. MetaMSrunGC (Wehrens, Weingart, et Mattivi 2014), un module spécifique aux analyses par GC-MS, permet le prétraitement des données. Il utilise une combinaison des outils XCMS (Smith *et al.* 2006) pour la détection et l'alignement des pics et CAMERA (Kuhl *et al.* 2012) pour l'extraction des spectres de composés ; il permet l'obtention de tableaux de données contenant les noms et groupes des échantillons. L'intensité du signal des pseudo-composés détectés, ainsi que la liste des pseudo-composés contenant leurs profils de masse et leur index de rétention, sont ainsi obtenus. Le prétraitement des données peut être réalisé directement via l'interface de la plateforme (filtration selon le paramètre MCF 0.5 et normalisation). Les tableaux de données sont ensuite utilisés pour effectuer des analyses statistiques univariées et multivariées classiquement utilisées pour la détection de biomarqueurs ou l'analyse de profils métaboliques. Les outils de la plateforme W4M peuvent s'organiser en « Workflow » permettant la réalisation successive et automatisée des différentes étapes de prétraitement et d'analyse des données selon des paramètres prédéfinis. Les fichiers récupérés en sortie de la plateforme W4M peuvent contenir des résultats finaux ou des données intermédiaires destinées à être analysées par d'autres outils complémentaires (Sigmaplot, Matlab, Metaboanlyst,...).

Depuis 2017, un outil d'annotation semi-automatique des métabolites extraits permet la comparaison directe des composés identifiés dans une analyse à ceux contenu dans la base de données Golm Métabolome Database ou GMD. L'interface entre la plateforme W4M et la base de données GMD n'étant pas encore optimale, l'utilisation de cet outil permet l'obtention d'un tableau contenant pour chaque composé détecté les premiers « hits » (entrées de la base de données correspondant potentiellement au composé en cours d'identification) dans des lignes indépendantes. Pour chacune de

ces correspondances potentielles la ligne contient un index de rétention correspondant au composé de la base de données, et les valeurs des différents paramètres de corrélation des spectres de masse (celui enregistré et celui de la base de donnée) tels que la distance euclidienne, la distance de Jaccard ou encore le produit scalaire. Le traitement manuel de ces données d'annotation étant relativement long, la multiplication des analyses a nécessité l'automatisation de cette étape. Un script en langage Python permettant l'agrégation de ces données, gracieusement développé par S. Martin¹⁸ sous licence libre, a été utilisé pour reformater ces fichiers. Ce script permet l'obtention d'un tableau contenant une ligne unique par échantillon. Cette ligne contient les noms des deux composés ayant obtenus la meilleure valeur pour chacun des indicateurs de corrélation (index de rétention, produit scalaire, distance euclidienne, distance de Jaccard). Le tableau ainsi généré est plus facilement exploitable et permet une expertise manuelle rapide des données d'annotation ainsi proposées. Les principales étapes de traitement des données sont schématisées dans la Figure 49.

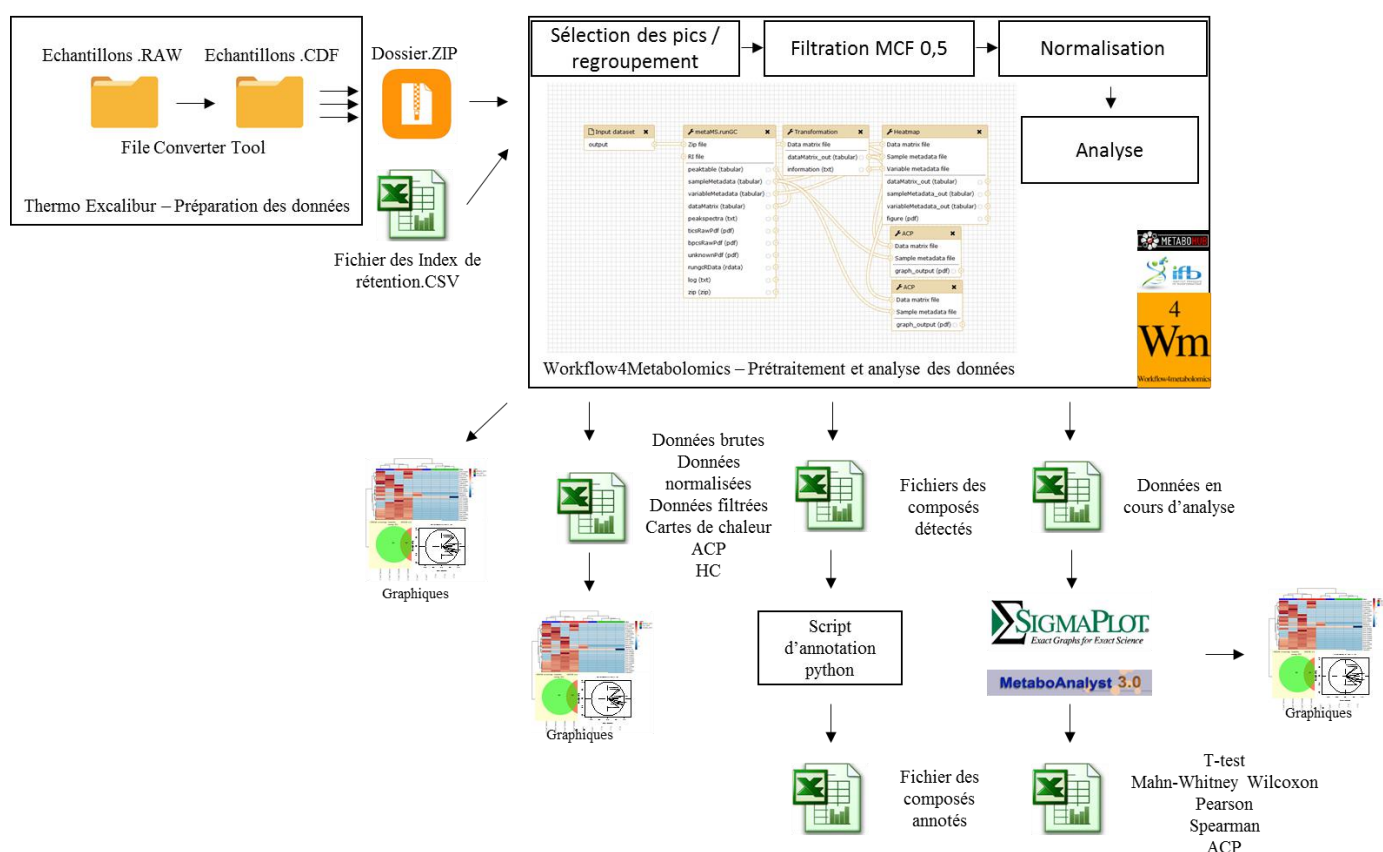


Figure 49. Schéma récapitulatif du traitement des données spectrales après analyse par GC-MS

¹⁸ Simon Martin – Programmeur indépendant

3.5 Effet de la « variabilité interne » de la matrice EL et du mode de conservation (congélation à -20°C) sur les prises d'empreinte métabolique

L'estimation de la variabilité propre à la matrice EL permettra d'évaluer le seuil de significativité pour la modulation d'un métabolite détecté lors de la prise d'empreinte sur l'échantillon étudié. Ainsi, sur un différentiel de prise d'empreinte métabolique, il sera possible, en comparant la variabilité associée à l'abondance d'un composé avec celle mesurée pour l'EL, de déterminer si la variation de ce métabolite peut être jugée significative et s'il peut être considéré comme un marqueur potentiel. En effet, une variation d'abondance ne sera pas exploitable dans le cadre de l'analyse de l'altération si elle est inférieure à la variation d'abondance typiquement mesurée dans la matière première. Cette mesure de la « variabilité interne » sera réalisée après traitement des données (tel que présenté dans la Figure 49). Elle prendra également en compte la variabilité analytique de l'ensemble du protocole de prise d'empreintes métaboliques (Figure 42).

L'analyse de l'impact de la congélation permettra quant à elle d'évaluer l'effet de la congélation/décongélation des EL à -20°C sur la qualité et la fidélité des profils métaboliques obtenus par GC-MS. En effet, en métabolomique, il est fortement recommandé de préserver les échantillons que l'on souhaite profiler dans l'azote liquide, soit à des températures situées autour de -196°C. Cela fige les réactions enzymatiques et limite la dégradation des composés les plus labiles (Álvarez-Sánchez *et al.* 2010 ; Vuckovic 2012) permettant ainsi une prise d'empreinte métabolique la plus fidèle qui soit. Cependant en raison des contraintes logistiques inhérentes à la conservation et au transport d'échantillons à très basse température, une congélation à -20°C a été retenue comme mode de conservation et de transport des échantillons entre les membres du projet. Afin de vérifier l'impact de ce mode de conservation, il a été indispensable de vérifier son influence sur les prises d'empreintes métaboliques. En cas d'innocuité, la possibilité d'échanger des échantillons congelés et donc figés dans un état d'altération donné entre les différents partenaires du projet permettra une gestion plus simple de l'aspect logistique du projet. Pour des raisons pratiques, cette expérience a été réalisée après 7 jours de congélation à -20°C, correspondant à une durée moyenne de transit entre les partenaires du projet.

3.5.1 Préparation des échantillons d'EL pour l'étude de la variabilité interne de la matrice et de l'impact du protocole de congélation

Les échantillons sont destinés à être analysés ou congelés immédiatement après prélèvement et sont donc préparés suivant le protocole de préparation des EL de façon non stérile.

Cinq échantillons sont préparés en double dont la moitié est congelée à -20°C (impact de la congélation). Les échantillons non congelés sont analysés et préparés pour l'analyse GC-MS de

manière extemporanée selon les protocoles d'analyse de déprotéination, de fragmentation MCW, de dérivation et d'analyse présentés dans la partie 0. Chaque fraction issue de la préparation des cinq échantillons est injectée deux fois dans le système GC-MS (réplicas techniques). Après 7 jours de stockage à -20°C les échantillons conservés pour l'analyse de l'impact de la congélation sont placés à 4°C toute la nuit pour subir une décongélation lente. Les échantillons sont ensuite préparés et analysés de façon similaire à ceux utilisés pour l'étude de la variabilité interne.

Les échantillons sont traités selon les protocoles et paramètres déterminés dans les parties précédentes pour la prise d'empreintes métaboliques sur EL (protocole analytique : 0, protocole de traitement des données 3.4.3).

3.5.2 Analyse de la variabilité interne des échantillons d'EL et choix des seuils de significativité des biomarqueurs de l'altération

3.5.2.1 *La variabilité interne des échantillons à été explorés par profilage*

GC-MS.

La variabilité a été estimée quantitativement par l'analyse des distributions d'intensité et la mesure des similitudes des empreintes métaboliques obtenues sur les différents échantillons (les tests de corrélation de Spearman sont utilisés en remplacement des tests de corrélation de Pearson quand les tests de normalité sur les données se sont révélés négatifs). Le calcul des coefficients de variation (CV) a été également exploité comme indicateur de la mesure directe de la variabilité interne ou associée au protocole de congélation. Les résultats détaillés de ces analyses sont présentés dans l'Annexe E.

3.5.2.2 *Choix du seuil de significativité associé à la modulation d'un*

métabolite

La variabilité médiane d'un échantillon d'EL est estimée à 50% pour l'ensemble des fractions métaboliques explorables, avec un maximum constaté pour la fraction polaire acétone à 71%. Cette dernière mesure correspond à la variabilité mesurée pour l'ensemble des signaux et il a été constaté qu'elle était fortement impactée par des signaux minoritaires avec un faible rapport signal sur bruit.

Quoiqu'il en soit, cette mesure de variabilité interne est primordiale, puisqu'elle permet d'ores et déjà de choisir le seuil de significativité à partir duquel un métabolite sera jugé comme pertinent au regard d'une étude différentielle, et donc potentiellement identifié comme un biomarqueur de l'altération des EL. Ainsi, si la variabilité naturelle de la matrice EL frais est de 50%, il est pertinent de sélectionner des composés qui présentent une variabilité qui soit au moins deux fois supérieure à la

variabilité propre à la matrice étudiée (Courant *et al.* 2013). Ainsi, pour les études portant sur des échantillons indépendants, la variation des métabolites sera jugée comme significativement pertinente si elle est supérieure à 100% entre une condition témoin (matrice EL non altérée) et un essai (matrice EL altérée). Cela correspond donc à un changement d'intensité relative appelée encore « Fold Change » ($\text{intensité essais-intensité témoin} / \text{intensité témoin}$) de valeur 1.

3.5.3 Analyse de l'Impact de la congélation sur la variabilité des échantillons d'EL et choix des seuils de significativité des biomarqueurs de l'altération

3.5.3.1 *Analyse de l'impact de la congélation sur la variabilité interne des échantillons d'EL*

Des prises d'empreintes métaboliques ont été également réalisées sur la fraction des échantillons qui ont été congelés à -20°C pendant 7 jours. Les résultats détaillés de l'analyse de variabilité sur les profils obtenus à partir d'extrait métaboliques des échantillons congelés est présenté dans l'Annexe F pour l'ensemble des fractions analysées : apolaire éthanol, apolaire acétone, polaire acétone et polaire éthanol.

3.5.3.2 *Choix du seuil de significativité associé à la modulation d'un métabolite pour les échantillons congelés*

La variabilité médiane d'un échantillon d'EL après congélation est estimée pour l'ensemble des fractions métaboliques explorables à 42%, avec un impact maximum constaté pour la fraction polaire acétone qui présente un CV moyen diminué de 48% après cette étape de congélation. Tout comme pour la mesure de variabilité interne réalisée sur les échantillons frais, la mesure de variabilité après congélation est primordiale, puisqu'elle permet d'adapter le seuil de significativité choisi pour les échantillons frais (variation de 100% entre une condition témoin et un échantillon altéré). Ainsi si la variabilité naturelle de la matrice EL après congélation est de 42%, en procédant comme précédemment, il est pertinent de sélectionner pour des analyses portant sur des échantillons indépendants des composés qui présentent une variabilité qui soit au moins de 90%. Ainsi dans les études qui suivent, si ces dernières portent sur des échantillons conservés à -20°C, des métabolites seront jugés comme significativement intéressants s'ils présentent une variabilité supérieure à 90% entre une condition témoin (matrice EL non altérée) et un essai (matrice EL altérée). Cela correspond cette fois à un « Fold Change » ($\text{((intensité essais-intensité témoin) / intensité témoin)}$) d'environ 0,9.

3.5.4 Conclusion – analyse de la variabilité interne et de l’impact de la congélation sur la prise d’empreinte métabolique

Le bilan des scores de corrélation et des coefficients de variation calculés pour l’ensemble des empreintes métaboliques enregistrées sur les fractions produites à partir d’échantillons d’EL frais et congelés est présenté dans le Tableau 48.

Tableau 48. Bilan des scores de corrélation de Spearman et des coefficients de variation calculés sur l’ensemble des fractions métaboliques générées pour des échantillons d’EL frais et congelés.

	Corrélations Spearman - Frais				Corrélations Spearman - Congelés			
	Apo Eth	Apo Ace	Pol Ace	Pol Eth	Apo Eth	Apo Ace	Pol Ace	Pol Eth
Moyenne	0,813	0,845	0,878	0,881	0,707	0,653	0,913	0,907
Mediane	0,821	0,843	0,888	0,868	0,697	0,624	0,899	0,914
Ecart type	0,092	0,055	0,047	0,058	0,127	0,139	0,037	0,032
CV	11,37	6,53	5,30	6,57	17,97	21,24	4,09	3,52
	Coefficients de variation - Frais				Coefficients de variation - Congelés			
	Apo Eth	Apo Ace	Pol Ace	Pol Eth	Apo Eth	Apo Ace	Pol Ace	Pol Eth
Moyenne (%)	53,47	55,35	75,34	54,09	69,21	59,52	33,37	45,65
Mediane (%)	43,13	43,94	70,41	42,90	58,75	48,64	24,13	38,00
Nb pseudo-composés	79	53	97	90	48	50	97	90

La variabilité interne des données issues des empreintes enregistrées sur EL frais a été quantifiée. Cette analyse a été réalisée sur cinq échantillons préparés simultanément mais séparément. La variabilité calculée inclut celle de l’ensemble des étapes de préparation et d’analyse en plus de la variabilité propre à la matrice EL. Des scores moyens de corrélation de Pearson entre 0,813 et 0,881 ont été calculés, indiquant une forte similitude entre les différents profils métaboliques des différents réplicas. Des coefficients de variation médians situés entre 42,90% et 70,41% ont été calculés et jugés acceptables au regard des variabilités habituellement mesurées en métabolomique, permettant ainsi de fixer un seuil de modulation des intensités associées à un biomarqueur potentiel à au moins 100% (2 fois la variabilité interne maximale, soit 1 en fold change minimal), validant également le protocole de prise d’empreinte. Ce seuil pourra être adapté en fonction de la variabilité mesurée pour chaque fraction métabolique.

Il est intéressant de noter que le nombre de composés détectés varie en fonction de la fraction étudiée, les fractions polaires étant généralement plus riches en composés (97 et 90 composés détectés) que les fractions apolaires. La fraction Apo Eth est également plus riche que la fraction Apo Ace (79 composés détectés contre 53), indiquant une influence non négligeable du solvant utilisé pour la déprotéination sur la chimiodiversité accessible.

La congélation des EL a impacté la qualité des empreintes métaboliques enregistrées sur les différentes fractions générées. Ainsi, pour les échantillons congelés, les scores de corrélation moyens des fractions apolaires sont inférieurs à ceux des mêmes échantillons frais (0,707 contre 0,813 pour la fraction Apo Eth, 0,653 contre 0,845 pour la fraction Apo Ace). Les scores des fractions polaires évoluent par contre de manière opposée (augmentation de 0,878 à 0,913 pour la fraction Pol Ace et de 0,881 à 0,907 pour la fraction Pol Eth). Une hypothèse expliquant cette observation consisterait à supposer que la congélation entraînant une modification de la structure des protéines et des composés lipidiques permettrait un meilleur accès à certains métabolites lors de l'étape de déprotéination. Les coefficients de variations médians évoluent logiquement de manière inverse par rapport aux scores de corrélation de Spearman. Avec une étape de congélation, les CV médians des fractions apolaires augmentent (de 43,13% à 58,75% pour la fraction Apo Eth et de 43,94% à 48,64% pour la fraction Apo Ace) et ceux des fractions polaires diminuent (de 70,41% à 24,13% pour la fraction Pol Ace et de 42,90% à 38% pour la fraction Pol Eth).

Comme pour les analyses sur échantillons frais, le nombre de composés détectés dans les échantillons après congélation varie en fonction de la fraction étudiée. Les fractions polaires sont toujours plus riches en composés (97 et 90 composés détectés, comme pour l'analyse d'échantillon frais) que les fractions apolaires qui semblent par ailleurs être beaucoup plus sensibles à l'effet de la congélation. La fraction Apo Eth est en effet celle dans laquelle le nombre de composés détectés est le plus impacté par la congélation (48 composés contre 79 pour les échantillons frais) avec une forte diminution des pseudo-composés détectables. La congélation étant censée préserver les composés les plus thermosensibles, il est peu probable qu'elle provoque une dégradation des pseudo-composés initialement détectés. Une hypothèse serait la perte de solubilité de certaines classes de pseudo-composés qui, après décongélation, ne pourraient plus se re-solubiliser. La fraction Apo Ace quant à elle, n'est que très faiblement impactée (50 composés au lieu de 53 dans les échantillons frais).

On notera donc que même si les scores de corrélation moyens et les CV médians observés ne sont que faiblement impactés par la congélation des échantillons avant analyse, cette étape est source de perte d'information pour certaines fractions et impacte de façon différente chacune des fractions étudiées. L'analyse d'échantillons d'EL congelés est donc possible mais la comparaison entre des analyses effectuées sur des échantillons frais et congelés devra être réalisée avec précaution.

3.6 Analyse de la complémentarité des fractions métaboliques

3.6.1 Complémentarité des fractions métaboliques obtenues pour des échantillons frais

L'étude de la variabilité interne de la matrice en aveugle a été complétée par une seconde analyse après annotation d'une partie des composés des différentes fractions. Les composés ont été comparés à la base de données en ligne GMD à l'aide de la plateforme W4M (3.4.3). Une liste de 37 métabolites a pu être annotée dans les différentes fractions des échantillons (polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone), cette liste est présentée dans le Tableau 49.

Tableau 49. Liste des métabolites annotés dans l'ensemble des fractions polaires et apolaires

Frais			
Pol_Eth	Pol_Ace	Apo_Eth	Apo_Ace
Composés identifiés dans plusieurs fractions			
Glucopyranose	Glucopyranose	Glucopyranose	Glucopyranose
Cholestérol	Cholestérol	Cholestérol	Cholestérol
Acide oléique	Acide oléique	Acide oléique	Acide oléique
Isoleucine	Isoleucine	Isoleucine	Isoleucine
Acide sébacique	Acide sébacique		
Acide linoléique	Acide linoléique		
Norvaline	Norvaline	Norvaline	
Norleucine	Norleucine	Norleucine	Norleucine
Acide phosphorique	Acide phosphorique	Acide phosphorique	Acide phosphorique
Phénylalanine	Phénylalanine		
Acide glutamique	Acide glutamique		
	Urée	Urée	Urée
		Tocophérol	Tocophérol
	Acide palmitélaïdique		Acide palmitélaïdique
Composés identifiés dans une seule fraction			
Mannose-1-acide phosphorique	Proline	Acide tetracosanoïque	Acide docosénoïque
Tetradecane-1,14-Acide dioïque	Hexadécan-1-ol	Acide palmitique	Valine
Acide glutarique	Mannose-1-acide phosphorique		Myo-inositol
Acide subérique	Tyrosine		Ergostérol
Acide myristique	Acide pyroglutamique		
Thrénine	Mannitol		
Acide galactonique	Méthionine		
Homosérine lactone			

La présence de ces métabolites dans chacune des fractions issues des protocoles de séparation a été explorée dans le but d'analyser la complémentarité des extraits en termes d'empreinte métabolique enregistrée. L'approche choisie jusqu'ici a consisté à conserver l'ensemble des fractions dans le but de conserver un maximum d'informations. Cette analyse permettra de valider ou non la pertinence de cette approche au vu de la lourdeur analytique induite par l'analyse des 4 fractions. Un récapitulatif du nombre de composés détectés dans chaque fraction est présenté dans le Tableau 50.

Tableau 50. Nombre de composés identifiés détectés dans chaque fraction en fonction des paramètres de déprotéination et de fractionnement métabolique

Pol_Eth	Pol_Ace	Apo_Eth	Apo_Ace
19	20	11	13

Sur les 32 métabolites identifiés dans l'ensemble de ces fractions, le meilleur taux de couverture correspond à la fraction polaire acétone avec la détection de 20 composés sur 37, suivie de la fraction polaire éthanol avec 19 composés. Le taux de couverture le plus faible correspond à la fraction apolaire éthanol avec seulement 11 des 37 composés détectés. La fraction apolaire acétone présente des performances proches de celle de la fraction apolaire éthanol avec 13 composés détectés. La complémentarité des fractions, exprimée en termes de composés détectés est illustrée sur la Figure 50.

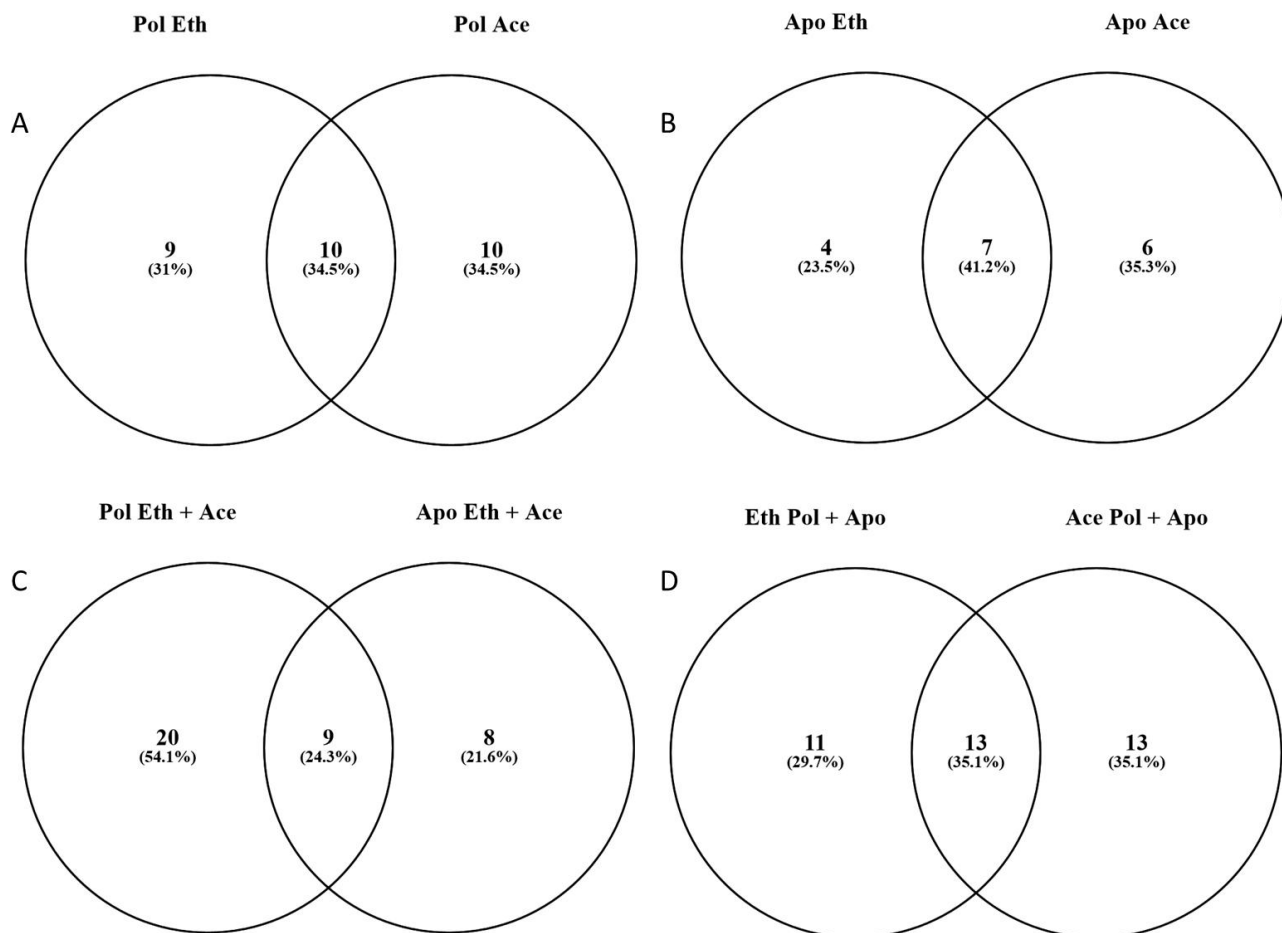


Figure 50. Diagrammes de Venn présentant la complémentarité des fractions étudiées en termes de composés détectés pour les échantillons frais. Entre les deux fractions polaires (A), entre les deux fractions apolaires (B), entre l'ensemble des fractions polaire et l'ensemble des fractions apolaires (C), et entre les fractions déprotéinées à l'éthanol et l'ensemble des fractions déprotéinées à l'acétone (D).

La complémentarité entre les fractions Polaire éthanol et Polaire acétone apparaît clairement (Figure 50 partie A). Sur les 29 composés détectés dans ces deux fractions, seuls 10 sont détectés à la fois dans les deux (34,5% des composés), 10 composés sont détectés uniquement dans la fraction polaire acétone (34,5% des composés) ; et 9 composés (31% des composés) uniquement dans la fraction polaire éthanol. La complémentarité des fractions apolaires apparaît tout aussi nettement (Figure 50 partie B). Sur les 17 composés détectés, 6 sont détectés uniquement dans la fraction apolaire acétone (soit 35,3% des composés), 7 sont détectés dans les deux (soit 41,2% des composés), et 4 ne sont détectés que dans la fraction apolaire éthanol (23,5% des composés). La complémentarité entre les fractions de polarité contrastée (polaire et apolaire) est clairement confirmée (Figure 50 partie C). En effet, seul 9 composés (24,3% du total des composés) sont présents à la fois dans les fractions polaires et apolaires, contre 20 composés (soit 54,1% du total des composés) uniquement présents dans les fractions polaires et 8 composés (soit 21,8% du total des composés) uniquement présents dans les fractions apolaires. Enfin la complémentarité entre les deux solvants de déprotéination employée est également clairement confirmée (Figure 50 partie D). Seul 13 composés (35,1% des composés

identifiés) sont détectables à la fois dans les fractions issues de ces deux modes de déprotéination contre 13 composés (35,1% des composés identifiés) uniquement détectés après une déprotéination à l'acétone et 11 composés (29,7% des composés identifiés) uniquement détectés après une déprotéination à l'éthanol. La complémentarité des quatre fractions en termes de composés détectés est globalement résumée sur la Figure 51.

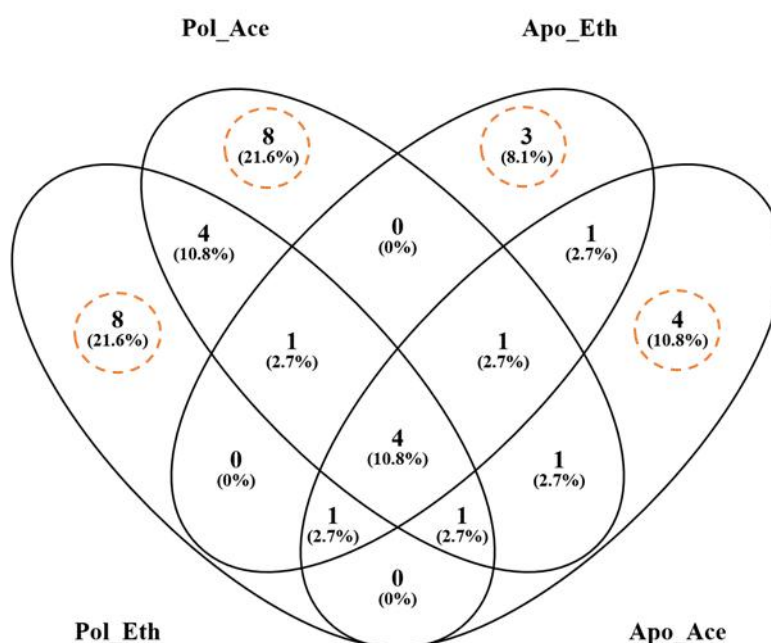


Figure 51. Diagramme de Venn à quatre groupes présentant la variabilité des fractions polaire éthanol (Pol Eth), polaire acétone (Pol Ace), apolaire éthanol (Apo Eth) et apolaire acétone (Apo Ace). Les valeurs correspondantes à des composés uniquement présents dans une fraction sont entourées de pointillés orange.

Les valeurs entourées de pointillés orange dans ce graphique correspondent aux composés identifiés uniquement détectés dans une seule des quatre fractions explorées. La liste de ces composés est présentée dans le Tableau 51.

Tableau 51. Liste des composés détectés uniquement dans l'une des quatre fractions explorées par fraction.

Pol Eth	Pol Ace	Apo Eth	Apo Ace
Tetradecane-1,14-Acide dioïque	Proline	Acide oléique	Acide docosénoïque
Acide glutarique	Hexadecan-1-ol	Acide tetracosanoïque	Valine
Acide Linoléique	Acide Linoléique	Acide palmitique	Myo-inositol
Acide subérique	Acide phosphorique		Ergostérol
Acide tétradécanoïque	Tyrosine		
Thréonine	Acide pyroglutamique		
Acide galactonique	Mannitol		
Homosérine lactone	Méthionine		

La détection de certains composés potentiellement intéressants dans une seule des fractions étudiées confirme clairement l'intérêt de conserver l'ensemble de ces fractions dans le cadre de l'étude de l'altération des EL. En effet, afin de maximiser les chances de découvertes de marqueurs précoces de cette altération, il est important de caractériser les échantillons de la manière la plus exhaustive possible. L'analyse de ces diagrammes de Venn nous permet donc de confirmer la complémentarité entre les fractions étudiées et la pertinence du mode de préparation multiple des échantillons. L'utilisation de deux solvants de déprotéination de polarité contrastée permet en effet de maximiser l'exhaustivité de l'analyse en permettant la récupération et l'étude d'un nombre plus important de composés. La séparation des échantillons en deux extraits métaboliques polaires et apolaires permet en plus de séparer efficacement ces composés pour les étapes d'analyses ultérieures.

3.6.2 Complémentarité des fractions métaboliques obtenues pour les échantillons après 7 jours de congélation à -20 °C

La même démarche a été effectuée sur les échantillons après congélation dans le but d'évaluer l'impact de la congélation sur les composés identifiés dans chacune des fractions métaboliques étudiées. Une liste de 40 métabolites a pu être annotée dans les différentes fractions des échantillons congelés (polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone), cette liste est présentée dans le Tableau 52.

Tableau 52. Liste des métabolites annotés dans l'ensemble des fractions polaires et apolaires des échantillons congelés

Pol_Eth	Pol_Ace	Apo_Eth	Apo_Ace
Composés identifiés dans plusieurs fractions			
Glucopyranose	Glucopyranose	Glucopyranose	Glucopyranose
Cholestérol	Cholestérol	Cholestérol	Cholestérol
Acide oléique	Acide oléique	Acide oléique	Acide oléique
Isoleucine		Isoleucine	Isoleucine
Acide glutarique		Acide glutarique	
Norvaline	Norvaline	Norvaline	
Norleucine	Norleucine	Norleucine	Norleucine
Acide linoléique	Acide linoléique		
Proline	Proline	Proline	
Acide phosphorique	Acide phosphorique	Acide phosphorique	Acide phosphorique
Phénylalanine	Phénylalanine		
Acide aspartique	Acide aspartique		
Tyrosine	Tyrosine		
Méthionine	Méthionine		
Myo-inositol	Myo-inositol		Myo-inositol
Acide pyroglutamique	Acide pyroglutamique		
Composés identifiés dans une seule fraction			
Acide galactonique	Urée	Acide docosénoïque	Acide docosénoïque
Acide subérique	Acide nonanoïque	Acide palmitique	Acide ribonique
Glycérol	Acide laurique	Acide tétracosanoïque	Acide triacontanoïque
Acide tétradécanoïque	Homosérine lactone	Tocophérol	Acide palmitélaïdique
Acide tétracosénoïque	Tryptophane		Acide lithocholique
Ethanolamine	Mannitol		
Thrénine	Proline		
Urée	Rhamnose		
	Glutamine		
	Sérine		

Comme pour les échantillons frais, la présence de ces métabolites dans chacune des fractions métaboliques issues des protocoles de séparation a été explorée. Un récapitulatif du nombre de composés de cette liste, détectés dans chaque fraction est présenté dans le Tableau 53.

Tableau 53. Nombre de composés identifiés détectés dans chaque fraction en fonction des paramètres de déprotéination et de fractionnement métabolique

Pol_Eth	Pol_Ace	Apo_Eth	Apo_Ace
24	24	13	12

Sur les 40 métabolites identifiés dans l'ensemble de ces fractions, le meilleur taux de couverture correspond, comme pour les échantillons frais, à la fraction polaire acétone avec la détection de 24 composés sur 40, cette fois à égalité avec la fraction polaire éthanol. Le taux de couverture le plus faible correspond à la fraction apolaire éthanol avec seulement 12 des 40 composés détectés. La fraction apolaire acétone présente, comme pour les échantillons frais, des performances proches de celles de la fraction apolaire éthanol avec 13 composés détectés. La complémentarité des fractions en termes de composés détectés est illustrée sur la Figure 52.

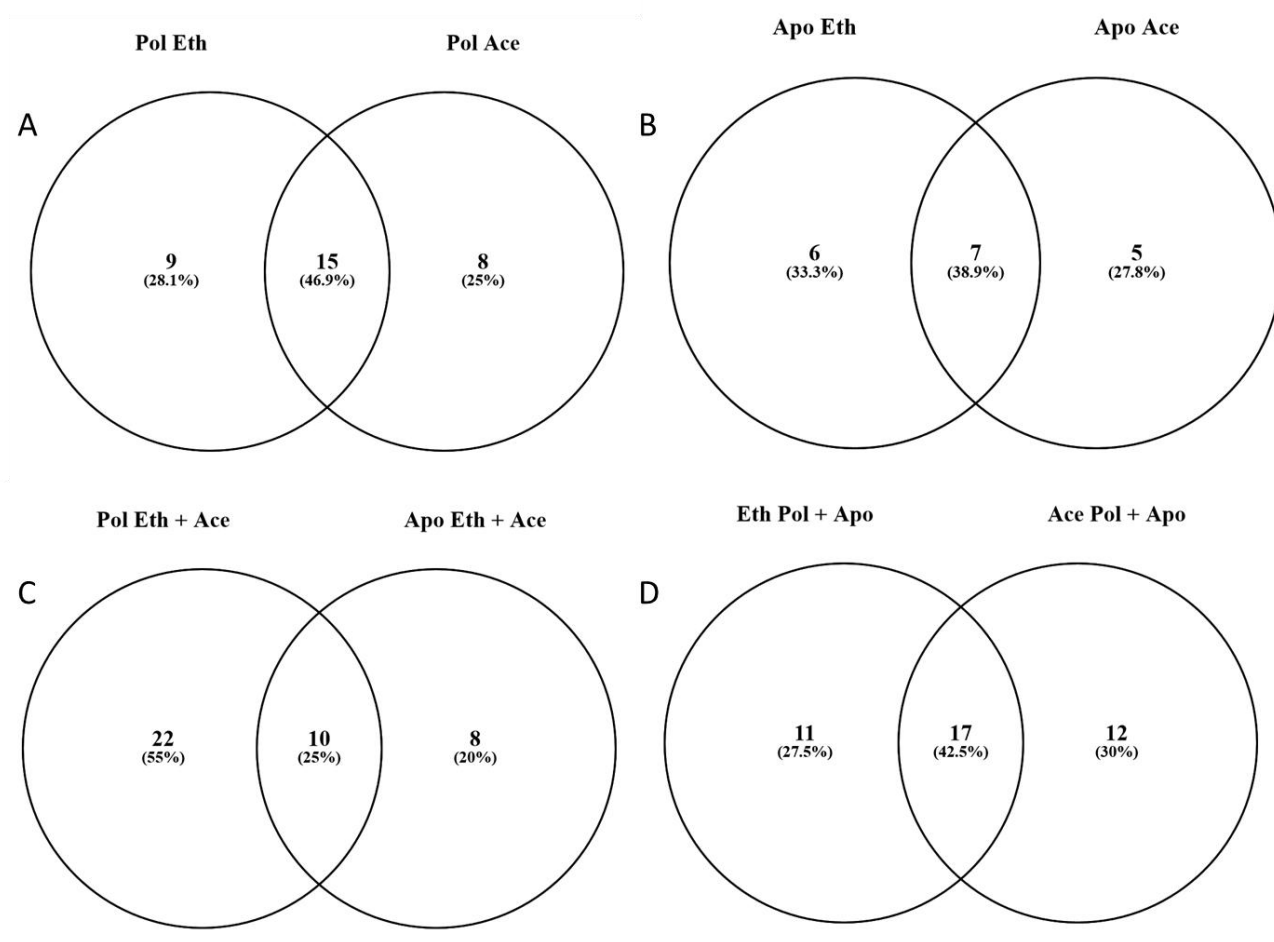


Figure 52. Diagrammes de Venn présentant la complémentarité des fractions étudiées en termes de composés détectés pour les échantillons congelés. Entre les deux fractions polaires (A), entre les deux fractions apolaires (B), entre l'ensemble des fractions polaire et l'ensemble des fractions apolaires (C), et entre les fractions déprotéinées à l'éthanol et l'ensemble des fractions déprotéinées à l'acétone (D).

Les observations quant à la complémentarité des fractions analysées sont proches de celles effectuées sur les échantillons frais. La complémentarité entre les fractions polaire éthanol et polaire acétone apparaît clairement (Figure 52 partie A). Sur les 32 composés détectés dans ces deux fractions, 15 sont détectées à la fois dans les deux (46,9% des composés), contre 10 pour les

échantillons frais ; 8 sont présents uniquement dans la fraction polaire acétone (25% des composés), contre 10 pour les échantillons frais et 9 composés (28,1% des composés) uniquement dans la fraction polaire éthanol, comme pour les échantillons frais. La complémentarité des fractions apolaires apparaît tout aussi clairement (Figure 52 partie B). Sur les 18 composés détectés, 5 sont détectés uniquement dans la fraction apolaire acétone (soit 27,8% des composés) contre 6 pour les échantillons frais, 7 sont détectés dans les deux (soit 38,9% des composés) comme pour les échantillons frais, et 6 ne sont détectés que dans la fraction apolaire éthanol (33,3% des composés), contre 4 pour les échantillons frais. La complémentarité entre les fractions de polarité contrastée (polaire et apolaire) est clairement confirmée (Figure 52 partie C). En effet, seuls 10 composés (25% du total des composés) sont présents à la fois dans les fractions polaires et apolaires contre 9 pour les échantillons frais. 22 composés (soit 55% du total des composés) sont uniquement détectés dans les fractions polaires, contre 20 pour les échantillons frais et 8 composés (soit 20% du total des composés) uniquement présents dans les fractions apolaires, comme pour les échantillons frais. Enfin la complémentarité entre les deux solvants de déprotéination employés est également clairement confirmée (Figure 52 partie D). 17 composés (42,5% des composés identifiés) sont détectables à la fois dans les fractions issues de ces deux modes de déprotéination, contre 13 dans les échantillons frais. 12 composés (3% des composés identifiés) sont uniquement détectés après une déprotéination à l'acétone, contre 13 pour les échantillons frais et 11 (27,5% des composés identifiés) uniquement détectés après une déprotéination à l'éthanol, comme pour les échantillons frais. La complémentarité des quatre fractions en termes de composés détectés est présentée dans un diagramme de Venn à quatre groupes dans la Figure 53.

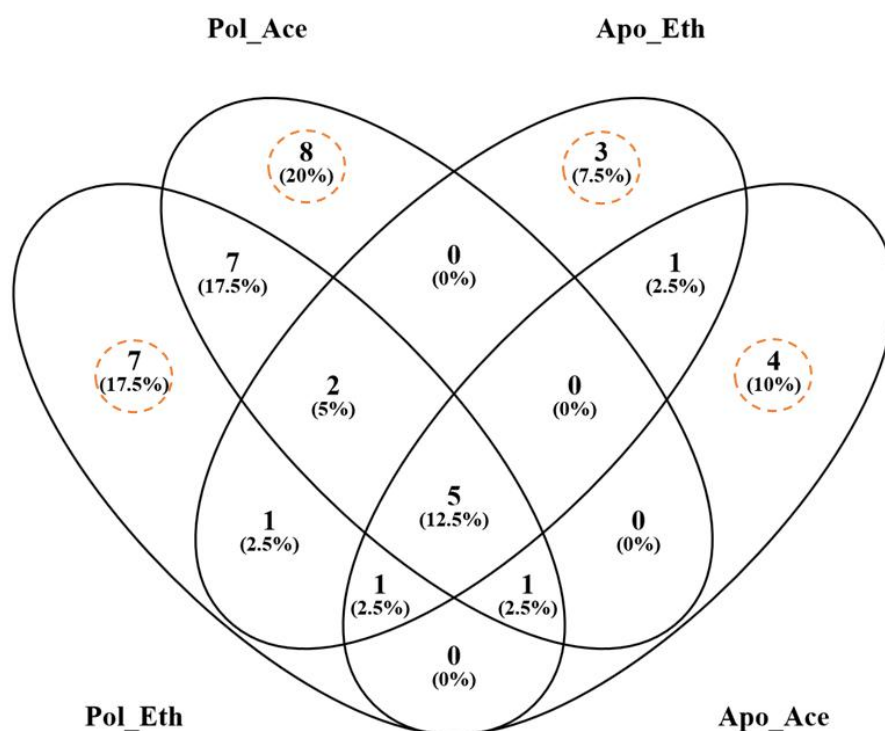


Figure 53. Diagramme de Venn à quatre groupes présentant la variabilité des fractions polaire éthanol (Pol Eth), polaire acétone (Pol Ace), apolaire éthanol (Apo Eth) et apolaire acétone (Apo Ace). Les valeurs correspondant à des composés uniquement présents dans une fraction sont entourées de pointillés orange.

Les valeurs entourées de pointillés orange dans ce graphique correspondent aux composés identifiés uniquement détectés dans une seule des quatre fractions explorées. La liste de ces composés est présentée dans le Tableau 54.

Tableau 54. Liste des composés détectés uniquement dans l'une des quatre fractions explorés par fraction.

Pol Eth	Pol Ace	Apo Eth	Apo Ace
Acide galactonique	Acide nonanoïque	Acide palmitique	Acide ribonique
Acide subérique	Acide laurique	Acide tetracosanoïque	Acide triacontanoïque
Glycérol	Homosérine lactone	Tocophérol	Acide palmitélaïdique
Acide tétradécanoïque	Tryptophane		Acide lithocholique
Acide tetracosénoïque	Mannitol		
Ethanolamine	Rhamnose		
Thrénine	Glutamine		
	Sérine		

Comme pour l'analyse d'échantillons frais, la détection de certains composés potentiellement intéressants dans une seule des fractions étudiées confirme clairement l'intérêt de conserver l'ensemble de ces fractions dans le cadre de l'étude de l'altération des EL. Cependant, il apparaît clairement sur cette liste des métabolites identifiés uniquement dans l'une des fractions étudiées, tout comme dans le Tableau 52, que les composés détectés dans chacune des fractions ne sont que partiellement identiques à ceux identifiés dans les mêmes fractions pour les échantillons frais. La congélation présente donc bien un impact qualitatif sur les composés détectés dans les fractions étudiées. Une discussion plus approfondie sur l'impact de la congélation sur les composés identifiés dans chaque fraction est réalisée dans la partie suivante.

3.6.3 Impact de la congélation sur les composés détectés dans chacune des fractions métaboliques

La partie 3.5.3 a présenté les résultats en aveugle (sans identification) de l'analyse de l'impact de la congélation sur la qualité des profils métaboliques obtenus et nous a permis de conclure que, bien qu'inégal pour chaque fraction étudiée, la congélation n'avait qu'un impact relatif sur la qualité des profils métaboliques enregistrés. La congélation permettrait même d'abaisser le seuil de significativité de la modulation d'un composé d'intérêt de 1 à 0,9 dans le cadre de l'étude de l'altération. L'étude de la variabilité après annotation a cependant mis en évidence des différences de détection ou d'identification des composés dans chaque fraction pour les échantillons frais et congelés. Ces différences sont explorées dans ce paragraphe.

Le nombre de composés détectés est proche, pour les analyses correspondant aux échantillons frais et congelés, pour les fractions polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone. Le nombre de composés était respectivement de 19, 19, 11 et 13 pour les échantillons frais et de 24, 24, 13 et 12 pour les échantillons congelés. Ces valeurs montrent déjà qu'un plus grand nombre de composés ont pu être identifiés dans les échantillons congelés que dans les échantillons frais.

Les différences de composés identifiés dans les échantillons frais et congelés pour chacune des fractions étudiées sont illustrées sur la Figure 54. Les signaux correspondant à la glutamine, l'acide glutamique et l'acide pyroglutamique ont été regroupés en raison de la complexité pour les différencier lors d'une analyse par GC-MS.

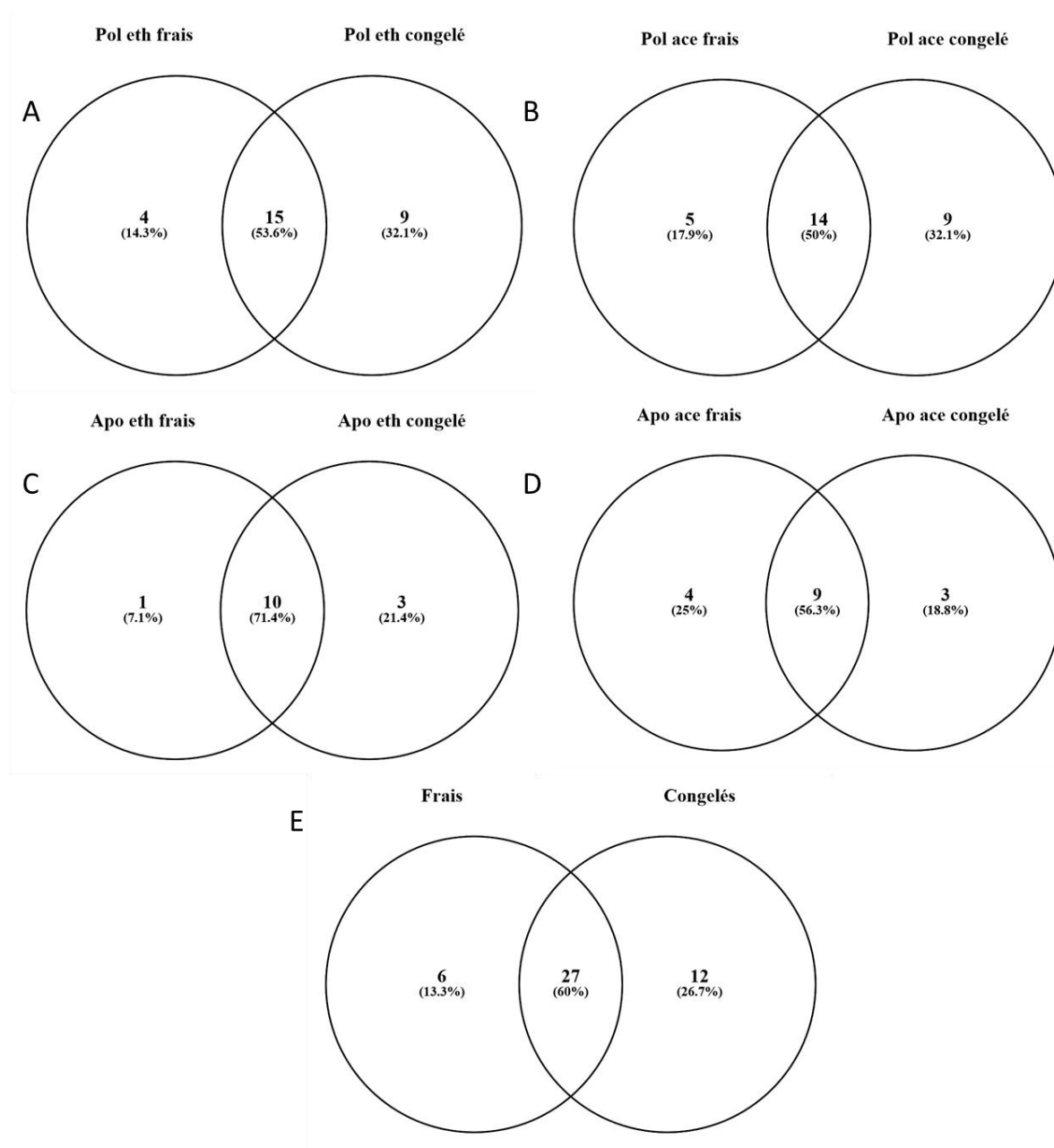


Figure 54. Diagrammes de Venn présentant la différence entre les échantillons frais et congelés en termes de composés détectés pour chacune des fractions explorées, polaire éthanol (A) polaire acétone (B), apolaire éthanol (C), apolaire acétone (D) et pour l'ensemble des fractions (E).

L'analyse de ces diagrammes permet de mettre en évidence que pour l'ensemble des fractions métaboliques analysées, 27 composés (60% du total des composés détectés) sont présents à la fois dans les échantillons frais et les échantillons congelés. Pour la fraction polaire éthanol, 15 composés sont détectés à la fois dans les échantillons frais et congelés (53,6% des composés) contre 4 composés détectés uniquement dans les échantillons frais et 9 composés détectés uniquement dans les échantillons congelés. Pour la fraction polaire acétone, 14 composés (50% des composés) sont détectés à la fois dans les échantillons frais et congelés contre 5 uniquement dans les échantillons frais et 9 uniquement dans les échantillons congelés. Pour la fraction apolaire éthanol, 10 composés (71,4%

des composés) sont détectés à la fois dans les échantillons frais et congelés contre 1 composé uniquement détecté dans les échantillons frais et 3 composés uniquement dans les échantillons congelés. Enfin pour la fraction apolaire acétone, 9 composés (56,3% des composés) sont détectés à la fois dans les échantillons frais et congelés contre 4 uniquement dans les échantillons frais et 3 uniquement dans les échantillons congelés.

L'analyse des index de rétention de chacun des composés a permis d'exclure l'hypothèse d'une simple erreur d'identification lors de l'étape de comparaison des spectres de masse pour la plupart des composés. En effet, l'analyse ayant été réalisée sur le même système chromatographique, les index de rétention de deux composés identiques devraient être similaires ou très proches lors des analyses des échantillons frais et congelés. La liste des composés détectés pour l'ensemble des fractions issues des échantillons frais, congelés et dans les deux à la fois est présentée dans le Tableau 55.

Tableau 55. Liste des composés identifiés pour l'ensemble des fractions analysées dans les échantillons frais, congelés et dans les deux à la fois.

Composés détectés uniquement dans les échantillons frais	Composés détectés dans les échantillons frais et les échantillons congelés	Composés détectés uniquement dans les échantillons congelés
Mannose-1-acide phosphorique	Glucose	Glycérol
Acide tétradécanedioïque	Cholestérol	Acide tétracosanoïque
Acide sébacique	Acide oléique	Ethanolamine
Hexadécane-1-ol	Isoleucine	Acide aspartique
Valine	Acide glutarique	Acide nonanoïque
Ergostérol	Acide linoléique	Acide dodécanoïque
	Norvaline	Tryptophane
	Acide subérique	Rhamnose
	Acide tétradécanoïque	Sérine
	Norleucine	Acide ribonique
	Acide phosphorique	Acide triacontanoïque
	Thréonine	Acide lithocholique
	Acide galactonique	
	Homosérine lactone	
	Phénylalanine	
	Acide glutamique / glutamine / acide pyroglutamique	
	Acide palmitélaïdique	
	Proline	
	Urée	
	Tyrosine	
	Mannitol	
	Méthionine	
	Acide tétracosanoïque	
	Acide palmitique	
	Tocophérol	
	Acide docosanoïque	
	Myo-inositol	

Ces résultats mettent en évidence une bonne corrélation des profils métaboliques enregistrés sur les échantillons frais et congelés en termes de composés identifiés. Une proportion non négligeable de composés n'a pu cependant être identifiée que dans les analyses correspondant aux échantillons frais (13% du nombre total de composés) ou aux échantillons congelés (26% du nombre total de composés). Une hypothèse permettant d'expliquer la différence entre ces profils est que l'étape de congélation affecte la récupération des composés (lors de l'étape de déprotéination). L'impact de la durée d'incubation à -20°C a été explorée pour de courtes périodes (30 min à 4 h) au cours de l'étude combinée de la déprotéination et de la séparation en fraction métaboliques (-). Cette étude n'a pas mis en évidence d'effet positif de l'augmentation de la durée d'incubation à -20°C. Cependant, lors de la congélation de l'échantillon avant déprotéination (et donc en milieu principalement aqueux), l'échantillon subit une congélation qui n'a pas lieu lors de la déprotéination en raison de la température de fusion plus faible des solvants employés. Il est possible que cette étape de congélation entraîne une dénaturation des protéines et une modification de la structure lipidique des échantillons d'EL qui favorise de façon sélective la récupération des métabolites lors de l'étape de déprotéination. Cela mènerait à l'obtention de profils métaboliques partiellement différents sur les mêmes échantillons frais ou après une durée de conservation de 7 jours à -20 °C. Il est également possible que certains signaux aient été présents à la fois dans les deux analyses mais n'aient pas pu être annotés avec un niveau de confiance suffisant dans l'une d'elle.

La majorité des composés sont identifiés dans les échantillons des deux conditions (frais et congelés), cependant, l'analyse de l'impact de la congélation après annotation permet de confirmer que cette étape induit un impact sur les signatures chimiques obtenues. La comparaison de résultats d'analyses effectuées sur des échantillons frais et congelés devra donc être réalisée avec précaution.

4 Conclusion du chapitre

Les résultats des différents développements méthodologiques menés dans le cadre de ces travaux de thèse ont été présentés dans ce chapitre. Ces développements chronophages ont été rendus obligatoires, en partie en raison de l'absence d'étude de type métabolomique portant sur l'altération des ovoproduits dans la littérature. La variabilité des techniques de suivi macroscopiques (pH, colorimétrie) de l'altération des EL employés a été évaluée et validée. Les différentes méthodes de préparation des échantillons (déprotéination, séparation en fractions de polarités contrastées, séchage, dérivation) et d'analyse (injection, séparation, analyse, traitement des données, annotation) ont été optimisées afin de limiter la variabilité des mesures. La pertinence de l'utilisation de deux solvants de déprotéination et de la séparation des phases avant analyse a été confirmée et les seuils de significativité associés à la modulation des métabolites mesurée pour l'ensemble des fractions, y compris après une étape de congélation de 7 jours à -20°C . La variabilité moyenne globale du protocole de profilage a été estimée à environ 40%, confirmant la robustesse du protocole mis en place. Un protocole de traitement semi-automatique des données basé sur l'utilisation d'outils dédiés aux analyses métabolomiques et de scripts Python développés à façon, a également été mis en place afin de simplifier la réalisation des étapes d'analyse et d'annotation des jeux de données à traiter dans le cadre de ces travaux.

Le développement de ce protocole d'échantillonnage et de génération des signatures physico-chimiques des échantillons qui seront exploités pour la caractérisation chimique fine de l'altération des EL, correspond au livrable du sous-projet 1 du projet ALTOVOP pour le laboratoire GEPEA. Les différents partenaires du projet ont également travaillé en parallèle sur les sous projets 2 et 3, correspondant à la caractérisation microbiologique, enzymatique, physico-chimique et fonctionnelle de l'altération et à la définition des protocoles d'ensemencements représentatifs de l'altération industrielle. La validation de nos développements méthodologiques a donc permis de démarrer le sous-projet 4 d'ALTOVOP.

Le sous-projet 4 se focalise sur la caractérisation physico-chimique, rhéologique, fonctionnelle et analytique de l'altération. Ses livrables concernent l'étude cinétique de l'altération par des approches physico-chimiques, la découverte des premiers jeux de biomarqueurs et des voies métaboliques impliquées dans l'altération des entiers liquides. Toutes ces informations permettront d'apporter des éléments de réponses à la question scientifique posée dans le cadre de ces travaux.

Le chapitre suivant présente les résultats des analyses multi-échelles réalisées sur les échantillons industriels et les échantillons modèles reproduits en laboratoire pour l'étude cinétique de l'altération. Les composés les plus pertinents pour la détection de l'altération sont identifiés et si

possible quantifiés. Leur pertinence, leurs mécanismes d'action, s'ils sont connus (voies métaboliques impliquées par exemple) et leur corrélation avec les indicateurs de suivi macroscopique de l'altération seront également discutés.

Chapitre 4 – Investigation des mécanismes physico-chimiques impliqués dans l'altération microbiologique des EL

1 Introduction

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats des investigations menées avec les outils développés au chapitre précédent. Seront notamment exploitées les informations issues des mesures obtenues avec les prises d'empreintes physico-chimiques réalisées sur des échantillons d'EL industriels contrastés, ainsi que sur des échantillons d'EL modèles. Ces derniers seront préparés stérilement en laboratoire et ensemencés avec des espèces identifiées, caractéristiques des deux types d'altération en milieu industriel.

La première partie de ce chapitre présentera les résultats des analyses macroscopiques (pH, colorimétrie, propriétés fonctionnelles) et des profilages métaboliques (GC-MS, RMN ^1H) effectués sur des échantillons industriels contrastés. Seront traités des échantillons sains, des échantillons ayant subi une altération de type 1 et une altération de type 2. Ces analyses permettront d'une part, d'asseoir la robustesse des outils mis en place sur des échantillons industriels et d'autre part d'ouvrir des premières pistes d'identification des bio-marqueurs associés. La s partie de ce chapitre se focalisera quant à elle sur les résultats des investigations menées sur les altérations de type 1 et 2 sur des EL modèles. Ces altérations étant les plus marquées, elles seront traitées en premier lieu. Seront présentés les résultats des analyses macroscopiques (pH, colorimétrie, propriétés fonctionnelles) et des profilages chimiques (GC-MS, mais sans la RMN ^1H) effectués sur des échantillons d'EL stériles ensemencés avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*, sélectionnée comme représentative de l'altération de type 2. La troisième partie présentera les résultats des analyses macroscopiques et du profilage métabolique (GC-MS, RMN ^1H) réalisées sur des échantillons d'EL stériles ensemencés avec la souche *Enterococcus faecium*, sélectionnée comme représentative de l'altération de type 1. Les investigations cinétiques réalisées sur les altérations microbiologiques (type 1 et 2) de ces EL modèles, permettront de caractériser plus finement l'évolution temporelle des différents indicateurs macroscopiques, ainsi que les modulations des abondances relatives ou absolues des composés identifiés dans les empreintes métaboliques. Finalement, à l'issue de ce chapitre, seront mis en

évidence des composés marqueurs des deux types d'altération et parmi ceux-ci des molécules modulées bien avant les indicateurs physico-chimiques classiques (livrable du sous projet 4 pour le laboratoire GEPEA). Ces marqueurs précoces devraient permettre de détecter le plus tôt possible le phénomène d'altération des EL et donc être potentiellement employés comme indicateurs de prédiction du phénomène. C'est essentiellement par l'utilisation de techniques de profilage complémentaires (GC-MS, RMN ^1H) que l'on pourra élargir le spectre des composés détectables et confirmer certaines identifications et tendances d'évolutions.

La comparaison entre les résultats obtenus sur les échantillons industriels et ceux préparés en laboratoire fera ensuite l'objet d'une discussion intégrative qui permettra notamment de vérifier la pertinence des marqueurs identifiés dans un contexte industriel. Une analyse croisée corrélant la modulation de ces marqueurs et les informations de suivi macroscopique, ainsi qu'une discussion sur l'origine et les voies métaboliques potentiellement associés aux molécules identifiés, seront également présentées (livrable du sous projet 5 pour le laboratoire GEPEA).

2 Analyse des échantillons industriels

L'objectif de cette étude est de vérifier directement sur matrices industrielles la capacité discriminante de la méthodologie d'obtention des signatures physico-chimiques mise au point dans le cadre de ces travaux de doctorat. La comparaison des résultats obtenus lors de l'étude de ces échantillons et lors des études cinétiques des altérations réalisées en laboratoire permettra également de vérifier la cohérence des informations obtenues avec la réalité industrielle (marqueurs en commun identifiés, tendances d'évolution similaires pour les indicateurs mesurés entre les échantillons industriels et ceux altérés en laboratoire).

2.1 Protocole d'étude des échantillons industriels

Les échantillons ont été collectés auprès des industriels partenaires du projet. Trois échantillons représentatifs de trois conditions distinctes ont été sélectionnés pour l'analyse chimique par le laboratoire GEPEA. Les échantillons étaient classés dans trois catégories, les échantillons sains et ceux représentatifs des deux types d'altérations rencontrées le plus fréquemment en milieu industriel. L'altération de type 1 correspond à une acidification et à une liquéfaction des produits et celle de type 2 à un blanchiment et à une prise en masse de ces derniers. Un échantillon sain (témoin), un échantillon altéré représentatif du type 1 (type 1) et un échantillon altéré représentatif du type 2 (type 2) ont ainsi été étudiés. Pour le profilage métabolique et la prise d'empreinte par GC-MS, seules les fractions polaire éthanol et apolaire acétone ont été analysées.

2.2 Phénotype physico-chimique des EL industriels

2.2.1 Résultats des analyses réalisées par le consortium ALTOVOP

Cette partie présente les observations générales et les résultats des différentes analyses réalisées par les membres du consortium du projet ALTOVOP sur ces échantillons industriels.

2.2.1.1 Observations générales

L'échantillon sain (témoin) n'a pas fait l'objet d'observations spécifiques. L'échantillon altéré de type 1 (type 1) n'est pas gonflé, de couleur jaune orange, liquide et a tendance à sédimenter. 6 souches distinctes ont été détectées dans cet échantillon, dont 100% de souches altérantes (c'est à dire ayant la capacité d'altérer un EL). L'échantillon altéré de type 2 (type 2) est gonflé, liquide en début d'altération et présente une couleur jaune blanchissant à partir du cinquième jour de stockage. 6 souches ont été détectées dans cet échantillon, dont 2 souches altérantes.

2.2.1.2 pH et colorimétrie

La

Figure 55 présente les résultats des mesures de pH effectuées par la société ADRIA (partenaire qui centralisait les échantillons industriels avant redistribution aux différentes équipes) et par le laboratoire GEPEA où ont été réalisées les mesures de profilage et de prise d'empreintes métaboliques. Ces mesures ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment (voir chapitre 2 - Mesure du pH) sur deux répliquats.

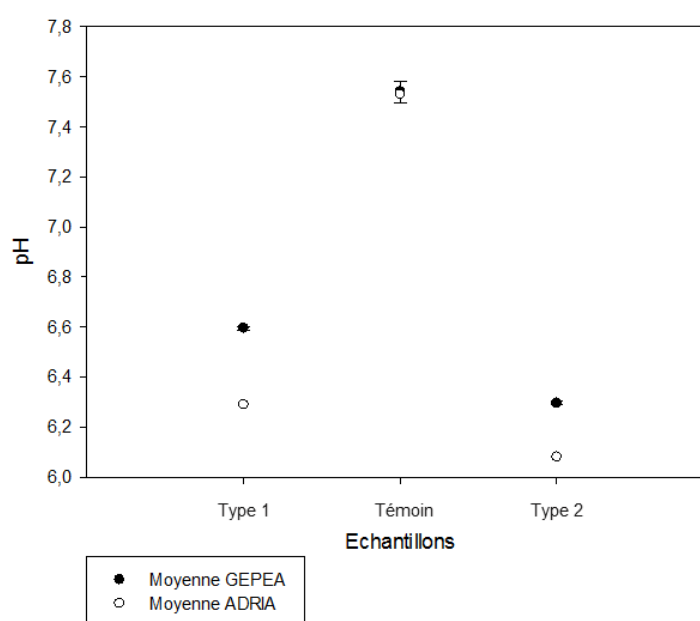


Figure 55. Mesures de pH effectuées sur les échantillons industriels contrastés (témoin, type 1 et type 2). Les mesures ont été effectuées sur deux répliques prélevés séparément dans le pot d'origine après homogénéisation.

Ces mesures n'ayant été réalisées que sur deux répliques, une analyse de la distribution des résultats n'est pas pertinente. L'inter-calibration suggère cependant que les résultats de mesure du pH sont similaires pour l'échantillon sain (témoin) et qu'une variation d'environ 0,3 unités pour l'échantillon type 1 et de 0,2 unités pour l'échantillon type 2 peuvent être détectés entre les mesures réalisées par la société ADRIA et celles réalisées au laboratoire GEPEA. Cette différence peut être potentiellement expliquée par l'étape de congélation-décongélation nécessaire au transport des échantillons. En effet, l'étude de l'impact de la congélation sur les résultats de mesure du pH réalisée dans le cadre des développements méthodologiques a permis de conclure qu'une congélation de 7 jours à -20°C entraînait une augmentation de la variabilité associée à cette mesure (coefficients de variation de 0,23% au lieu de 0,092%). Il est possible que les étapes de congélation-décongélation de ces échantillons (plus lente en raison des volumes plus importants) aient eu un impact plus important sur ces derniers. Il est aussi possible qu'une différence de performances des appareils de mesure ou de leur protocole de calibration (tampons pH, température de mesure, etc...) soit à l'origine de ce décalage. Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus sont proches de ceux proposés par la société ADRIA et permettent de confirmer la bonne conservation des échantillons et la pertinence de leur analyse.

Malgré des différences d'inter-calibration, une altération de l'EL provoque clairement une diminution significative d'une unité de pH, que ce soit pour le type 1 ou le type 2. Une acidification légèrement plus importante serait observée pour le type 2.

Les résultats des analyses de colorimétrie sont présentés dans l'Annexe H de ce manuscrit.

2.2.1.3 *Propriétés fonctionnelles*

Cette partie présente les résultats des analyses des propriétés fonctionnelles réalisées par la société ADRIA sur les échantillons contrastés. La Figure 56 présente les résultats des analyses de la capacité gélifiante. Les propriétés mesurées sont ici la pente maximum du gel avant rupture, la distance maximum d'étirement avant rupture, et la force appliquée à la rupture du gel.

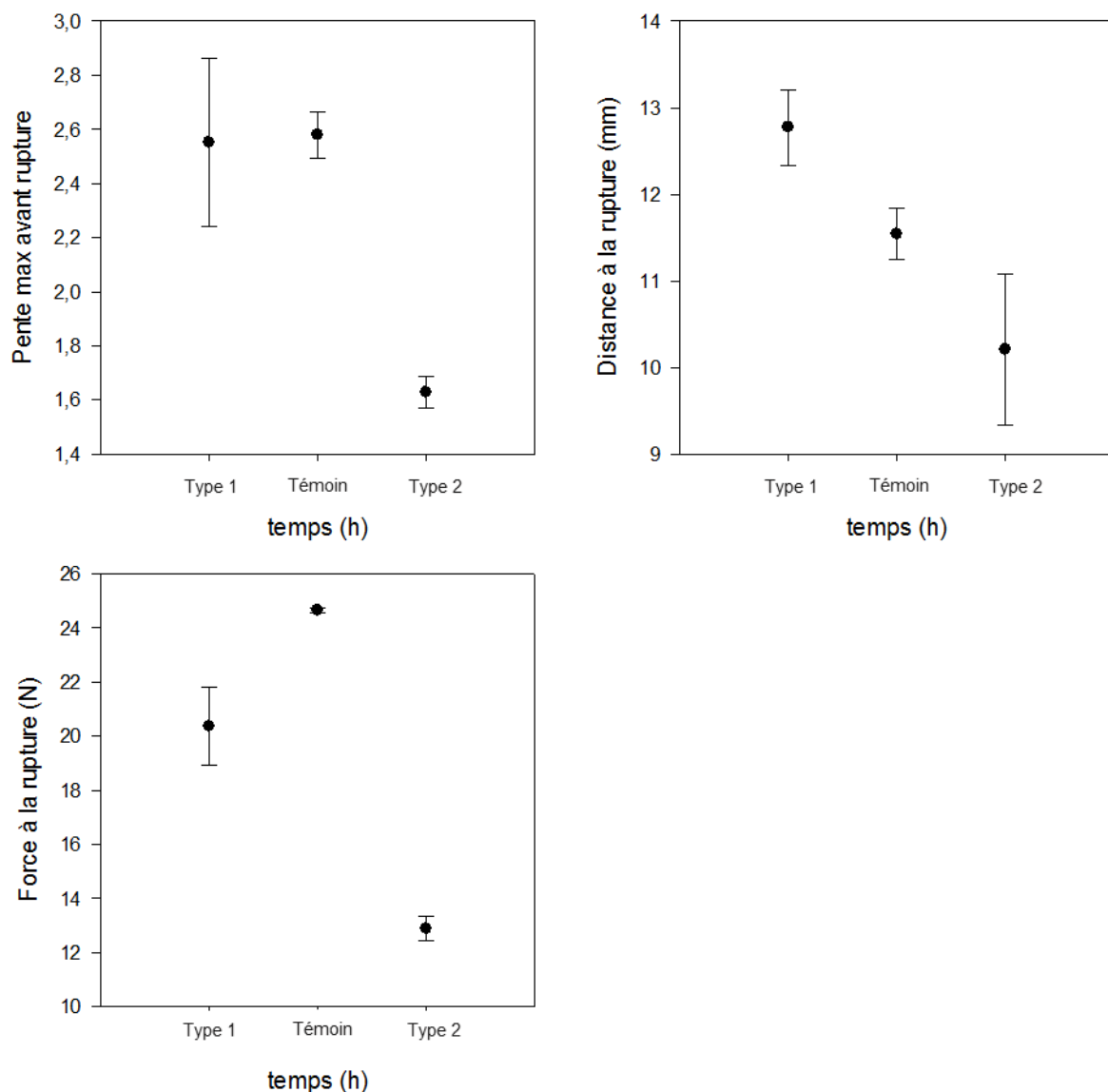


Figure 56. Résultats des analyses de la capacité gélifiante pour les échantillons type 1, témoin et type 2.

L'échantillon altéré de type 2 présente très clairement une perte de capacité gélifiante avec une pente maximum avant rupture de 1,62 % contre environ 2,55 % pour l'échantillon sain, une distance à la rupture de 10,20 mm contre 11,54 mm pour l'échantillon sain et une force à la rupture de 12,88 N contre 24,65 N pour l'échantillon sain. L'indicateur le plus impacté étant la force à la rupture (diminué de moitié), cela suggère qu'on observe bien une faible résistance du gel formé et donc une baisse des capacités gélifiantes induite par l'altération de type 2. L'échantillon altéré type 1 présente des capacités gélifiantes également dégradées. La pente maximum avant rupture est proche de celle de l'échantillon sain (2,55 % contre 2,58 %), la distance à la rupture est augmentée de 12,77 mm contre 11,54 mm pour l'échantillon sain et la force à la rupture diminue de 24,65 N pour l'échantillon sain à 20,34 N. L'altération de type 1 entraîne également une dégradation des propriétés gélifiantes menant à un gel plus étirable et moins résistant.

La Figure 57 présente les résultats des analyses de propriétés émulsifiantes sur les mêmes échantillons.

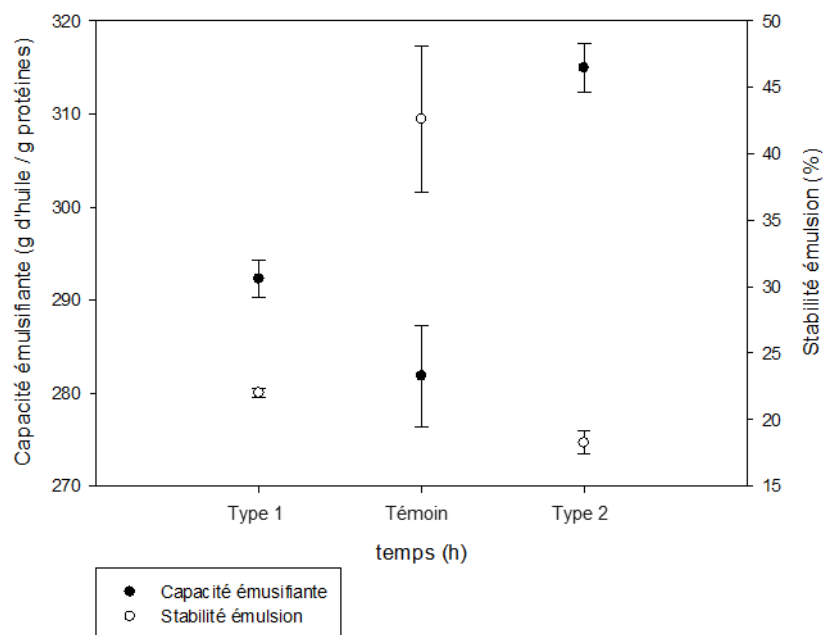


Figure 57. Résultats des analyses de la capacité émulsifiante pour les échantillons témoin, type 1 et type 2.

On peut constater ici que l'altération engendre une augmentation de la capacité émulsifiante de l'ordre de 10 g d'huile par g de protéines pour le type 1, 30 pour le type 2, mais qu'elle induit également une diminution de la stabilité de l'émulsion (22% et 18% pour les types 1 et 2 contre 42% pour le témoin sain). L'altération entraîne donc une augmentation de la capacité émulsifiante au détriment de la stabilité des émulsions obtenues. On peut également noter que l'effet est plus marqué pour l'altération de type 2.

La Figure 58 présente les résultats des analyses de propriétés moussantes sur ces mêmes échantillons.

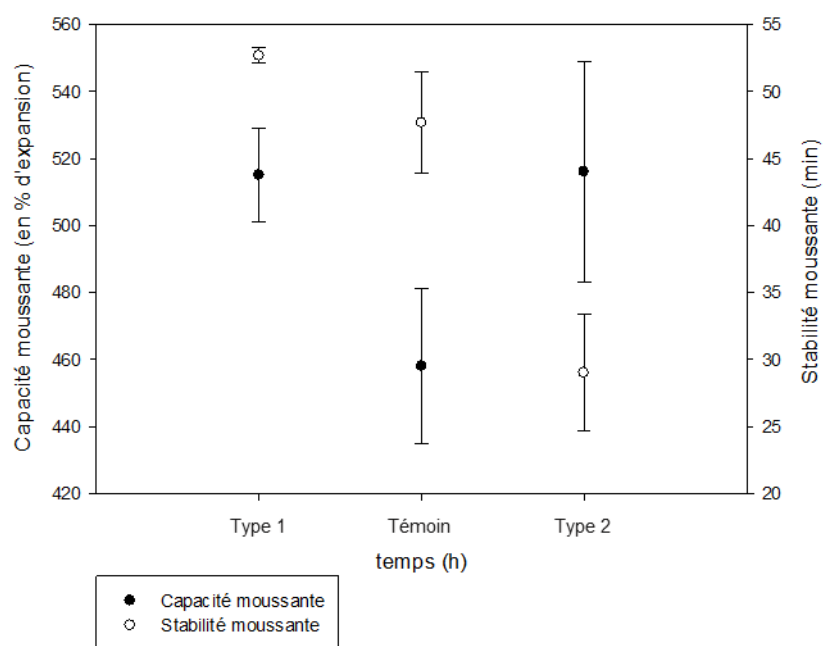


Figure 58. Résultats des analyses des propriétés moussantes pour les échantillons témoin, type 1 et type 2.

L'altération présente également un effet positif sur les propriétés moussantes des produits, permettant une augmentation d'environ 60% d'expansion pour les types 1 et 2. La stabilité de la mousse (exprimée en min) est cependant impactée différemment par les deux types d'altération. L'altération de type 1 permet une augmentation de cette stabilité, dont le score moyen passe de 48 à 53 min. L'altération de type 2 engendre, quant à elle, une diminution importante de cette stabilité, de 48 à 28 min. L'altération impacte donc les propriétés moussantes des échantillons en l'augmentant, indépendamment du type (1 ou 2). La stabilité de la mousse est, elle, dépendante du type d'altération, augmentée pour le type 1 et fortement diminuée pour le type 2.

2.2.2 Conclusion

Les échantillons industriels analysés ici ont été proposés comme représentatifs d'échantillons sains et altérés à un stade avancé. Les différences observées pour le pH, la couleur et les propriétés fonctionnelles permettent de confirmer la sensibilité des méthodes de mesures macroscopiques employées sur ces échantillons très contrastés, ainsi que leur pertinence. Les résultats de colorimétrie sont cependant difficilement exploitables, probablement fortement impactés par l'étape de transport ou bien par la différence de matériel/protocoles utilisés pour l'obtention des données. Les résultats de pHmétrie permettent quant à eux de confirmer la bonne conservation des échantillons au cours du transport entre laboratoires et ce malgré une faible différence des valeurs enregistrées sur les deux sites. L'adéquation des données de pH mesurées par les deux équipes permet également d'envisager une analyse intégrée des données s'appuyant sur cet indicateur (profilage physico-chimique et

métabolique). Il est également intéressant de noter que l'altération de type 2 apparaît comme un phénomène plus marqué d'un point de vue phénotype physico-chimique.

Les résultats des profilages métaboliques présentés dans ce qui suit ont pour objectifs de valider la méthodologie développée sur échantillons « vrais » et de permettre une comparaison entre les résultats obtenus sur échantillons industriels et ceux qui seront obtenus sur échantillons modèles dans le cadre de l'étude cinétique de l'altération. Les marqueurs identifiés dans les différentes analyses seront comparés et étudiés dans le dernier paragraphe de ce chapitre. Des précautions devront toutefois être prises pour la comparaison de ces données. En effet, les échantillons analysés dans cette partie provenant de différentes industries (contrairement à ceux utilisés pour les études cinétiques), des différences de propriétés physico-chimiques de la matière première (liées aux pondeuses, à leur alimentation, etc.) peuvent induire des modifications des profils chimiques des échantillons, indépendamment des altérations de type 1 ou 2.

2.3 Métabotypage des EL industriels

2.3.1 Prise d'empreinte métabolique par GC-MS

Les échantillons ont été déprotéinés, et traités selon le protocole optimisé d'obtention des signatures physico-chimiques développé au début de ce projet (voir chapitre 3 - 0). Les données ont été traitées selon la méthode développée précédemment (voir chapitre 3 - 3.4.3) avec une évolution des valeurs du paramètre de filtration MCF de 0,5, impliquant qu'un signal devait être présent dans la moitié des échantillons analysés pour être considéré comme pertinent, à 2, impliquant qu'un composé devait être présent dans deux des échantillons analysés (2 réplicats d'un des trois échantillons analysés) afin d'être considéré comme pertinent. Les intensités ont ensuite été normalisées et un seuil de coupure à une intensité relative de 0,01 (déterminé lors du développement du protocole de traitement des données) a été appliqué.

2.3.1.1 Analyse des résultats

Les représentations graphiques des résultats d'analyses statistiques multivariées (ACP, PLS-DA) sont tout d'abord présentées car elles permettent d'apprécier le contraste entre les signatures chimiques (prises dans leur globalité) des différents échantillons, ainsi que leur dispersion. Pour l'ensemble des représentations graphiques, une transformation log et une mise à l'échelle de Pareto (centrées sur la moyenne et divisées par la racine carrée de l'écart type de chaque variable) ont été appliquées afin de mieux refléter l'impact réel de chaque variable (signaux).

La Figure 59 présente les résultats des ACP et des PLS-DA pour les typages effectués sur les fractions polaire éthanol et apolaire acétone.

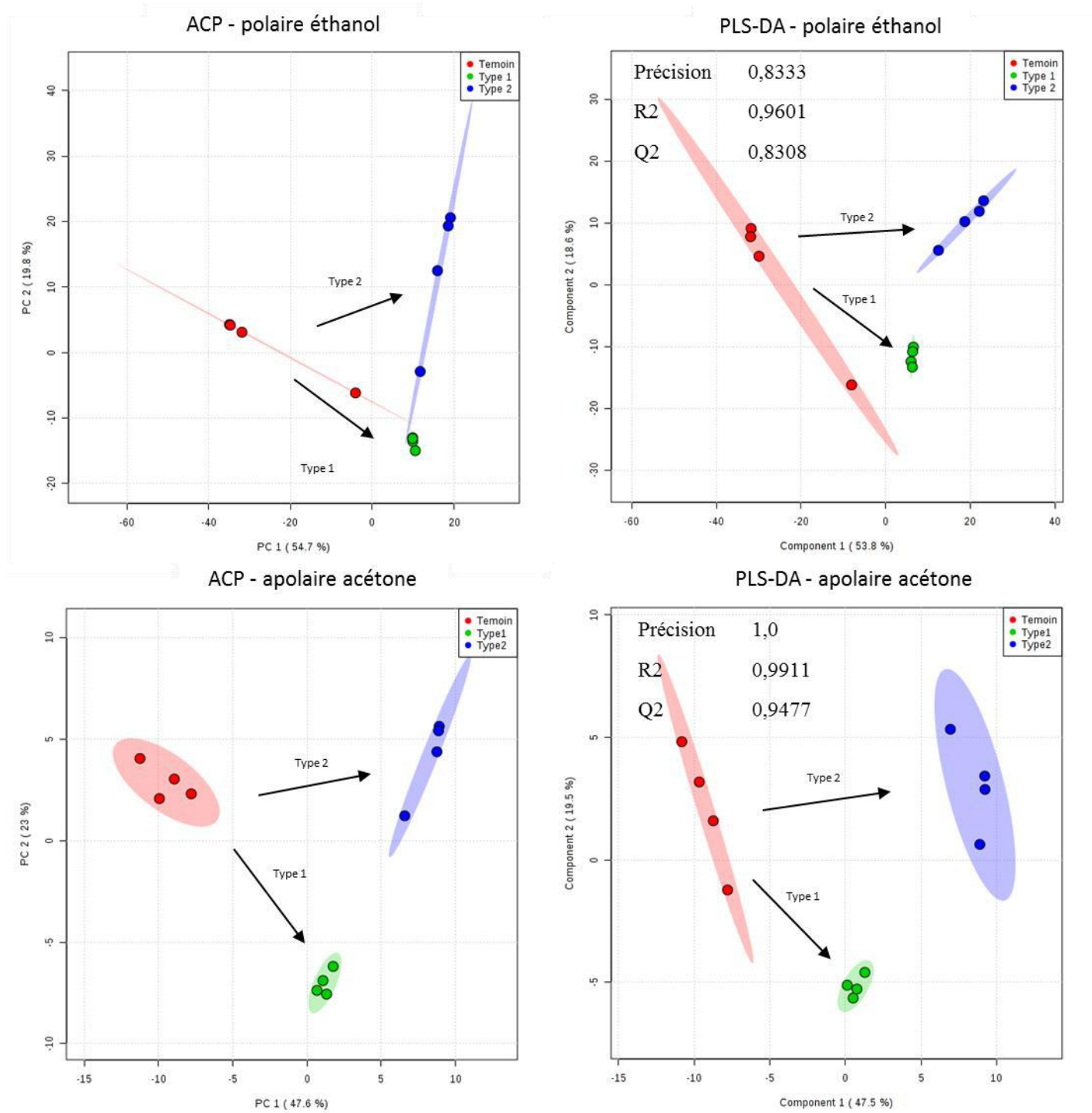


Figure 59. Représentation des analyses ACP et PLS-DA pour les métabotypes des fractions polaire éthanol et apolaire acétone dans le cadre de l'étude des échantillons industriels.

L'ACP des typages de la fraction polaire éthanol permet de vérifier que les échantillons se séparent en deux groupes constitués des échantillons sains (en rouge) et des échantillons altérés (en

vert et bleu) sur la première composante qui représente 54,7% de la variance totale résiduelle. Les échantillons altérés de type 1 et 2 se séparent sur la deuxième composante qui représente 19,8% de la variance. La PLS-DA permet une meilleure séparation des groupes d'échantillons avec des scores de validation R2 et Q2 très élevés (0,96 et 0,83). Pour la fraction apolaire acétone, les résultats de l'ACP permettent d'apprécier la séparation des groupes d'échantillons selon les deux composantes (représentant respectivement 47,6% et 23% de la variance résiduelle) avec des échantillons plus regroupés que pour la fraction polaire éthanol. La PLS-DA présente également une très bonne séparation des échantillons et des scores de validation encore plus élevés (0,99 et 0,95).

Pour résumer, on peut dire que l'ACP et la PLS-DA permettent une très bonne séparation des échantillons en fonction de leur profil chimique dans les deux fractions étudiées (polaire éthanol et apolaire acétone). On peut également noter que dans les représentations analysées, la première composante principale semble être plutôt représentative du phénomène d'altération et la seconde du type d'altération rencontré (1 ou 2). Une analyse de classification ascendante hiérarchique (HC) a également été menée sur les mêmes données. La Figure 60 illustre les représentations graphiques (dendrogrammes) résultant des analyses réalisées sur les fractions polaire éthanol et apolaire acétone.

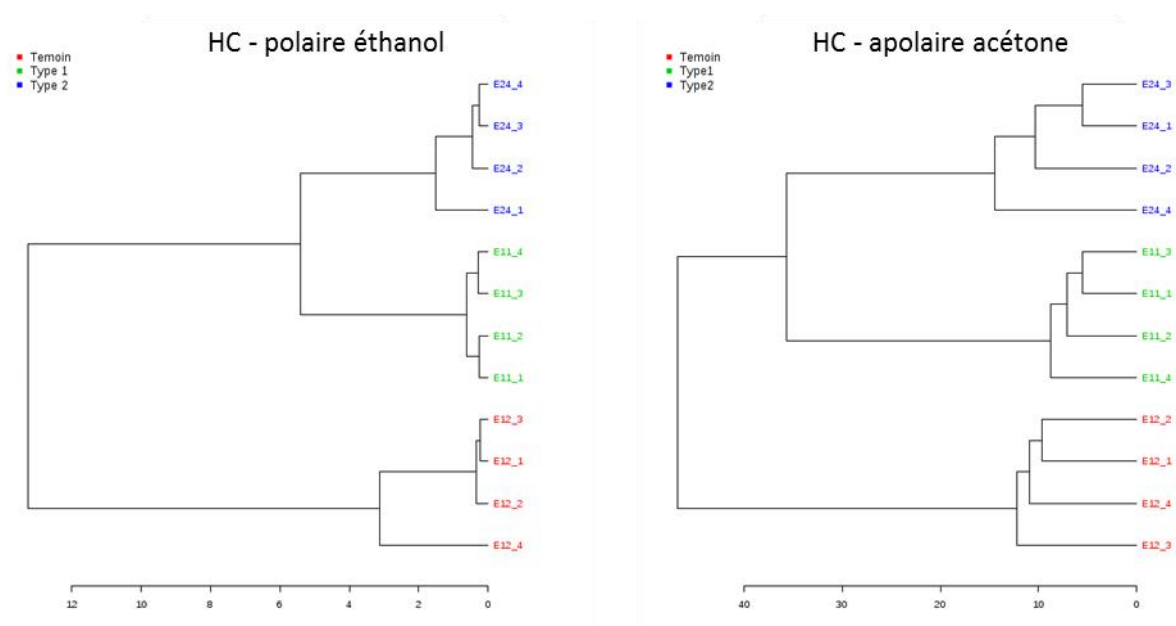


Figure 60 Dendrogrammes des fractions polaire éthanol et apolaire acétone

Les échantillons sont là aussi correctement classifiés par groupes, distinguant d'une part les échantillons sains et d'autre part les échantillons altérés en fonction du type d'altération. Cette analyse permet de confirmer les observations effectuées sur les profils d'ACP et de PLS-DA suggérant l'existence d'une différence de profil chimique caractéristique des échantillons altérés en fonction du type d'altération rencontré.

Afin d'identifier les composés impliqués dans ces différences de signatures chimiques, les données ont été analysées sous la forme de carte de chaleur, illustrant la contribution des métabolites aux différences observées. La Figure 61 présente les résultats de ces analyses, réalisées sur les fractions polaire éthanol et apolaire acétone. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés.

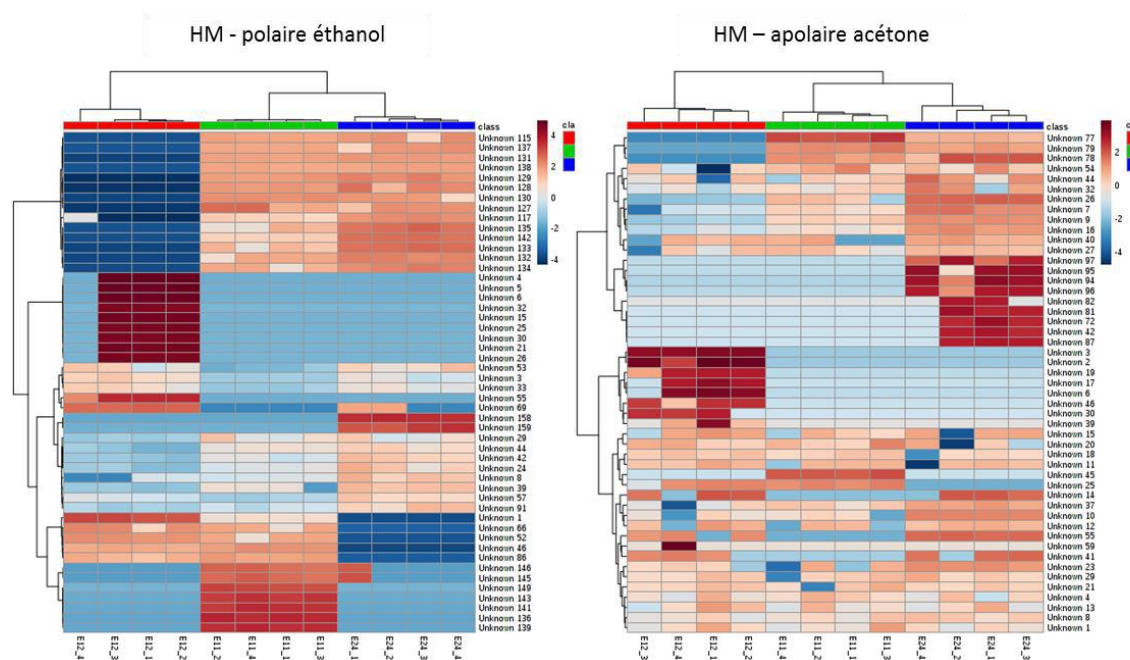


Figure 61. Carte de chaleur (HM pour Heat Map) des fractions polaire éthanol et apolaire acétone

Les structures arborescentes situées sur la partie haute des figures correspondent aux résultats des analyses par HC présentées précédemment, classifiant ainsi les échantillons en colonne par groupes sain, altéré de type 1 et altéré de type 2. Celles situées sur la partie gauche des cartes de chaleur correspondent aux groupes de métabolites dont le profil d'intensité est caractéristique d'un groupe d'échantillon donné. Ces classifications en ligne confirment que les différences entre les signatures observées en ACP ou PLS-DA peuvent être attribuées à des composés ou groupes de composés qui sont soit fortement abondants (rouge) soit faiblement abondant (bleu). Il existe donc des composés qui peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels des deux types d'altération, et ce indépendamment l'une de l'autre. Cela est très marqué pour la fraction polaire éthanol. On se propose dans ce qui suit de sélectionner les signaux spécifiques de chaque échantillon en fonction de leur modulation par une approche exploitant le calcul des Fold Change.

2.3.1.2 Calcul des Fold Change

Les Fold Change (FC) tels que présentés dans le chapitre 2 (voir chapitre 2 - 6.1.2) ont donc été calculés pour l'ensemble des signaux retenus après filtration des données dans le but d'identifier les signaux présentant une différence significative d'intensité entre les différents échantillons. L'échantillon sain est ici considéré comme l'état initial et les échantillons altérés de type 1 et 2 comme les états finaux des types d'altération 1 et 2. Les composés présentant un FC supérieur à 1 ou inférieur à -1 (et présentant donc une variation d'intensité de 100% entre l'échantillon 12 et un des échantillons altérés) ont été retenus, comme décidé lors du choix des seuils de significativité de modulation d'un signal (voir chapitre 3 - 3.5.2.2).

A l'issue de ce processus, 132 marqueurs potentiels ont été identifiés dans les deux fractions analysées. Le nombre de composés retenus pour chaque fraction comme potentiellement représentatifs d'un ou de chacun des types d'altération est présenté dans le Tableau 56.

Tableau 56. Nombre de composés retenus pour chaque fraction

Polaire éthanol	Apolaire acétone
99	33

Une fois ces signaux filtrés, un processus d'identification dans deux bases de données distinctes (Golm Metabolome Database ou GMD et NIST08) a été réalisé. Les signaux ont tout d'abord été annotés sur la base des données de GMD selon le protocole développé dans le cadre des développements méthodologiques (voir chapitre 3 - 3.4.3). Chaque signal a ensuite été manuellement comparé aux données de la base NIST08 à l'aide du logiciel MSsearch (NIST), l'entrée devait résenter la meilleure correspondance sur les spectres de masse ainsi qu'une différence maximum d'index de rétention de 3% pour les index réels et de 5% pour les index théoriques. La base de données NIST présente pour chaque entrée les index de rétention mesurés quand ces derniers sont disponibles, et des index de rétention théoriques moins précis lorsque les précédents ne sont pas disponibles. Comme précédemment, la détection par MS n'étant active qu'au-delà d'un seuil de coupure de 6 min afin de protéger le détecteur de l'encrassement liée au passage du pic de solvant, le premier alcane détecté dans les échantillons de standards servant à la détermination des index de rétention est le dodécane présentant un index de 1200. Pour les composés élués avant ce composé, les index de rétention (inférieurs à 1200) n'ont donc pas pu être calculés.

Finalement, les composés ont été annotés selon trois niveaux de considération définis comme suit :

- Identification

L'identité du composé a été confirmée par comparaison avec un standard injecté dans les mêmes conditions.

- Annotation niveau 1 : 2 bases de données concordantes - Spectre de masse + Index de rétention

Le composé est identifié de façon similaire par les deux bases de données sur la base de son spectre de masse et de son index de rétention.

- Annotation niveau 2 : 1 base de données – Spectre de masse + Index de rétention

Le composé est identifié par une base de données sur la base de son spectre de masse et de son index de rétention. L'autre base de données ne donne pas de correspondance satisfaisante.

Les composés d'intérêts ou marqueurs potentiels identifiés dans chacune des fractions sont présentés dans le Tableau 57.

Tableau 57. Marqueurs potentiels identifiés dans les deux fractions analysées pour chaque type d'altération, les différents niveaux d'identifications sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés considérés comme identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1 et orange pour ceux annotés au niveau 2).

Type 1		Type 2	
Pol Eth	Apo Ace	Pol Eth	Apo Ace
Augmentation		Augmentation	
Acide lactique	Acide palmitique	Acide lactique	Acide palmitique
Leucine	Acide lactique	Leucine	Acide lactique
Valine	Myo-inositol	Valine	Myo-inositol
Isoleucine	Erythritol	Isoleucine	Erythritol
Alanine	Acide linoléique	Glycérol	Acide linoléique
Phénylalanine		Alanine	Isoleucine
Acide glutamique		Phénylalanine	Norleucine
Thréonine		Acide glutamique	Erythritol
Urée		Thréonine	Acide succinique
Erythritol		Erythritol	Acide oléique
Uracile		Uracile	Acide palmitélaïdique
Tryptophane		Tryptophane	
Tyrosine		Glycine	
		Cadavérine	
		Acide benzoïque	
		3-Phenyllactic	
Diminution		Diminution	
Glucose	Glucose	Glucose	Glucose
Sérine	Cholestérol	Tyrosine	Cholestérol
Méthionine		Sérine	
		Méthionine	

En plus des signaux identifiés, différents composés retenus comme potentiellement intéressants n'ont pas pu être annotés, laissant entrevoir d'autres biomarqueurs potentiels. Le nombre de ces composés d'intérêt non identifiés pour chaque fraction est présenté dans le Tableau 58.

Tableau 58. Nombre de composés d'intérêt non identifié pour chaque fraction

Polaire éthanol	Apolaire acétone
78	21

2.3.1.3 Répartition des marqueurs potentiels dans les différentes fractions

Cette analyse présentée dans l'Annexe I permet de confirmer la complémentarité entre les fractions étudiées et de mettre en évidence l'existence de marqueurs caractéristiques de chaque type d'altération et d'autres communs à ces deux types. On se propose dans l'étape suivante d'analyser dans le détail le comportement des composés pour lesquels la variation d'intensité est la plus significative entre les différents échantillons

2.3.1.4 Analyse détaillée des marqueurs potentiels

L'intensité de chaque marqueur potentiel a été étudiée dans le but d'identifier parmi ces composés ceux dont la variation d'intensité serait la plus significative. Les histogrammes correspondant à l'intensité des signaux sélectionnés dans chacune des fractions sont présentés dans les annexes de ce manuscrit (Annexe L).

Le Tableau 59 résume les données d'intensité relatives dans les échantillons sains et altérés de type 1 et 2 pour chaque marqueur d'altération identifié. Les marqueurs dont l'intensité relative présente un FC > 1 ou < -1 (augmentation ou diminution jugée significative) sont surlignés en gris.

Polaire éthanol	Témoin			Altéré type 1			Altéré type 2		
Acide lactique	1,64	+/-	0,12	16,49	+/-	2,33	56,33	+/-	14,93
Leucine	1,60	+/-	0,32	5,18	+/-	0,45	10,76	+/-	3,54
Valine	1,01	+/-	0,12	2,78	+/-	0,21	4,49	+/-	1,20
Isoleucine	0,93	+/-	0,15	2,17	+/-	0,18	4,59	+/-	1,61
Glycérol	0,70	+/-	0,03	1,07	+/-	0,14	8,50	+/-	1,12
Alanine	0,47	+/-	0,06	1,94	+/-	0,18	4,05	+/-	0,39
Phénylalanine	0,39	+/-	0,04	0,89	+/-	0,16	1,90	+/-	0,33
Acide glutamique	0,36	+/-	0,05	0,75	+/-	0,08	1,36	+/-	0,35
Thréonine	0,39	+/-	0,09	1,34	+/-	0,10	1,79	+/-	0,33
Urée	0,10	+/-	0,02	0,30	+/-	0,03	0,12	+/-	0,01
Tyrosine	0,28	+/-	0,05	0,55	+/-	0,12	0,00		
Acide succinique	0,00			2,74	+/-	0,36	6,85	+/-	2,32
Erythritol	0,00			0,10	+/-	0,01	0,18	+/-	0,02
Uracile	0,00			0,11	+/-	0,01	0,13	+/-	0,02
Tryptophane	0,00			0,02	+/-	0,00	0,01	+/-	0,02
Glycine	0,00			0,00			0,02	+/-	0,01
Cadavérine	0,00			0,00			0,12	+/-	0,10
3-Phenyllactic	0,00			0,00			0,01	+/-	0,01
Glucose	53,85	+/-	11,22	0,03	+/-	0,01	0,00		
Sérine	0,15	+/-	0,11	0,00			0,00		
Méthionine	0,03	+/-	0,02	0,00			0,00		
Apolaire acétone	Témoin			Altéré type 1			Altéré type 2		
Acide palmitique	1,55	+/-	0,22	0,80	+/-	0,08	2,11	+/-	0,22
Glycérol	1,60	+/-	0,32	5,18	+/-	0,45	10,76	+/-	3,5391
Norleucine	0,39	+/-	0,09	1,34	+/-	0,10	1,79	+/-	0,33
Erythritol	0,10	+/-	0,01	0,13	+/-	0,03	0,17	+/-	0,10
Acide succinique	0,01	+/-	0,01	0,02	+/-	0,00	0,02	+/-	0,00
Acide oléique	0,00	+/-	0,01	0,00	+/-	0,00	0,01	+/-	0,01
Myo-inositol	0,34	+/-	0,07	0,13	+/-	0,01	0,26	+/-	0,05
Acide linoléique	0,04	+/-	0,00	0,02	+/-	0,00	0,02	+/-	0,01
Glucose	26,80	+/-	18,64	0,00			0,00		
Cholestérol	1,63	+/-	1,09	0,00			0,00		
Ergost-5-en-3-ol	0,94	+/-	0,63	0,00			0,00		
Acide stéarique	0,75	+/-	0,51	0,00			0,00		
Acide lactique	0,57	+/-	0,38	0,00			0,00		
Isoleucine	0,39	+/-	0,26	0,00			0,00		
Acide palmitélaïque	0,00	+/-	0,01	0,00			0,00		

Tableau 59. Données d'intensité relatives dans les échantillons industriels sains et altérés de type 1 et 2 pour chaque marqueur d'altération identifié par GC-MS.

Parmi les composés identifiés, l'acide lactique est le seul marqueur à présenter des comportements opposés dans les deux fractions analysées, l'intensité de son signal étant bien plus importante dans la fraction polaire éthanol. On peut remarquer sur ces résultats que les variations d'intensité sont plus marquées pour l'altération de type 2. Cette observation est cohérente avec celle réalisée précédemment pour les mesures macroscopiques où l'altération de type 2 présentait un impact plus important sur les différents indicateurs employés.

La majorité des marqueurs retenus présentent une variation d'intensité significative entre l'échantillon témoin et au moins un des échantillons altérés. Ces composés (surlignés en gris) représentent donc tous des marqueurs potentiels de ces types d'altération tels que perçus sur des échantillons industriels. L'analyse de leur pertinence à travers une évaluation plus fine de leur évolution au cours de l'altération sera effectuée dans le cadre de l'étude cinétique en conditions maîtrisées sur des EL modèles.

2.3.2 Profilage métabolique par GC-MS

Les analyses de prises d'empreinte ont été complétées par une analyse ciblée, pour laquelle des gammes de calibrations ont été effectuées (voir chapitre 3 - 3.3.2.2). La liste des composés quantifiables détectés dans les différentes fractions des échantillons d'EL analysés est présentée dans l'Annexe J de ce manuscrit.

2.4 Prise d'empreinte métabolique par HR-RMN

Des essais et analyses en RMN ont également été effectués sur les mêmes échantillons utilisés pour les investigations par GC-MS. La déprotéination a été effectuée sur un volume de 8 mL suivant une version adaptée du protocole précédemment employé employant un volume de solvant de déprotéination de 32 mL (ratio de solvant de déprotéination sur matière sèche de x20), et de 20mL de MCW B (4/3/1) pour la séparation en fractions métaboliques (un volume de 2,5 mL d'eau a été ajouté pour la séparation des phases). Les échantillons ont été séchés sous flux d'azote puis lyophilisés selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (4.1.3.3) afin de compléter le séchage des phases apolaires (visqueuses).

Les données ont été traitées selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (voir - 5.2.2.2). Les analyses de ces échantillons ont servi à calibrer les expériences à venir sur l'altération cinétique des EL. Les échantillons n'ont pas été tamponnés et l'intensité des signaux mesurée n'a pas été normalisée sur celle d'un standard interne.

2.4.1 Visualisation des résultats

Les analyses n'ayant été effectuées que sur un réplicat par échantillon, la visualisation des ACP ne permet pas de discuter réellement de la distribution des échantillons sains et altérés de type 1 et 2, mais elle permet tout de même de proposer une idée de la dispersion entre les différents groupes. Seules les données de la fraction polaire éthanol sont présentées sur la Figure 62, réalisée avec des triplicats artificiels.

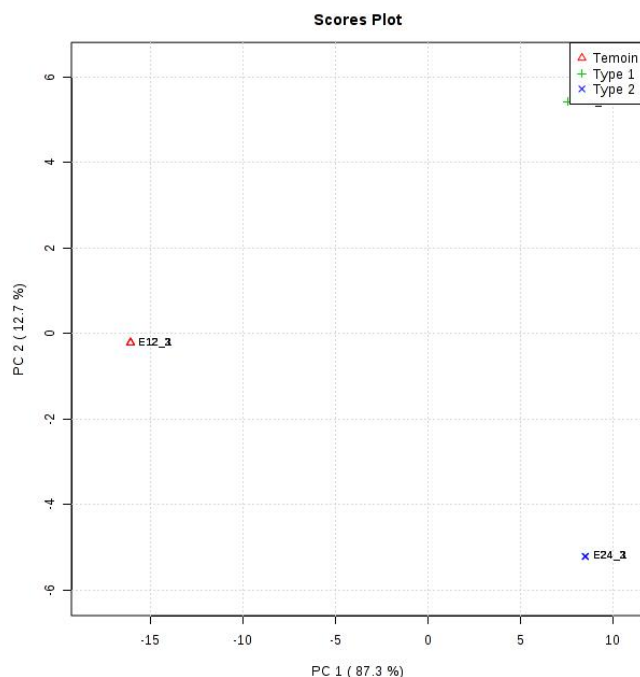


Figure 62. Résultats d'ACP réalisées sur les données de profilage en RMN ^1H sur les échantillons industriels sain, altéré type 1 et altéré type 2.

La composante 1 (représentant 87,3% de la variance mesurée) permet de séparer clairement l'échantillon sain des échantillons altérés tandis que la composante 2 (représentant 12,7% de la variance mesurée), permet de séparer les deux échantillons altérés selon leur type. Les signatures chimiques obtenues par RMN semblent donc, elles aussi, être discriminantes des types d'altération. Afin de mieux identifier l'origine des différences entre les profils chimiques obtenus en RMN, les données ont été analysées selon une approche de double clustering hiérarchique. La Figure 63 présente les résultats de cette analyse réalisée sur les fractions polaires éthanol. Les algorithmes utilisés sont paramétrés avec des distances euclidiennes et selon les critères d'agglomération de Ward. Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés.

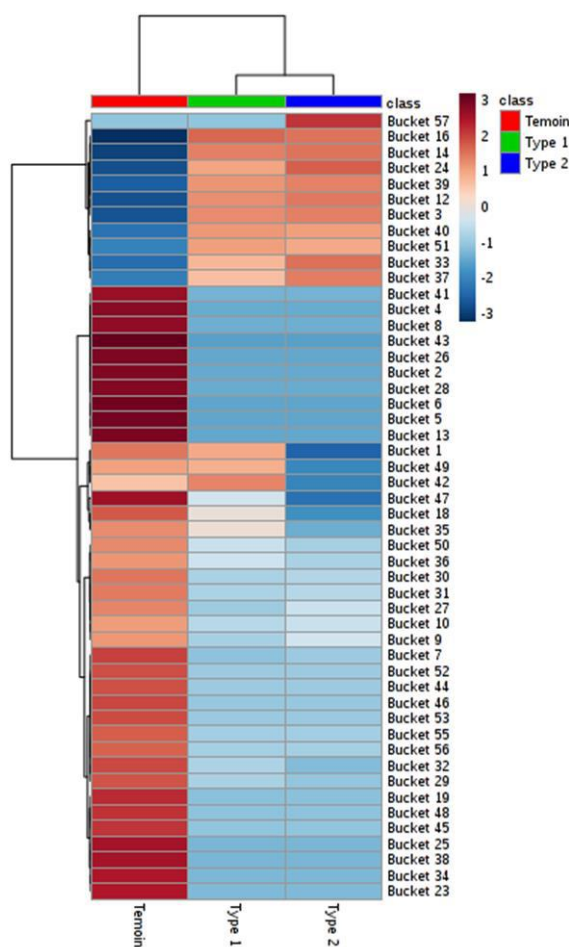


Figure 63. Carte de chaleur des données de profilage mesurées en RMN ^1H pour la fraction polaire éthanol

Cette analyse permet de confirmer l'existence de groupes de signaux dont la présence (rouge) ou l'absence (bleu) contribuent aux signatures chimiques caractéristiques des échantillons. Ces composés peuvent donc être considérés comme des marqueurs potentiels des deux types d'altération, et ce indépendamment l'une de l'autre. On se propose dans ce qui suit de sélectionner les signaux spécifiques de chaque échantillon en fonction de leur modulation par une approche exploitant le calcul des Fold Change.

2.4.1.1 Calcul des Fold Change

Les Fold Change ont été calculés pour l'ensemble des signaux. Comme pour l'analyse par GC-MS, l'échantillon sain est ici considéré comme l'état initial et les échantillons altérés de type 1 et 2 comme les états finaux. Les composés présentant un FC supérieur à 1 ou inférieur à -1 ont été retenus. A l'issue de ce processus, 103 marqueurs potentiels ont été identifiés dans les quatre fractions analysées. Le nombre de composés retenus pour chaque fraction et considérés comme potentiellement représentatifs de chaque type d'altération est présenté dans le Tableau 60.

Tableau 60. Nombre de composés retenus pour chaque fraction pour l'analyse des échantillons industriels par RMN ¹H.

Polaire éthanol		Polaire acétone		Apolaire éthanol		Apolaire acétone	
Type 1	Type 2	Type 1	Type 2	Type 1	Type 2	Type 1	Type 2
34	56	17	26	11	9	8	6

Ces composés ont été annotés par l'équipe de la plateforme Corsaire du CEISAM à l'aide de l'outil NMR Proc Flow. L'absence de base de données spécifique à l'étude de la composition chimique fine des œufs par RMN ¹H et la complexité de cette matrice ayant rendu les étapes de bucketing (découpage du spectre) et d'annotation complexes, seuls certains signaux ont pu être identifiés. Certains signaux ont donc été annotés comme correspondant à plusieurs composés identifiés ou à plusieurs composés potentiels.

En plus de ces composés, différents signaux retenus comme potentiellement intéressants n'ont pas pu être identifiés laissant entrevoir d'autres biomarqueurs à investiguer. Le nombre de ces signaux d'intérêt pour chaque fraction est présenté dans le Tableau 61.

Tableau 61. Nombre de composés d'intérêt non identifiés pour chaque fraction

Polaire éthanol		Polaire acétone		Apolaire éthanol		Apolaire acétone	
Type 1	Type 2	Type 1	Type 2	Type 1	Type 2	Type 1	Type 2
23	45	6	15	11	9	7	5

2.4.1.2 Analyse détaillée des marqueurs potentiels

L'intensité de chacun des marqueurs potentiels retenus a été étudiée dans le but d'identifier parmi ces composés ceux dont la variation d'intensité serait la plus significative. L'évolution du signal de chacun de ces composés a été ainsi représentée graphiquement afin de sélectionner les marqueurs potentiels les plus pertinents. Les histogrammes correspondant à l'intensité de ces signaux dans chacune des fractions ainsi que les données correspondant aux signaux non identifiés ou dont l'annotation est trop complexe pour l'interprétation sont présentées dans l'Annexe M de ce manuscrit.

Le Tableau 62 résume les données d'intensité brutes dans les échantillons sains et altérés de type 1 et 2 pour chaque marqueur d'altération identifié. Comme précédemment, les marqueurs dont l'intensité présente un FC > 1 ou < -1 (augmentation ou diminution jugée significative) entre les échantillons sains et les échantillons altérés sont surlignés en gris.

Tableau 62. Données d'intensités relatives dans les échantillons industriels sains et altérés de type 1 et 2 pour chaque marqueur d'altération identifié dans les quatre fractions étudiées par RMN ¹H.

Polaire éthanol	Témoin	Altéré type 1	Altéré type 2
Acide lactique (satellite 13c) + Thréonine	0,00E+00	7,50E+06	8,90E+06
Lysine / Isoleucine	2,87E+07	1,06E+06	1,22E+06
Lysine	9,80E+06	0,00E+00	0,00E+00
Lysine	4,19E+06	1,22E+06	1,62E+06
Acide acétique (satellite 13c)	1,03E+07	3,70E+06	4,13E+06
Valine	0,00E+00	8,00E+06	1,13E+07
Acide pyruvique / Acide succinique	0,00E+00	8,26E+07	6,80E+07
Asparagine / Phénylalanine / Cystéine	2,12E+07	7,99E+06	6,25E+06
Thréonine	0,00E+00	4,10E+06	5,20E+06
Glucose (β)	6,29E+07	0,00E+00	0,00E+00
Glucose (α)	3,67E+07	4,83E+05	0,00E+00
Polaire acétone			
Ethanol (?)	3,99E+06	6,27E+07	4,31E+07
Acide lactique + Théonine	4,41E+07	1,18E+08	2,86E+08
Acide acétique + Lysine	4,80E+06	3,19E+07	2,57E+07
Acide succinique (+Acide malique)	1,37E+06	2,13E+07	2,63E+07
Asparagine (?)	1,98E+05	0,00E+00	4,56E+05
Créatine / Créatinine / Cystéine	5,69E+05	7,37E+05	1,69E+06
Acide lactique + Phosphocholine / Proline	5,26E+06	3,21E+07	8,68E+07
Glucose (β)	5,54E+07	6,01E+05	0,00E+00
Tyrosine	4,59E+06	5,06E+06	1,02E+07
Tryptophane	5,21E+05	1,48E+06	1,87E+06
Acide formique	7,18E+05	5,98E+07	2,97E+07
Apolaire acétone			
Phospholipides totaux	1,29E+08	6,31E+07	5,27E+07

Comme pour les résultats de profilage par GC-MS, on peut remarquer que les variations d'intensité mesurées sont plus importantes pour l'altération de type 2. La majorité des marqueurs retenus présente une intensité de variation significative entre l'échantillon témoin et au moins un des échantillons altérés. Ces composés (surlignés en gris) représentent donc tous des marqueurs potentiels. L'analyse de leur pertinence et une évaluation plus fine de leur évolution au cours de l'altération sera proposée dans le cadre de l'étude cinétique de l'altération dans la suite de ce chapitre.

2.5 Analyse croisée des résultats de prise d'empreinte par GC-MS et RMN

Les marqueurs d'altération potentiels identifiés dans le cadre des profilages par GC-MS et par RMN ¹H des échantillons industriels ont été comparés. L'objectif de cette analyse est de confirmer de manière croisée (multi techniques) l'identification de certains marqueurs. Les analyses GC-MS n'ayant été réalisées que sur les fractions polaire éthanol et apolaire acétone et cette dernière n'ayant pas permis l'identification claire de signaux caractéristiques des métabolites en RMN ¹H, cette comparaison n'a pu être effectuée que pour les composés de la fraction polaire éthanol. Le Tableau 63 présente les résultats enregistrés pour les marqueurs détectés avec ces deux techniques.

Tableau 63. Valeurs d'intensité enregistrées pour les marqueurs détectés à la fois par GC-MS et par RMN dans la fraction polaire éthanol des échantillons industriels.

Profilage par GC-MS			
Polaire éthanol	Témoin	Altéré type 1	Altéré type 2
Acide lactique	1,6432 +/- 0,1238	16,4872 +/- 2,3334	56,326 +/- 14,9315
Valine	1,0128 +/- 0,124	2,7842 +/- 0,2111	4,4854 +/- 1,1975
Acide succinique	0	2,7404 +/- 0,3554	6,8466 +/- 2,3185
Thréonine	0,3884 +/- 0,0854	1,3441 +/- 0,0975	1,7885 +/- 0,3314
Glucose	53,8477 +/- 11,222	0,0324 +/- 0,0064	0
Profilage par RMN ¹ H			
Polaire éthanol	Témoin	Altéré type 1	Altéré type 2
Acide lactique (satellite 13c) + Thréonine	0,00E+00	7,50E+06	8,90E+06
Valine	0,00E+00	8,00E+06	1,13E+07
Acide pyruvique / Acide succinique	0,00E+00	8,26E+07	6,80E+07
Glucose (β)	6,29E+07	0,00E+00	0,00E+00
Glucose (α)	3,67E+07	4,83E+05	0,00E+00

Il est important de noter que les mesures par RMN n'ayant été réalisées que sur un réplicat, leur variabilité ne peut être appréciée. L'évolution des intensités est cohérente pour l'ensemble des composés à l'exception de l'acide succinique. En effet pour ce dernier, l'augmentation plus importante du signal dans l'échantillon altéré de type 2 par rapport à l'échantillon altéré de type 1 observé lors des analyses par GC-MS n'est pas retrouvé lors des analyses par RMN. Selon l'annotation, il est possible que le signal détecté par RMN soit impacté par le signal de l'acide pyruvique (non détecté ou non retenu dans les analyses par GC-MS).

Les marqueurs potentiels identifiés par une seule des deux approches de profilage employées (GC-MS et RMN) pour l'ensemble des fractions sont listés ici. Pour le profilage GC-MS uniquement : Leucine, Isoleucine, Glycérol, Alanine, Phénylalanine, Acide glutamique, Urée, Tyrosine, Erythritol, Uracile, Glycine, Cadavérine, 3-Phenyllactic, Sérine, Méthionine. Pour le profilage par RMN ¹H uniquement : Lysine, Acide acétique, Ethanol, Acide formique, phospholipides totaux.

Les marqueurs identifiés dans le cadre de l'étude des échantillons industriels seront croisés avec ceux obtenus pour les études cinétiques de l'altération de type 1 et 2 dans les parties consacrées à ces analyses dans la suite de ce manuscrit.

2.6 Interprétation des résultats

L'analyse des échantillons industriels au niveau macroscopique et métabolique a permis la mise en évidence de différences de profils physico-chimiques et métaboliques entre l'échantillon frais et les échantillons altérés de type 1 et 2.

La calibration entre les partenaires a permis de confirmer la bonne conservation des échantillons entre les laboratoires malgré de faibles différences de profils observées. Les résultats de l'analyse des propriétés fonctionnelles ont mis en évidence un impact de l'altération sur les capacités gélifiantes, moussantes et émulsifiantes des EL.

L'origine des différences observées sur le plan macroscopique a été investiguée par profilage métabolique. Ces analyses ont permis d'identifier des composés présentant des différences d'intensité marquées entre les échantillons altérés et le témoin. Pour certains de ces marqueurs potentiels on peut déjà émettre des hypothèses au sujet des voies métaboliques dans lesquelles ils pourraient être impliqués (Figure 64).

La diminution de l'intensité du signal du glucose et l'augmentation observée pour les signaux des acides lactique et succinique pourraient par exemple être liées au catabolisme du glucose. Les acides lactique et succinique étant des produits courants du catabolisme du glucose en anaérobiose, cette hypothèse permettrait d'expliquer, en partie, l'acidification observée sur les échantillons altérés de type 1 et 2. L'augmentation du signal du glycérol et les variations observées pour les signaux de lipides tels que les acides linoléique ou palmitique dans l'échantillon altéré de type 2 pourraient être liées à des activités lipolytiques sur les phospholipides et triacylglycerols de l'EL au cours de l'altération. Cette hypothèse est cohérente avec les modifications observées pour les propriétés émulsifiantes pour l'échantillon altéré de type 2. L'augmentation d'intensité des signaux de différents acides aminés (acide glutamique, valine, leucine, isoleucine, thréonine, alanine) pourrait également être liée à des activités protéolytiques. Encore une fois, cette hypothèse serait cohérente avec les observations réalisées dans le cadre de l'analyse des propriétés fonctionnelles des échantillons.

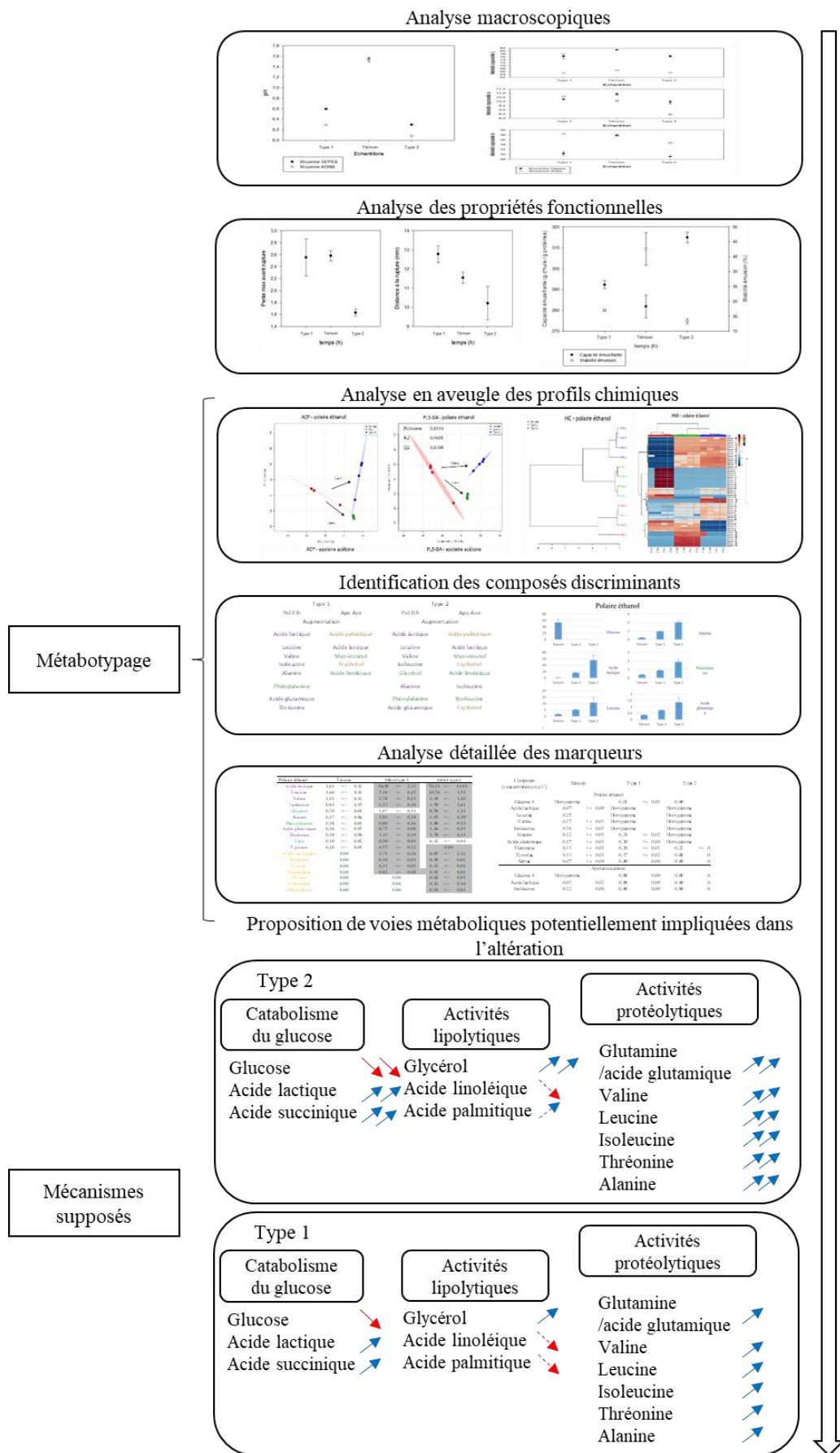


Figure 64. Schéma récapitulatif des analyses réalisées sur les échantillons industriels et des mécanismes proposés pour les altérations de type 1 et 2

2.7 Conclusion

Plusieurs marqueurs potentiellement liés à différentes voies métaboliques d'altération ont été identifiés (catabolisme du glucose, activités lipolytiques ou protéolytiques bactériennes au cours de l'altération). Cependant, la mesure de l'intensité pour ces composés n'a pu être réalisée que dans un échantillon sain et deux échantillons à des stades d'altération avancés. L'analyse de ces échantillons sous un angle statique n'a pas permis de décrire les profils d'évolution des composés d'intérêt au cours de l'altération, rendant difficile l'appréciation de leur pertinence et de leur implication potentielle dans les modifications physico-chimiques observées sur le plan macroscopique. Le manque d'information sur l'évolution temporelle des intensités ne permet pas non plus la recherche de marqueurs précoces de l'altération. Il est important de noter que certaines des différences de profils chimiques observées pourraient être liées à des différences de composition de la matière première (différents producteurs). Enfin, le phénomène d'altération étant ici lié à la présence de différentes souches altérantes, il est plus complexe de se référer aux connaissances sur le métabolisme des souches impliquées pour appréhender son déroulement au niveau métabolique.

Ces différentes contraintes ont mis en avant la nécessité de réaliser les analyses sur des échantillons stériles (reproduits en laboratoire), ensemencés de manière contrôlée avec une souche unique dont les capacités d'altération de l'EL sont caractérisées. Ces analyses cinétiques de l'altération ont été réalisées avec deux souches modèles (*Enterococcus faecium* et *Bacillus weihenstephanensis*), sélectionnées pour reproduire les phénomènes d'altération de type 1 et 2. Elles ont pour objectif de confirmer la pertinence des marqueurs potentiels identifiés dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels, et de caractériser les profils d'évolution des composés sous un angle dynamique. Cette caractérisation doit permettre de présenter des hypothèses plus fines quant aux voies métaboliques impliquées dans l'altération microbiologique des EL.

3 Etude cinétique de l'altération de type 2 avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*

3.1 Protocole développé pour l'étude cinétique de l'altération des EL

Les protocoles de culture microbiologique et de préparation des EL stériles sont ceux fournis par le laboratoire STLO présentés dans le chapitre 2 (voir - 2.2.1 et 3). Cette étude cinétique de l'altération des EL est réalisée avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*, sélectionnée pour reproduire l'altération de type 2.

Le planning de lancement ainsi qu'un schéma représentant une journée type d'analyse sont présentés dans l'Annexe N de ce manuscrit.

3.2 Phénotype physico-chimique

3.2.1 Inter-calibration des partenaires

Les résultats des mesures macroscopiques effectuées sur les échantillons au cours de l'étude cinétique de l'altération ont été comparés avec les résultats obtenus par les partenaires du projet.

3.2.1.1 *pH et colorimétrie*

Les données brutes récoltées auprès des différents partenaires, présentant des variations d'ordonnée à l'origine potentiellement dues à une différence de pH de la matière première ou à une différence de calibration des instruments et des procédures de mesure, ont été normalisées par centrage. La valeur de pH a été considérée comme identique à celles mesurées pour le témoin à $t = 0h$ pour l'ensemble des distributions. La correction appliquée a été reproduite pour l'ensemble des temps d'analyse. Les valeurs de correction appliquées à chacune des distributions sont présentées dans le Tableau 64.

Tableau 64. Valeur de correction appliquée aux mesures de pH pour chaque distribution pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche ad 2528.

	Témoin négatif	Gepea	STLO	ADRIA
Valeur à $t = 0h$	7,45	7,45	7,52	7,93
Valeur à soustraire	0,00	0,00	0,06	0,48

La zone d'analyse présentée pour les échantillons du GEPEA est limitée (de 0h à 240h) car un biais expérimental non expliqué (augmentation subite du pH) a été observé après 269h. La Figure 65 résume les résultats de pH enregistrés à chaque temps d'analyse au cours de l'altération par la souche *Bacillus weihenstephanensis* par les différents partenaires du projet.

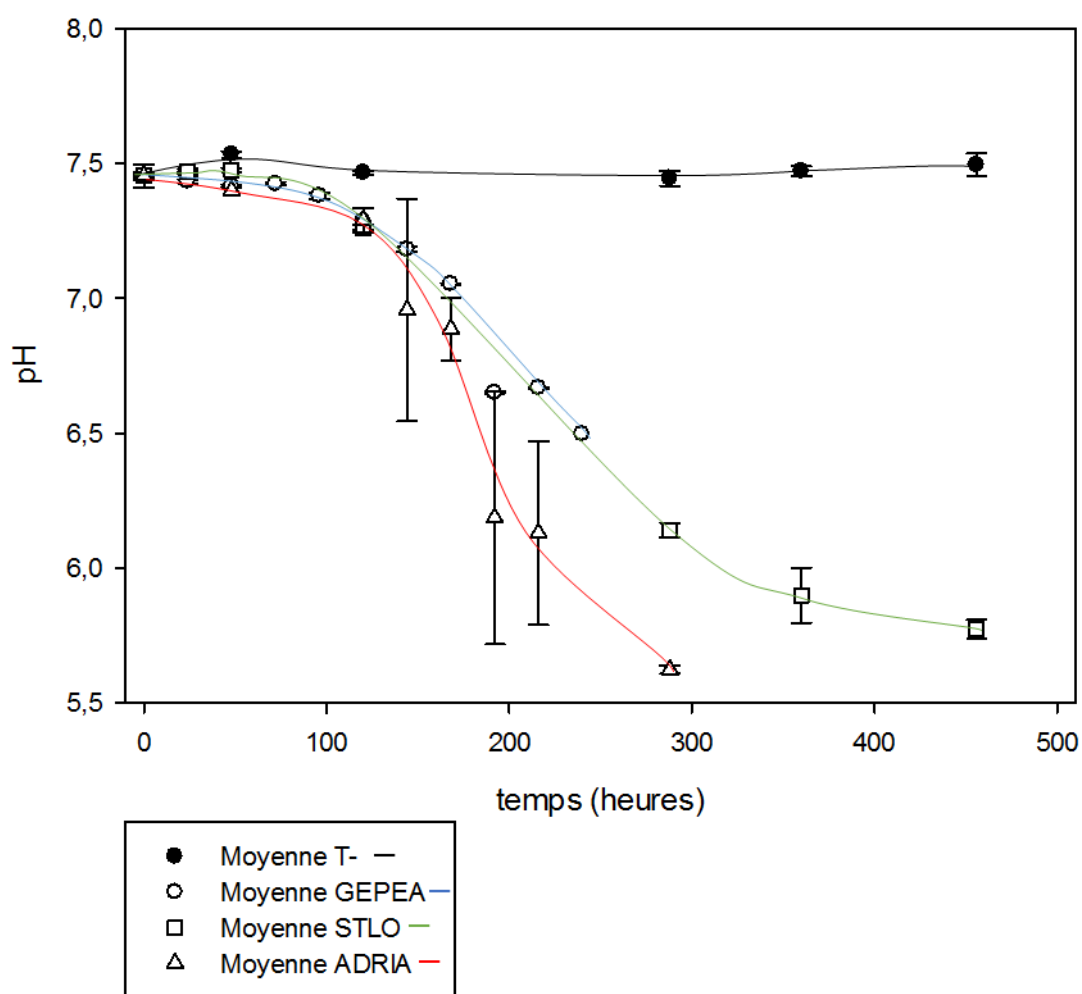


Figure 65. Valeurs de pH (normalisées) enregistrées pour les différents temps d'analyse au cours de l'altération à 8°C par la souche *Bacillus weihenstephanensis* par chacun des partenaires.

Les trois distributions présentent une évolution très proche avec un début de chute de pH situé aux alentours de 72h. On observe une chute de pH d'intensité similaire pour l'ensemble des échantillons d'environ 0,25 unités au temps 144h par rapport au témoin. Les distributions présentent ensuite un écart d'environ 0,25 unités de pH pour les échantillons de la société ADRIA d'une part et ceux des laboratoires GEPEA et STLO d'autre part aux points d'analyse 144h et 168h. Cet écart augmente jusqu'à atteindre 0,5 unité de pH aux points d'analyse 192h et 216h. Le suivi cinétique s'arrête au temps d'analyse 240h pour le GEPEA, un écart de 0,5 unité de pH est toujours visible entre les résultats de la société ADRIA et ceux du laboratoire STLO au point d'analyse 288h. Les valeurs de pH se stabilisent pour ces deux distributions aux alentours de 5,7 (5,76 pour le laboratoire STLO et 5,62 pour la société ADRIA) contre environ 7,5 pour les témoins. Cette valeur finale est atteinte au temps d'analyse 288h pour la société ADRIA et 460h pour le laboratoire STLO. La différence de pH entre les témoins et les échantillons pour le laboratoire GEPEA est considérée comme significative dès le temps d'analyse 48h (diminution de 0,04 unités de pH, correspondant au seuil de significativité fixé

au cours des développements méthodologiques (voir chapitre 3 - 2.3), cependant cette diminution est suivie d'une augmentation de faible intensité. La chute de pH n'est réellement détectable qu'à partir du point d'analyse 120h.

Malgré des écart observés allant jusqu'à 0,5 unité de pH, les distributions présentent une évolution très similaire en terme de début de chute de pH, de pente, et de point final de pH, permettant de confirmer que le phénomène d'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis* est relativement bien reproduit entre les différentes équipes du projet.

Les résultats de colorimétrie sont présentés dans l'Annexe O de ce manuscrit.

3.2.1.2 Conclusion

La cohérence observée dans les résultats des analyses macroscopiques effectuées sur les échantillons d'EL au cours de la cinétique permet de confirmer la pertinence de l'intégration des données complémentaires correspondant aux analyses réalisées par les partenaires dans le jeu de données étudié.

La mesure du pH étant le plus robuste des indicateurs macroscopiques employés, les résultats de mesure du pH au cours de l'altération ont été utilisés pour sélectionner les points d'intérêt pour l'analyse des profils métaboliques par GC-MS. Six points d'analyses correspondant à différents stades de l'altération visualisés à travers la chute de pH ont été sélectionnés (24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h) afin de permettre un profilage des échantillons en début, milieu et fin d'altération. Ces points d'analyse correspondent également à des échantillons présentant des profils contrastés en termes de mesure colorimétrique.

3.2.1 Résultats des analyses complémentaires réalisées par les partenaires du consortium ALTOVOP

Les résultats de croissance, de caractérisation des activités enzymatiques, et d'analyse des propriétés fonctionnelles au cours de la cinétique d'altération, sont présentés dans ce qui suit.

3.2.1.1 Croissance

La Figure 66 présente les résultats de croissance de la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à $3 \log \text{UFC.ml}^{-1}$ dans l'EL. Les dénombrements effectués par les équipes des laboratoires STLO et LUBEM et de la société ADRIA sont présentés.

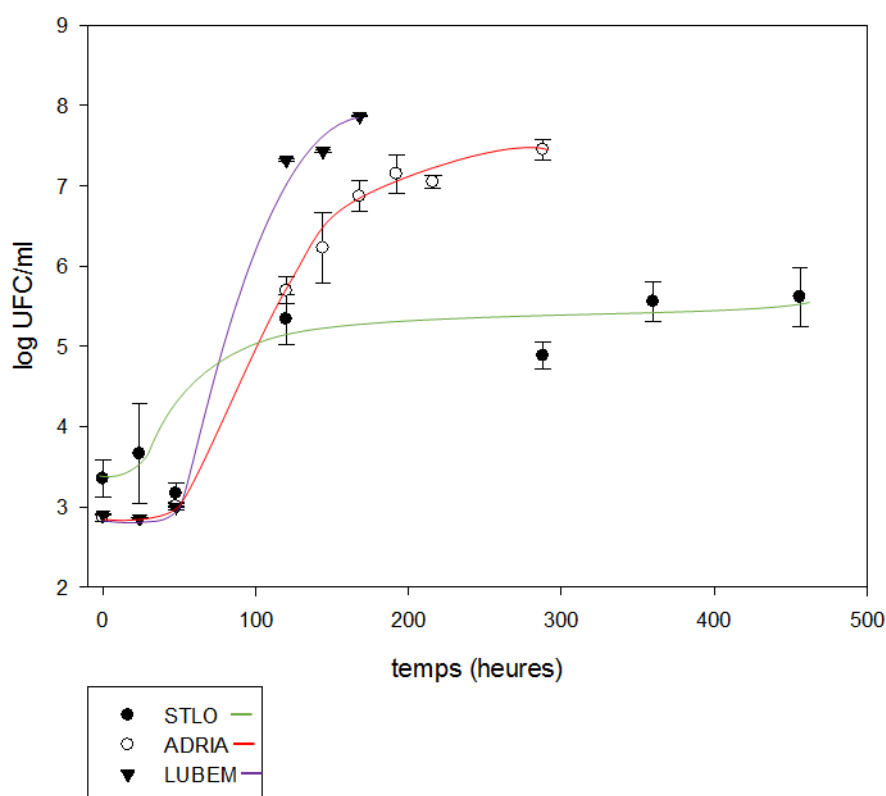


Figure 66. Résultats de croissance de la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à 3 log UFC.ml⁻¹ dans l'EL à 8°C

Une différence significative est observable entre les résultats obtenus par la société ADRIA et le laboratoire LUBEM d'une part et par le laboratoire STLO d'autre part. L'augmentation plus rapide du nombre d'UFC.ml⁻¹ et la concentration maximale plus élevée (7,56 log UFC.ml⁻¹ contre 5,66 log UFC.ml⁻¹) mesurée par la société ADRIA pourrait expliquer la chute plus rapide et plus prononcée mesurée sur le pH et les variations d'intensité plus importantes mesurées en colorimétrie par ce partenaire. La différence observée dans les résultats de croissance pourrait être expliquée par des différences d'état physiologique des souches à l'inoculation, ou par des différences mineures des procédures d'inoculation, d'incubation et de suivi.

3.2.1.2 Activité enzymatiques

La Figure 67 présente les résultats de caractérisation des activités enzymatiques de la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à 3 log UFC.ml⁻¹ en milieu inducteur. Les analyses sont réalisées par le laboratoire LUBEM.

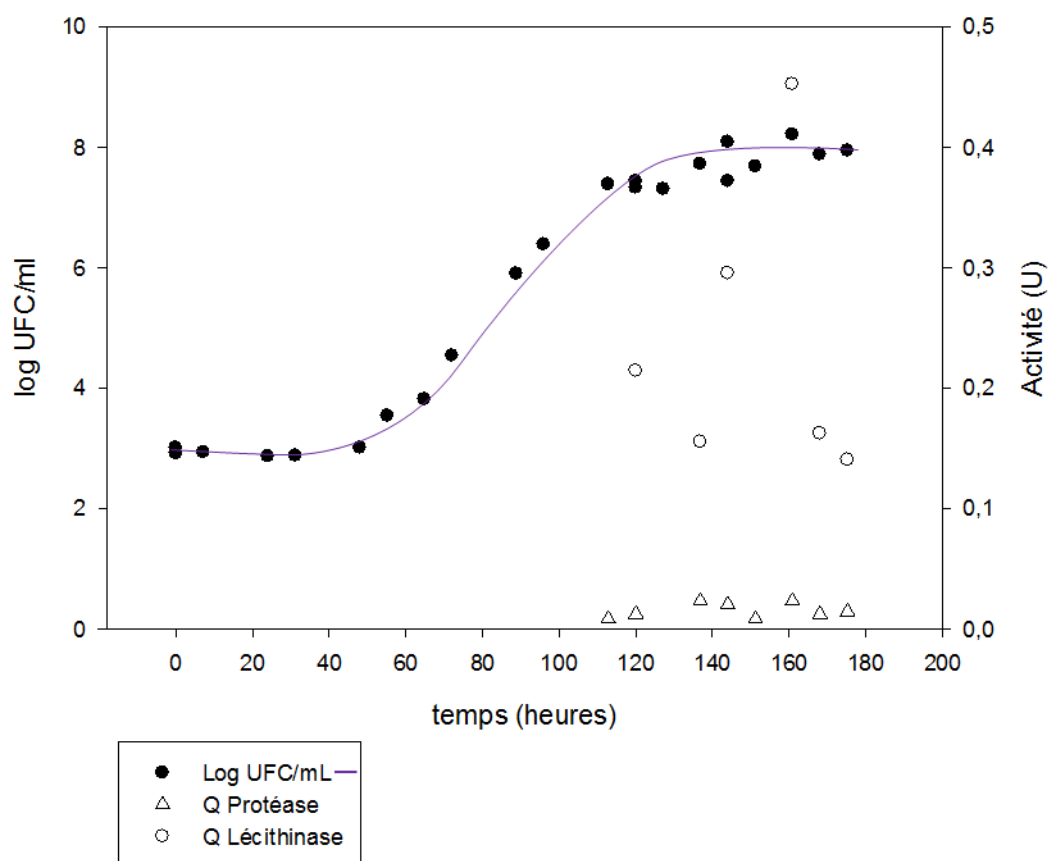


Figure 67. Résultats de caractérisation des activités enzymatiques de la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à 3 log UFC.ml⁻¹ en milieu inducteur.

Les activités des lécithinases sont clairement identifiables à partir du temps d'analyse 112h, la valeur maximum d'activité est atteinte au temps d'analyse 162 avec une valeur de 0,46 unités. L'activité des protéases est, elle, détectable à un niveau plus faible (entre 0,01 et 0,023) à partir du temps d'analyse 120h avec un maximum d'activité de 0,024 unités au temps d'analyse 160h. L'intensité des activités enzymatiques augmente et diminue sans suivre de tendance précise au cours de la fenêtre pendant laquelle elles sont détectables, plutôt tardivement vers les temps 112h à 175h pour les protéases et de 120h à 175h pour les lécithinases.

3.2.1.3 Propriétés fonctionnelles

La Figure 68 présente les résultats de caractérisation des propriétés de gélification de l'EL au cours de l'altération par la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à 3 log UFC.ml⁻¹ à 8°C.

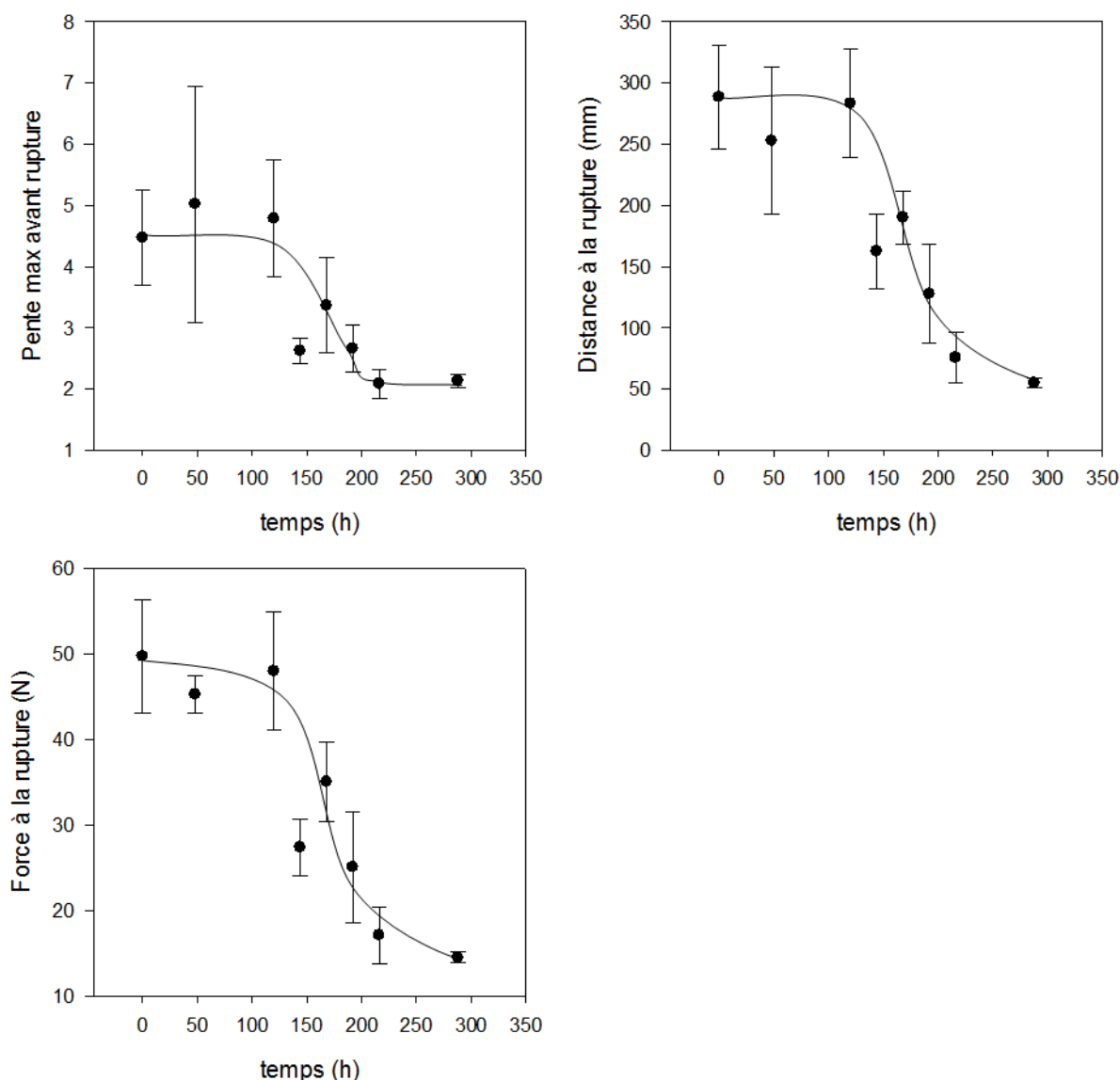


Figure 68. Résultats de caractérisation des propriétés de gélification de l'EL au cours de l'altération par la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à 3 log UFC.ml⁻¹ à 8°C.

L'altération de type 2 impacte clairement les propriétés de gélification des EL. Les indicateurs, pente max avant rupture, distance à la rupture et force à la rupture présentent tous une cinétique d'évolution comparable. Les trois premiers temps d'analyse (14h, 48h et 120h) forment un plateau au-delà duquel commence une chute des valeurs. Le temps d'analyse 144h présente des valeurs particulièrement faibles avant de remonter pour suivre la pente moyenne jusqu'à tendre vers un plateau sur les deux derniers points d'analyse. Les valeurs les plus faibles sont enregistrées au temps d'analyse 288h pour la distance à la rupture et la force à la rupture avec des valeurs respectives de 54,89 mm et 14,55 N. La valeur de pente maximum avant rupture la plus faible est enregistrée pour le temps d'analyse 216h avec une valeur de 2,08%. Tous les indicateurs tendent à montrer que la résistance du gel formé est de plus en plus faible au cours de l'altération. Cette observation est cohérente avec celles réalisées sur l'échantillon industriel altéré de type 2. L'altération de type 2

impliquerait donc une dégradation des propriétés de gélification de l'EL. Cette dégradation serait significative relativement tardivement dans le processus d'altération, à partir de 144h.

La Figure 69 présente les résultats de caractérisation des propriétés émulsifiantes de l'EL au cours de l'altération par la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à $3 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ à 8°C .

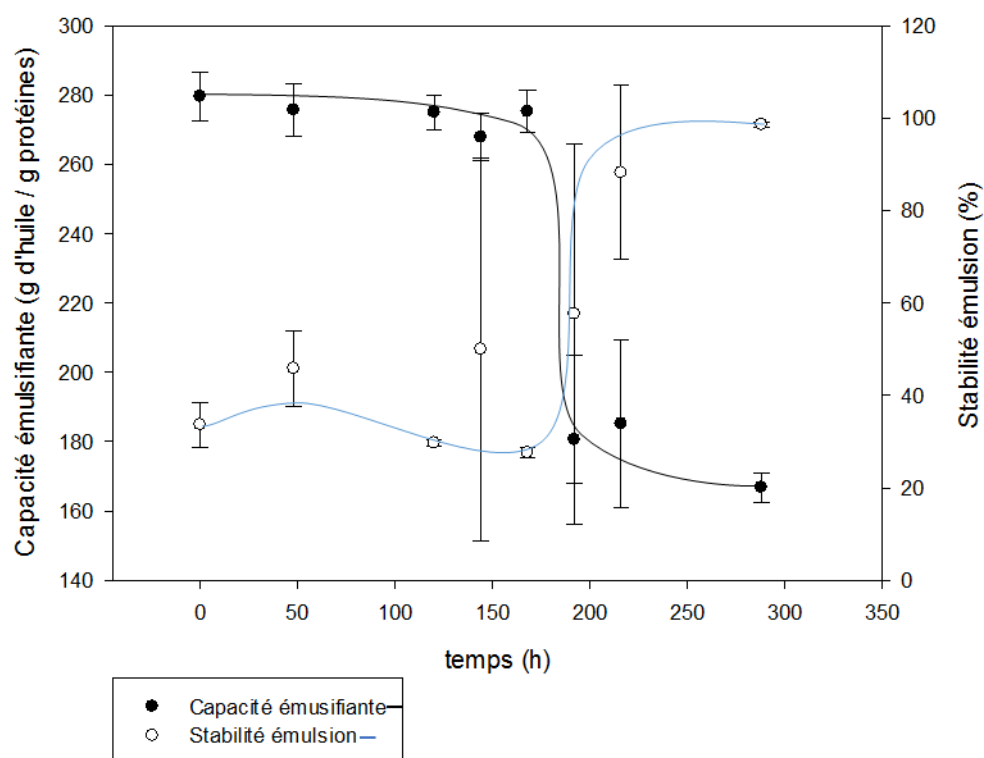


Figure 69. Résultats de caractérisation des capacités émulsifiantes de l'EL au cours de l'altération par la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à $3 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ à 8°C .

Tout comme pour les propriétés de gélification, les capacités émulsifiantes de l'EL semblent clairement impactées par l'altération de type 2. Les valeurs de capacité émulsifiante mesurées forment un plateau des temps d'analyse 0 à 168h. Une chute importante des valeurs (d'environ 30%) est constatée au temps d'analyse 192h. Cette valeur augmente légèrement (de façon non significative) au temps d'analyse 216h et atteint son point le plus bas au temps d'analyse 288h avec une valeur de 166,80 g d'huile/g protéines. La stabilité des émulsions présente également un plateau des temps d'analyse 0 à 120h (variations inférieures à 10%). Les mesures présentent alors une augmentation importante de la stabilité (à l'exception du temps d'analyse 168h). Une variabilité très importante est également mesurée pour les temps d'analyse 144h, 192h et 216h.

L'altération de type 2 présente donc un impact négatif sur les capacités émulsifiantes de l'EL à partir du temps d'analyse 192h. La stabilité des émulsions tendrait quant à elle à augmenter tout en présentant une variabilité importante en fin de cinétique. Ces observations sont contradictoires avec

celles effectuées sur l'échantillon industriel altéré de type 2. Il est possible que la présence d'autres souches altérantes ait provoqué un impact différent sur les propriétés fonctionnelles de l'EL pour l'échantillon industriel.

La Figure 70 présente les résultats de caractérisation des propriétés moussantes de l'EL au cours de l'altération par la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à $3 \log \text{UFC.ml}^{-1}$ à 8°C .

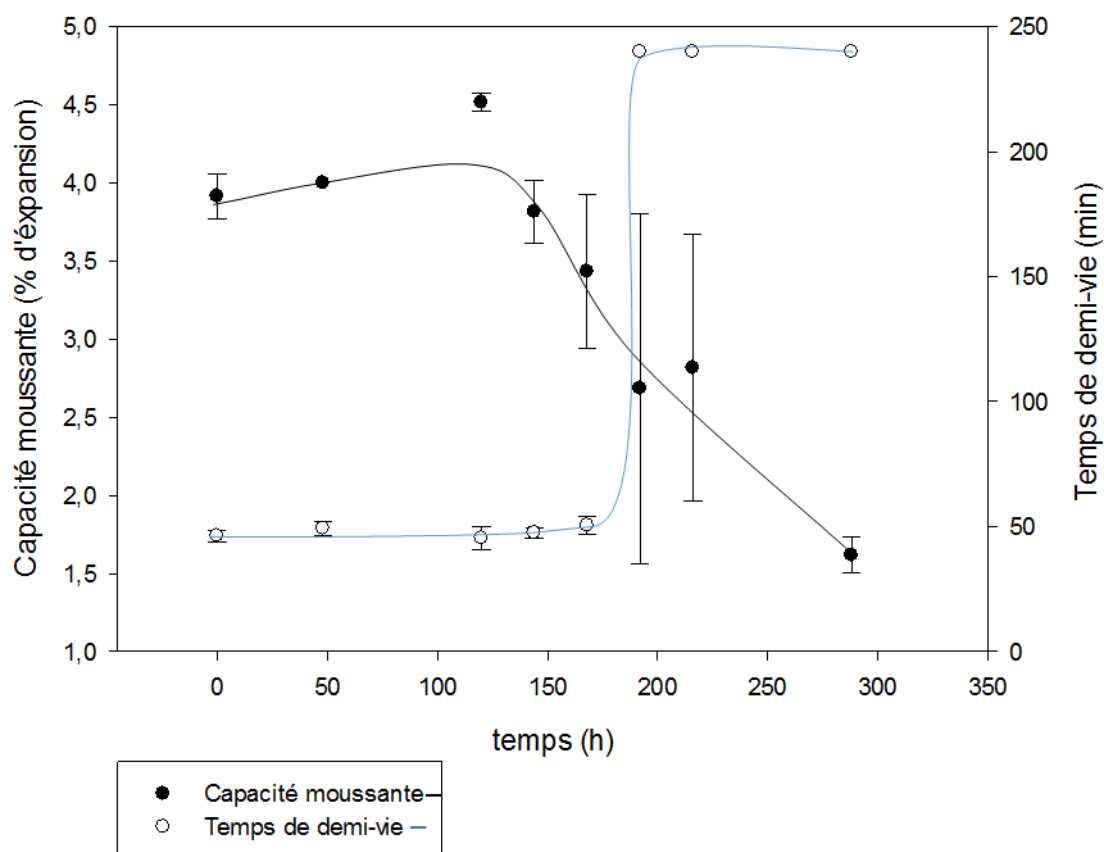


Figure 70. Résultats de caractérisation des propriétés moussantes de l'EL au cours de l'altération par la souche *Bacillus weihenstephanensis* inoculée à $3 \log \text{UFC.ml}^{-1}$ à 8°C .

Les mesures de propriétés moussantes montrent qu'une légère augmentation a lieu au début de l'altération (temps d'analyses 0h, 48h et 120h) pour atteindre un maximum à 120h avec une valeur de 4,52 % d'expansion. Les valeurs diminuent ensuite au cours du temps pour atteindre un minimum au temps d'analyse 288h avec une valeur de 1,62 %. La variabilité des mesures augmente en même temps que la propriété moussante diminue au cours de la cinétique jusqu'au temps d'analyse 216h. La stabilité de la mousse (temps de demi-vie) n'est pas affectée par l'altération jusqu'au temps d'analyse 192h où elle est fortement augmentée (environ 200%).

L'altération de type 2 présente un impact significatif sur les propriétés moussantes des EL. Ces dernières seraient tout d'abord légèrement augmentées jusqu'au temps d'analyse 120h, puis

chuteraient jusqu'à la fin de l'altération. La stabilité de la mousse serait, quant à elle, fortement augmentée par l'altération au-delà du temps d'analyse 192h uniquement. Ces observations sont, comme pour les propriétés émulsifiantes, contradictoires avec celles effectuées sur l'échantillon industriel altéré de type 2. Il est possible que la présence d'autres souches altérantes ait impliqué un impact différent sur les propriétés fonctionnelles de l'EL pour l'échantillon industriel.

3.2.1.4 Conclusion

L'approche de caractérisation macroscopique employée a ainsi permis de mettre en évidence des différences de profils physico-chimiques (pH, colorimétrie, microbiologie, propriétés fonctionnelles) entre les différents temps d'analyse de la cinétique. Ces modifications physico-chimiques seraient le reflet de la modification de la composition chimique de l'échantillon en partie provoquée par le développement bactérien. Dans la suite de cette partie, seront présentées les analyses chimiques réalisées pour investiguer ces différentes modifications et les mécanismes potentiels associés.

3.3 Phénotype chimique

Les échantillons dilués d'EL ont été profilés par IRTF à chaque temps d'analyse de la cinétique selon le protocole développé dans le cadre de ces travaux (voir chapitre 3 - 3.2). L'objectif de ce profilage était de caractériser les grands groupes de molécules (protéines, lipides, sucres) présents dans les échantillons et de suivre leur évolution au cours de l'altération. Il apparaît clairement dans ces résultats qu'aucune différence significative n'est détectable entre les échantillons de début et de fin d'altération, ces résultats sont présentés dans l'Annexe P de ce manuscrit.

3.4 Métabotype

3.4.1 Prise d'empreinte métabolique

3.4.1.1 *Protocole de prise d'empreinte métabolique et de traitement des données*

Les échantillons sont traités selon le protocole présenté dans la partie 3.1. Les données sont analysées selon le protocole de traitement des données présenté dans le chapitre 3 (voir - Protocole complet de traitement des données brutes extraites des empreintes métaboliques).

Les paramètres filtration MCF et MCS employés pour limiter la contribution des signaux indésirables dans le chapitre précédent (voir chapitre 3 - 3.4.1) n'est pas pertinente dans le cas des études cinétiques de l'altération. En effet, dans le cadre de ces études, les échantillons de différentes conditions (échantillons, témoins, différents temps d'incubation) sont analysés simultanément. De plus

le nombre d'échantillons impliqués dans la même analyse est élevé (3 répliques par jour et par condition pour une fraction métabolique donnée, 60 échantillons pour une analyse de 10 jours). Dans l'exemple cité précédemment (analyse de 10 jours), l'application du paramètre MCF 0,5 (ou MCS 30) reviendrait à ne conserver que les signaux présents dans la moitié des échantillons, excluant donc de ce fait un nombre potentiellement important de signaux d'intérêt pouvant n'apparaître que tardivement ou présenter un comportement d'intermédiaire métabolique (apparition – disparition). Il a donc été nécessaire de filtrer les échantillons manuellement, de manière à reproduire l'amélioration de signaux constatée lors de l'utilisation du paramètre de filtration MCF 0,5 au cours du traitement des résultats de l'analyse de variabilité interne des échantillons. Les analyses étant réalisées sur 3 répliques par condition, l'application d'une filtration avec un paramètre MCF 0,5 implique que seuls les signaux présents dans 2 (1,5) des 3 répliques de chaque condition soient conservés. Les données sont ensuite normalisées par l'intensité de l'étalon interne (ribitol) afin de s'affranchir de la variabilité liée à l'injection et au système analytique. Une deuxième étape de filtration ayant pour objectif de supprimer les signaux minoritaires a été ensuite réalisée. Seuls les signaux présentant une intensité supérieure à 1% de celle de l'étalon interne (intensité relative supérieure à 0,01) ont été conservés. La filtration du bruit de fond a été réalisée comme présenté dans l'Annexe Q de ce manuscrit.

3.4.1.2 *Visualisation des résultats – échantillons seuls et témoins seuls*

Pour l'ensemble des représentations graphiques, une transformation log et une mise à l'échelle de Pareto (centrées sur la moyenne et divisées par la racine carrée de l'écart type de chaque variable) a été appliquée afin de mieux refléter l'impact réel de chaque variable (signaux).

La représentation des résultats sous forme d'analyse en composantes principales (ACP) a été employée pour permettre une première visualisation de la séparation des différentes conditions analysées (témoins / échantillons, temps d'analyse). L'outil d'extraction des données spectrales employé dans le cadre de l'analyse via la plateforme W4M (voir chapitre 3 - Protocole complet de traitement des données brutes extraites des empreintes métaboliques) ne permettant l'analyse simultanée que de 55 échantillons, les données ont tout d'abord été analysées en deux étapes. Une première analyse portait sur les échantillons altérés seuls aux temps d'analyses 0h à 240h, permettant ainsi de visualiser la dispersion des données (reflétant un contraste au niveau de l'empreinte métabolique enregistrée) correspondant aux différents temps d'analyse. Les groupes d'échantillons correspondant aux différents temps d'analyse présentaient, pour l'ensemble des fractions, des recouvrements pour certains mais également des contrastes importants entre eux, particulièrement pour les échantillons correspondant à la fin de la plage d'étude sélectionnée. Une deuxième portait sur les témoins seuls aux mêmes temps d'analyse, permettant ainsi de mettre en perspective les résultats précédents en observant la séparation des données correspondant à un échantillon non altéré. Ces échantillons sains présentaient un contraste plus faible que les échantillons altérés. De plus, aucune

ligne temporelle n'apparaît clairement sur les représentations graphiques, pas même pour les échantillons correspondant à la fin de la plage d'étude sélectionnée. Les résultats d'ACP sur ces données (échantillons seuls et témoins seuls) sont présentés dans l'Annexe R, et permettent de mettre en évidence une plus grande disparité des profils chimiques entre les différents groupes d'échantillons altérés qu'entre les différents groupes de témoins.

3.4.1.3 Visualisation des résultats - analyse simultanée des échantillons et des témoins

- Sélection des points d'analyse

Une autre analyse portant à la fois sur les échantillons et les témoins à différents temps d'analyse sélectionnés a été ensuite réalisée afin de quantifier l'évolution de l'abondance des signaux correspondant aux composés détectés à la fois dans les échantillons sains (témoins) et altérés. Pour cette dernière étape, six temps d'analyse correspondant au début (24h, 48h), au milieu (120h, 144h) et à la fin (216h, 240h) de la cinétique d'altération ont été sélectionnés (Figure 71).

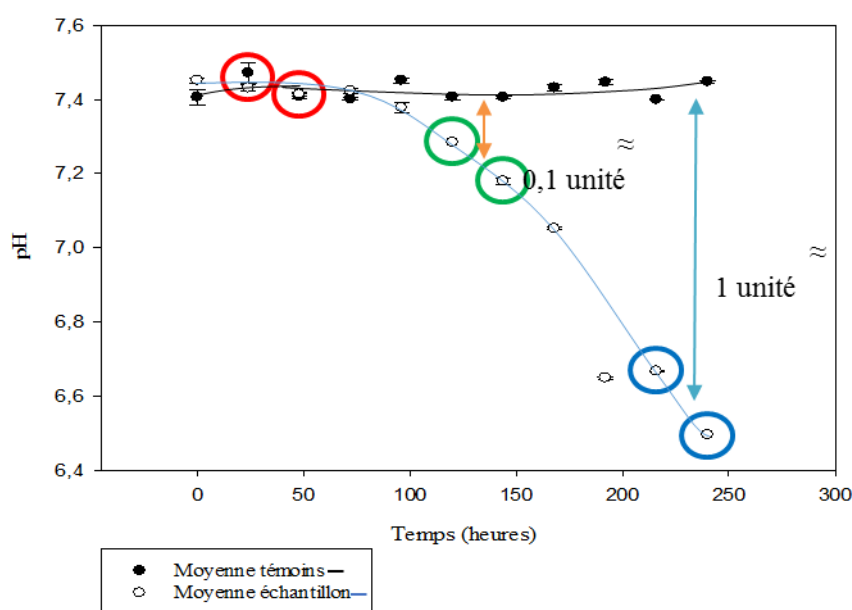


Figure 71. Résultats de suivi du pH au cours de la cinétique d'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis* pour la plage d'analyse sélectionnée. Les points correspondant au début de la cinétique (24h et 48h) sont entourés en rouge, ceux correspondant au milieu de la cinétique (120h et 144h) en vert et ceux correspondant à la fin de la cinétique (216h et 240h) en bleu.

Le point correspondant au début de la cinétique d'altération (24h, 48h) a été défini de manière à ce que le pH mesuré sur ces échantillons ne présente pas de variation significative par rapport à celui mesuré sur les témoins au même temps d'analyse. Les deux autres points définis correspondent au niveau du suivi du pH à une chute d'environ 0,1 unité entre les mesures effectuées sur les échantillons du milieu de la cinétique d'altération (120h, 144h) et celles effectuées sur les témoins, et une chute de

1 unité entre les mesures effectuées sur les échantillons de la fin de la cinétique d'altération (216h, 240h) et celles effectuées sur les témoins.

- Filtration des répliques aberrants

Dans le but d'affiner l'analyse, la détection des échantillons aberrants a été réalisée visuellement sur les données à l'aide des résultats d'ACP ainsi qu'à l'aide du module Quality metrics de la plateforme W4M. Cet outil permet de déterminer la p-value d'un test T2 de Hotelling (correspondant à une généralisation du test t de Student pour une application à plus de deux échantillons). Une valeur de p-value basse sur ce test signifiant que l'échantillon présente un comportement extrême, les échantillons présentant un score de Hotelling p-value inférieur à 0,05 (limite fixée empiriquement pour l'élimination des répliques aberrants identifiés visuellement) seront éliminés.

La liste par fraction des répliques éliminées pour les données correspondant aux groupes contenant à la fois les échantillons et les témoins pour des temps d'analyse sélectionnés (24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h) de la cinétique est présentée dans le Tableau 65.

Pol_Eth	Pol_Ace	Apo_Eth	Apo_Ace
E48_3		T24_2	
		T24_3	

Tableau 65. Liste des répliques aberrants par fraction pour les données correspondant aux groupes contenant à la fois les échantillons et les témoins pour des temps d'analyse sélectionnés (24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h) au cours de l'altération par la souche *B. weihenstephanensis*.

Les résultats des ACP sur les données des différentes fractions pour l'analyse des échantillons et des témoins aux temps d'analyse sélectionnés (après élimination des répliques aberrants) sont présentés dans l'Annexe S. La suite de l'analyse portera sur les données correspondant aux groupes contenant à la fois les échantillons et les témoins pour des temps d'analyse sélectionnés (24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h) de la cinétique.

3.4.1.4 Analyse détaillée des fractions - analyse simultanée des échantillons et des témoins aux temps d'analyses regroupés début, milieu et fin

Une première analyse des données (présentée dans les Annexe T et Annexe U) a permis de confirmer la pertinence d'étudier les données sous forme de points d'analyse regroupés début, milieu et fin. Une analyse détaillée des échantillons et des témoins a donc été réalisée pour chaque fraction pour les temps d'analyse regroupés 24h et 48h, 120h et 144h, 216h et 240h. Les données de la fraction polaire acétone sont présentées ici à titre d'exemple. Les résultats d'analyse des autres fractions sont présentés dans l'Annexe V.

La Figure 72 présente les résultats de l'ACP et de la PLS-DA effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération.

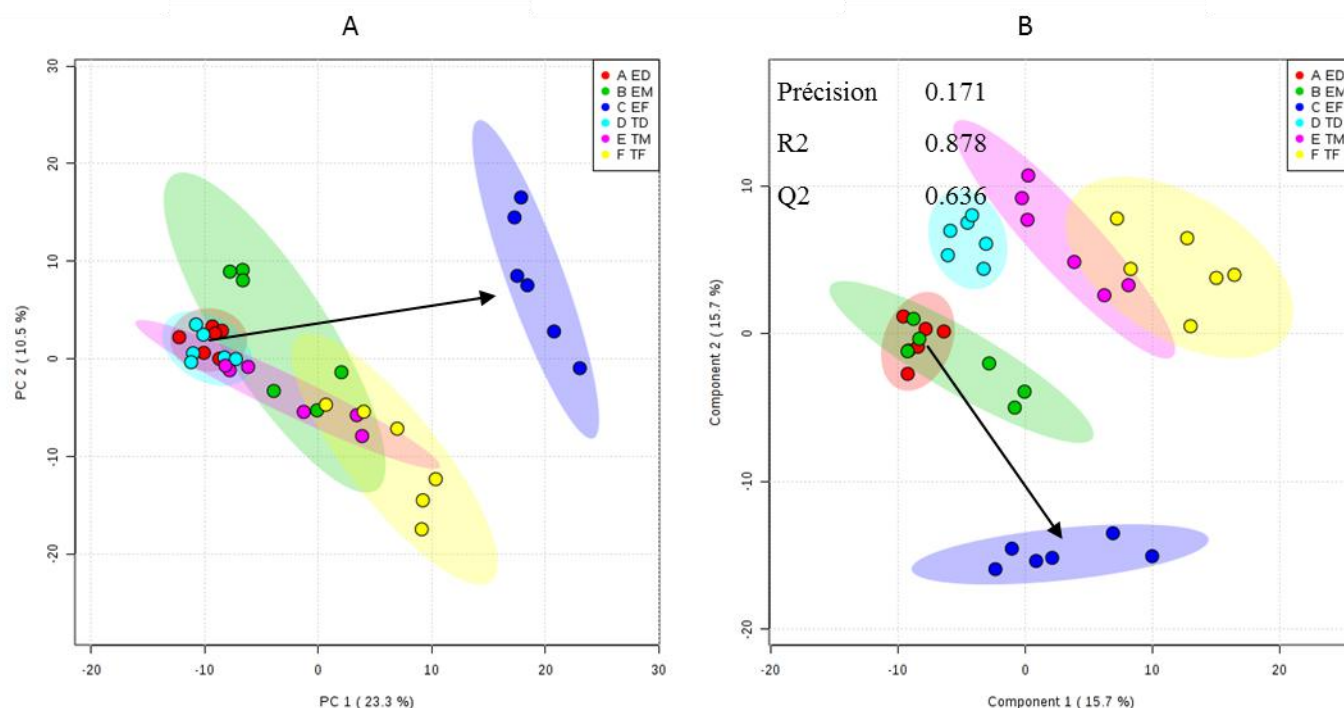


Figure 72. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération (ED : Echantillons Début, EM : Echantillon Milieu, EF : Echantillon Fin, TD : Témoin Début, TM : Témoin Milieu, TF : Témoin Fin).

L'ACP permet de mettre en évidence un effet cinétique plus marqué pour les échantillons que pour les témoins comme constaté précédemment. On peut noter cependant un recouvrement des ellipses pour les groupes début et milieu de cinétique, le groupe fin de cinétique est très bien séparé des autres selon la première composante représentant 23,3% de la variance mesurée. La PLS-DA ne permet pas d'améliorer la séparation des groupes, on observe même des recouvrements plus importants que pour l'ACP. Les données ont ensuite été soumises à une classification hiérarchique ascendante (HC). La Figure 73 présente les résultats de cette analyse (dendrogramme) pour la fraction polaire acétone aux temps d'analyse regroupés 24h et 48h, 120h et 144h, 216h et 240h.

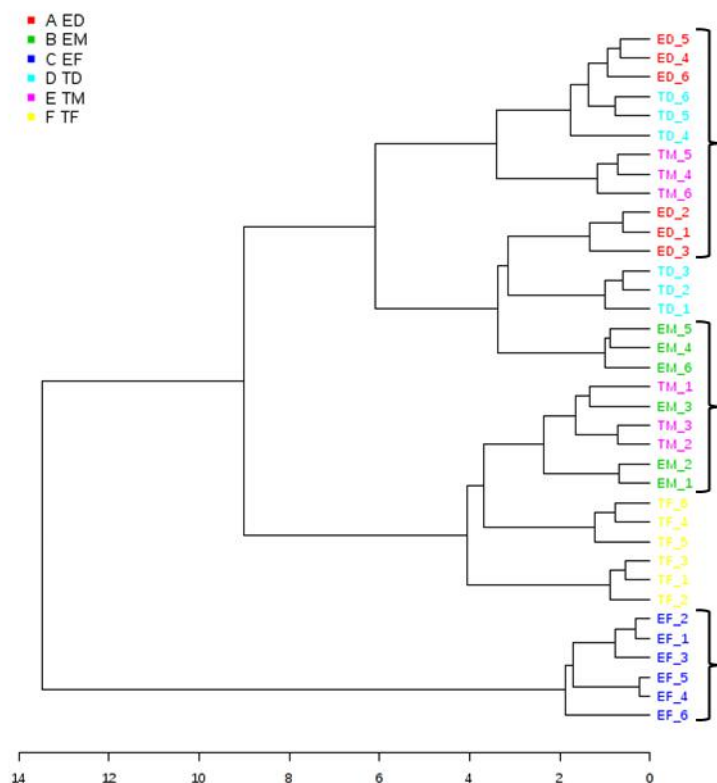


Figure 73. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

La classification relativement bonne des échantillons selon les groupes début, milieu et la très bonne séparation du groupe fin de cinétique confirment les observations précédentes. Ils permettent de valider l'approche de regroupement des points d'analyse et de mettre en avant le contraste entre les différents points sélectionnés.

Les observations précédentes ont permis de mettre en évidence le contraste entre les échantillons aux différents points d'analyses. Afin de mieux identifier l'origine des différences entre les profils chimiques, les données ont été analysées selon une approche de double clustering hiérarchique. La Figure 74 représente la carte de chaleur obtenue pour la fraction polaire acétone. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés.

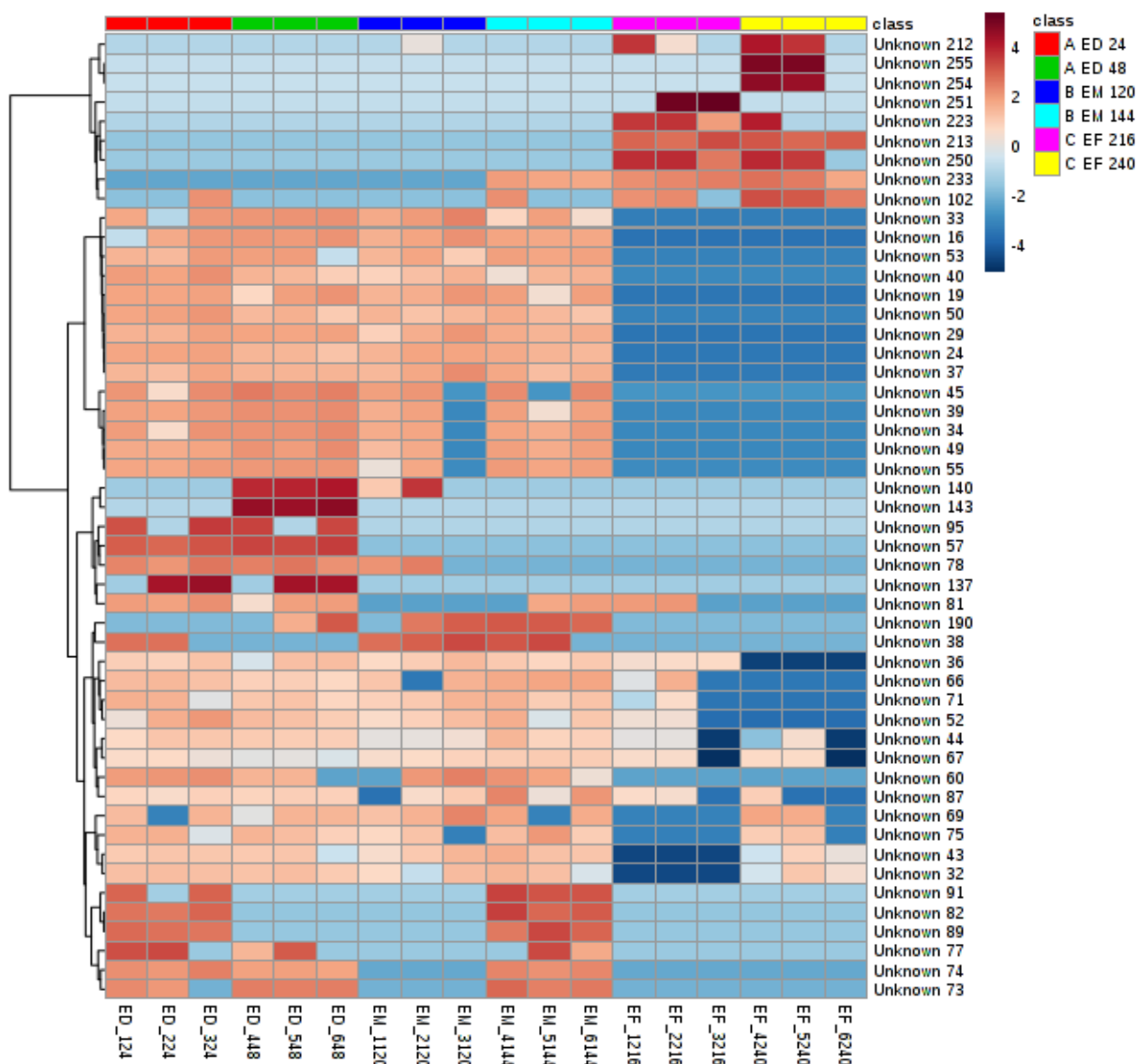


Figure 74. Carte de chaleur obtenue sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés.

Cette analyse permet de confirmer la présence de composés qui peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels de l'altération.

Les autres fractions étudiées et présentées dans l'Annexe V présentent des résultats proches de la fraction polaire acétone présentée ici. On notera que la fraction polaire éthanol présente les recouvrements les plus importants entre les groupes d'échantillons et que la fraction apolaire éthanol présente la meilleure séparation des groupes d'échantillons. Pour l'ensemble de ces fractions, l'analyse des cartes de chaleur permet la détection de composés ou groupes de composés dont l'intensité est caractéristique des différents groupes d'échantillons. L'analyse des Fold Change présentée dans la

partie suivante a été employée pour identifier les signaux responsables de la discrimination observée entre ces groupes d'échantillons.

3.4.1.5 Calcul des Fold Change

Les Fold Change ont été calculés pour l'ensemble des signaux retenus après filtration des données dans le but d'identifier les composés présentant une différence significative d'intensité entre les différents échantillons. Ici on considérera l'échantillon altéré comme l'état final et le témoin comme l'état initial à chaque point d'analyse. Les FC correspondant aux temps d'analyses regroupés début (24h, 48h), milieu (120h, 144h) et fin (216h, 240h) ont été calculés selon le principe résumé sur la Figure 75.

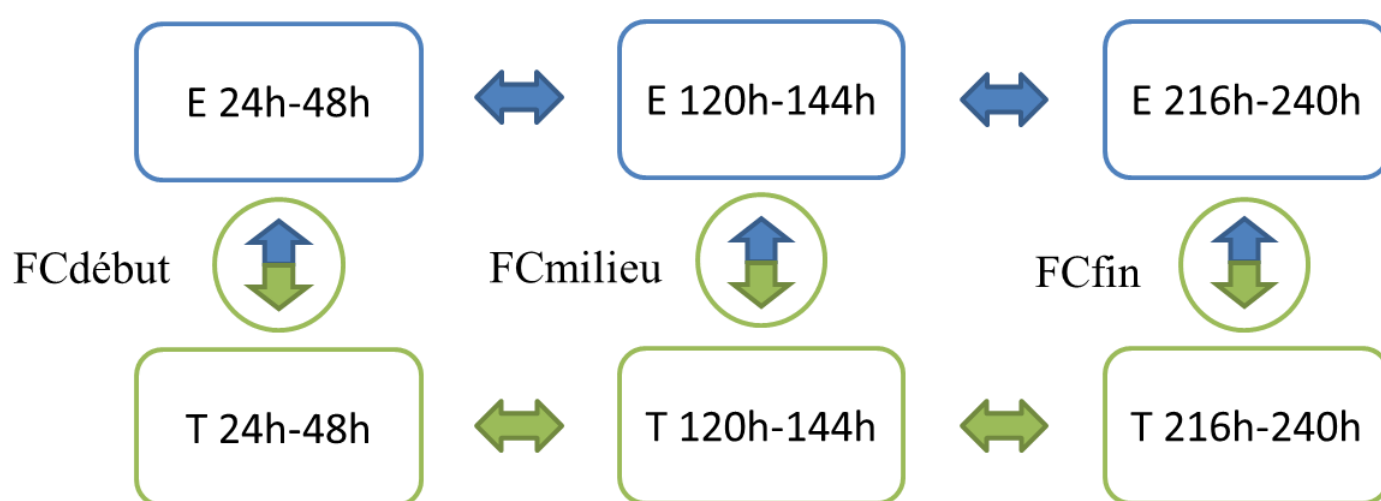


Figure 75. Schéma représentant les FC calculés pour l'identification des signaux d'intérêt

Les signaux ont ensuite été filtrés de manière à ne conserver que ceux présentant une variation significative au cours de l'altération et ceux présentant une cinétique d'évolution monotone sur les trois points d'analyse (début, milieu et fin). Ainsi les signaux présentant une intensité croissante ou décroissante sur les trois points d'analyse réalisés au cours de l'altération et ceux présentant un $FC > 1$ (variation d'intensité de plus de 100% entre deux points) ont été retenus.

A l'issue de ce processus, 86 marqueurs potentiels ont été identifiés dans l'ensemble des fractions. Le nombre de composés retenus pour chaque fraction est présenté dans le Tableau 66.

Polaire éthanol	Polaire acétone	Apolaire éthanol	Apolaire acétone
27	37	12	10

Tableau 66. Nombre de composés retenus pour chaque fraction

Une fois ces signaux filtrés, un processus d'identification dans deux bases de données distinctes (Golm Metabolome Database ou GMD et NIST08) a été réalisé, comme décrit dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels (voir - 2.3.1.2). Comme précédemment, les composés ont été annotés selon trois niveaux distincts (Identification, Annotation niveau 1, Annotation niveau 2). Les composés d'intérêts ou marqueurs potentiels identifiés dans chacune des fractions sont présentés dans le Tableau 67.

Tableau 67. Marqueurs potentiels identifiés dans chacune des fractions pour l'étude de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis*. Les différents niveaux d'identifications sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1 et orange pour ceux annotés au niveau 2).

Polaire Ethanol	Polaire Acétone	Apolaire Ethanol	Apolaire Acétone
Augmentation			
Acide lactique	Valine	Glycérol	
Glycérol	Acide lactique	Acide lactique	
Glutamine	Isoleucine	Glucose	
Alanine	Alanine		
Acide phosphorique	Glycérol		
Uracile, 1-méthyl-4-thio-	Acide pyroglutamique		
Tyrosine	Leucine		
	Phénylalanine		
	Tyrosine		
	Urée		
	Acide phosphorique		
Diminution			
Glucose		Glucose	
Acide aspartique			
Fructose			
Autre tendance			
	méthyl α -D-Glucofuranoside	Acide 3,4-Dihydroxybenzoïque	Acide stéarique
		Cholesterol	Glucose
		Acide glutarique	Glucose
			Isoleucine
			Acide palmitique
			Acide lactique
			Acide oleique
			Isoleucine
			Acide phosphorique

En plus des signaux identifiés, différents composés retenus comme potentiellement intéressants n'ont pas pu être annotés. Le nombre de ces composés d'intérêt pour chaque fraction est également présenté dans le Tableau 68.

Polaire éthanol	Polaire acétone	Apolaire éthanol	Apolaire acétone
11	25	5	1

Tableau 68. Nombre de composés d'intérêt non identifiés pour chaque fraction pour l'étude de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis*.

Une analyse détaillée des marqueurs potentiels incluant la répartition des marqueurs potentiels dans les différentes fractions, la quantification relative et absolue de ces marqueurs potentiels est présentée dans l'Annexe W.

3.5 Marqueurs d'altération potentiels identifiés

Les marqueurs potentiels présentant une variation significative au cours de l'altération par la souche *B. weihenstephanensis* ont été sélectionnés. Leur évolution est discutée dans ce qui suit. Les résultats sont également mis en perspective de ceux obtenus pour les échantillons industriels ayant subi également une altération de type 2.

3.5.1 Sélection des marqueurs d'altération

3.5.1.1 Marqueurs présentant une variation significative

Cette partie présente les marqueurs pour lesquels une évolution significative intervient après le point d'analyse 120h.

- *Glutamine / acide glutamique*

Pour la fraction polaire éthanol, le signal présente une augmentation dans l'échantillon par rapport au témoin à partir de 144h avec un FC supérieur à 1 à partir de 216h.

- *Acide phosphorique*

Pour la fraction polaire éthanol, le signal présente une augmentation dans l'échantillon par rapport au témoin à partir de 216h avec un FC supérieur à 1. Pour la fraction polaire acétone le signal diminue dans le témoin et augmente dans l'échantillon à partir du temps 144h avec un FC >1 à partir de 216h. Les intensités détectées dans les deux fractions sont cohérentes.

- *Acide aspartique*

Pour la fraction polaire éthanol le signal présente une diminution significative dans l'échantillon (disparition au temps d'analyse 48h) mais le signal est à nouveau détecté au point 144h (avec un $FC > -1$ et donc une différence non significative entre l'échantillon et le témoin) avant de rechuter.

- *Leucine*

Le signal dans la fraction apolaire acétone présente une augmentation dans l'échantillon par rapport au témoin à partir de 144h avec un $FC > 1$ à partir de 216h. Cette observation est cohérente avec l'augmentation constatée pour le signal de la leucine obtenu par GC-MS dans les échantillons industriels ayant subi une altération de type 2. Cependant la variation est principalement due à une diminution du signal dans le témoin.

- *Valine, isoleucine, phénylalanine et alanine*

Pour la fraction polaire acétone, le signal présente une diminution dans le témoin alors qu'il reste stable dans l'échantillon. Le FC est supérieur à 1 à partir du temps d'analyse 240h pour la valine, l'isoleucine et la phénylalanine et à partir du temps 216h pour l'alanine. Comme précédemment, ces observations sont cohérentes avec le comportement observé pour ces composés dans les échantillons industriels sains et altérés type 2. Pour la valine, cette tendance est également observée pour les résultats de RMN ^1H sur les échantillons industriels.

- *Methyl α -D-Glucofuranoside*

Le signal augmente dans les échantillons de la fraction polaire acétone aux temps d'analyses 120h, 144h et 216h avec un $FC > 1$ au temps d'analyse 144h, puis redescend sous la valeur enregistrée pour le témoin au point 240h. Ce composé pourrait présenter le comportement d'un intermédiaire métabolique.

3.5.1.2 *Marqueurs précoces*

Cette partie présente les marqueurs dont l'évolution intervient au plus tard au point d'analyse 48h.

- *Glucose*

Le signal de la fraction polaire éthanol présente une forte variabilité ainsi qu'un point aberrant pour le point analysé à 216h (témoin). Le signal présente une diminution globale dans l'échantillon par rapport au témoin à partir de 48h avec un FC inférieur à -1 aux points 216h (témoin aberrant) et 240h.

Dans la fraction apolaire éthanol le signal diminue dans l'échantillon à partir de 144h avec un FC inférieur à 1 à partir de 240h. Une diminution de l'intensité dans le témoin aux temps 48h et 120h présentant un FC supérieur à 1 est inexplicable. Un deuxième signal du glucose (autre dérivé TMS), présente une variation d'intensité contradictoire. Il augmente de façon significative dans l'échantillon par rapport au témoin avec un FC supérieur à 1 à partir du temps d'analyse 144h ; ce dernier signal est très minoritaire (intensité relative inférieure à 0,05). Le signal du glucose présente une intensité très importante (proche de la saturation du détecteur) ayant pu impacter la précision de la mesure. Une tendance à la diminution est néanmoins observée dès le début de l'altération (48h). Cette diminution est cohérente avec les résultats observés pour les échantillons industriels altérés de type 2 pour lesquels le glucose n'était plus détectable dans les résultats de GC-MS et de RMN ^1H .

- *Acide lactique*

Le signal de l'acide lactique présente une forte augmentation dans les échantillons par rapport aux témoins dans les fractions polaire éthanol et polaire acétone avec un FC supérieure à 1 à partir de 120h. L'augmentation est détectée dans la fraction polaire éthanol dès le temps d'analyse 48h. Comme précédemment, cette observation est cohérente avec les données obtenues lors de l'étude des échantillons industriels où l'acide lactique présentait un FC > 50 pour l'échantillon altéré type 2 par rapport au témoin en GC-MS et n'était détectable que dans les échantillons altérés en RMN ^1H .

- *Glycérol*

Le signal du glycérol dans la fraction polaire éthanol présente une augmentation détectable dès le point d'analyse 48h. Cette augmentation est inférieure au seuil de significativité fixé (FC > 1) mais reste supérieure à celle mesurée sur les 3 réplicats des échantillons. Dans la fraction polaire acétone, le signal du glycérol augmente de façon significative dans les échantillons par rapport au témoin à partir de 120h avec un FC > 1 à partir de 216h. Enfin dans la fraction apolaire éthanol, il augmente dans les échantillons et diminue légèrement dans le témoin présentant un FC supérieur à 1 à partir de 216h. Ces observations sont cohérentes avec les données obtenues lors de l'analyse des échantillons industriels où un FC > 8 avait été mesuré pour le signal du glycérol entre l'échantillon altéré type 2 et le témoin.

3.6 Conclusion

Différents marqueurs potentiels de l'altération ont pu être mis en évidence à l'issue des analyses réalisées (Figure 76). Pour certains de ces marqueurs, on peut déjà proposer des voies métaboliques d'altération dans lesquels ils pourraient être impliqués.

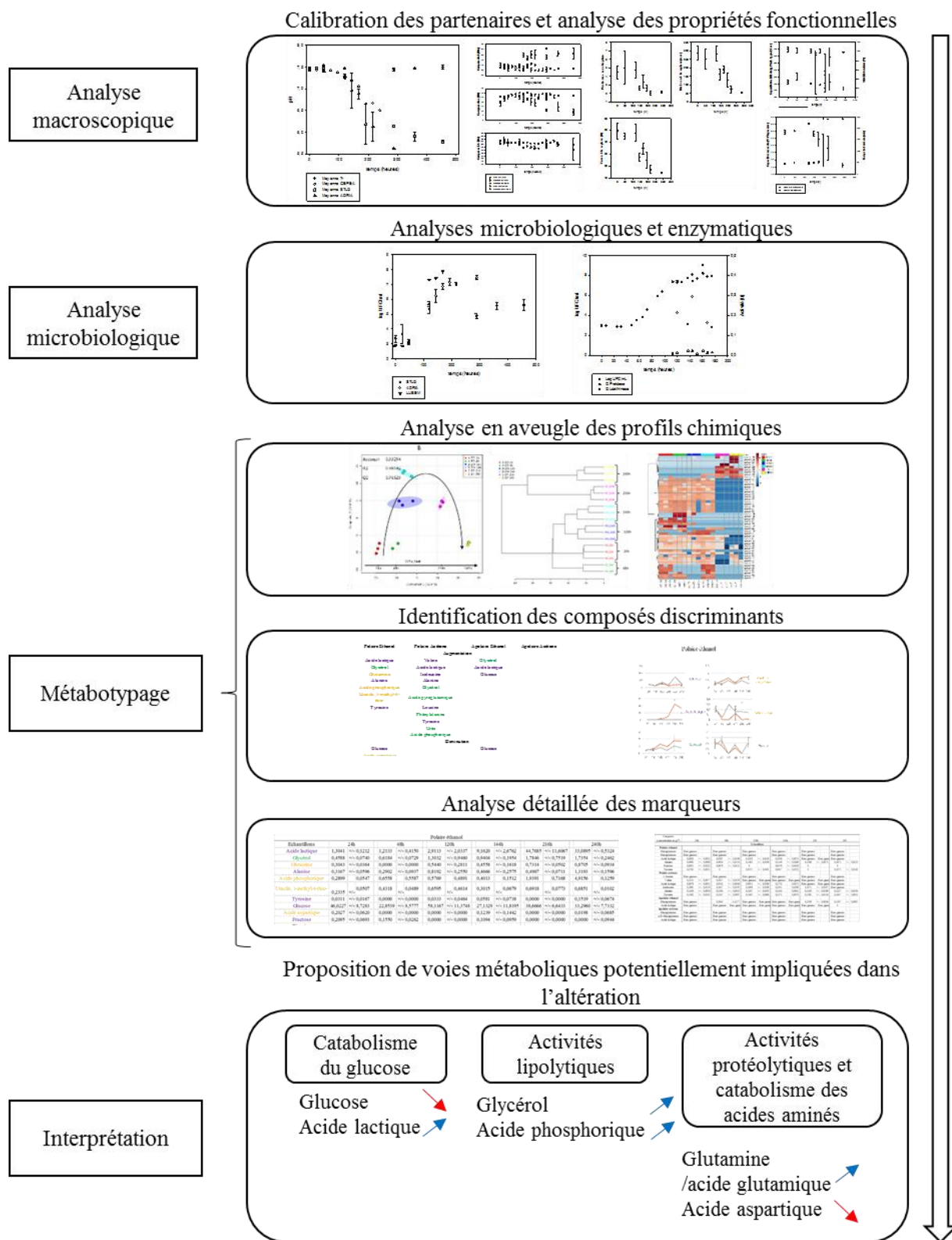


Figure 76. Schéma récapitulatif des mécanismes d'altération potentiels mis en évidence pour l'altération de type 2 avec la souche *B. weihenstephanensis*

Comme pour l'analyse des échantillons industriels, trois principales voies d'altération peuvent être proposées pour expliquer les modulations d'intensité observées pour les signaux identifiés. La diminution du signal du glucose et l'augmentation de celui de l'acide lactique pourraient être liées au

catabolisme du glucose par la bactérie *B. weihenstephanensis* au cours de l'altération. L'augmentation observée pour les signaux du glycérol et de l'acide phosphorique (groupement phosphate) pourrait être liée aux activités lipolytiques des bactéries au cours de l'altération. Enfin les modulations observées pour les signaux de la glutamine/ acide glutamique et de l'acide aspartique (diminution) pourraient être liées aux activités protéolytiques sur les protéines de l'EL et au catabolisme des acides aminés par ces mêmes bactéries.

Certains de ces marqueurs décrits comme « précoces » (Glucose, acide lactique, glycérol) et dont certains sont déjà décrits dans la littérature (acide lactique), présentent le potentiel de détecter l'altération des EL dès le début du phénomène et pourraient permettre un meilleur suivi des produits, notamment en milieu industriel. La pertinence, l'origine et les mécanismes potentiels de ces marqueurs ainsi que les résultats de l'analyse croisée marqueurs / suivi macroscopique seront discutés dans la dernière partie de ce manuscrit.

4 Etude cinétique de l'altération de type 1 avec la souche *Enterococcus faecium*

4.1 Protocole développé pour l'étude cinétique de l'altération des EL

Les protocoles de culture microbiologique et de préparation des EL stériles suivent ceux définis par le laboratoire STLO et déjà exploités pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*. Cette étude est réalisée avec la souche *Enterococcus faecium* ensemencée à 3 log UFC.mL⁻¹ et sélectionnée pour reproduire l'altération de type 1. Les plannings de lancement et de prélèvements sont présentés dans l'Annexe Y de ce manuscrit.

4.2 Phénotype physico-chimique

4.2.1 Inter-calibration des partenaires

4.2.1.1 *pH* et colorimétrie

Les données présentant, comme dans le cadre de l'étude cinétique de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*, des variations d'ordonnée à l'origine ont été également normalisées par centrage. La valeur de pH à 48h a été fixée comme identique à celle du témoin du laboratoire GEPEA à 48h (premier point commun entre les partenaires, antérieur à la baisse pH) pour l'ensemble des distributions. La correction appliquée a été reproduite pour l'ensemble des temps

d'analyse. Les valeurs de correction appliquées à chacune des distributions sont présentées dans le Tableau 69.

Tableau 69. Valeur de correction appliquée aux mesures de pH pour chaque distribution pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche *E. faecium*

	Témoin négatif	Gepea	STLO	ADRIA
Valeur à t = 48h	7,48	7,4	7,52	7,95
Valeur à soustraire		0,0	0,04	0,47

La Figure 77 présente les valeurs de pH enregistrées par chacun des partenaires pour les différents temps d'analyse au cours de l'altération à 8°C par la souche *E. faecium*.

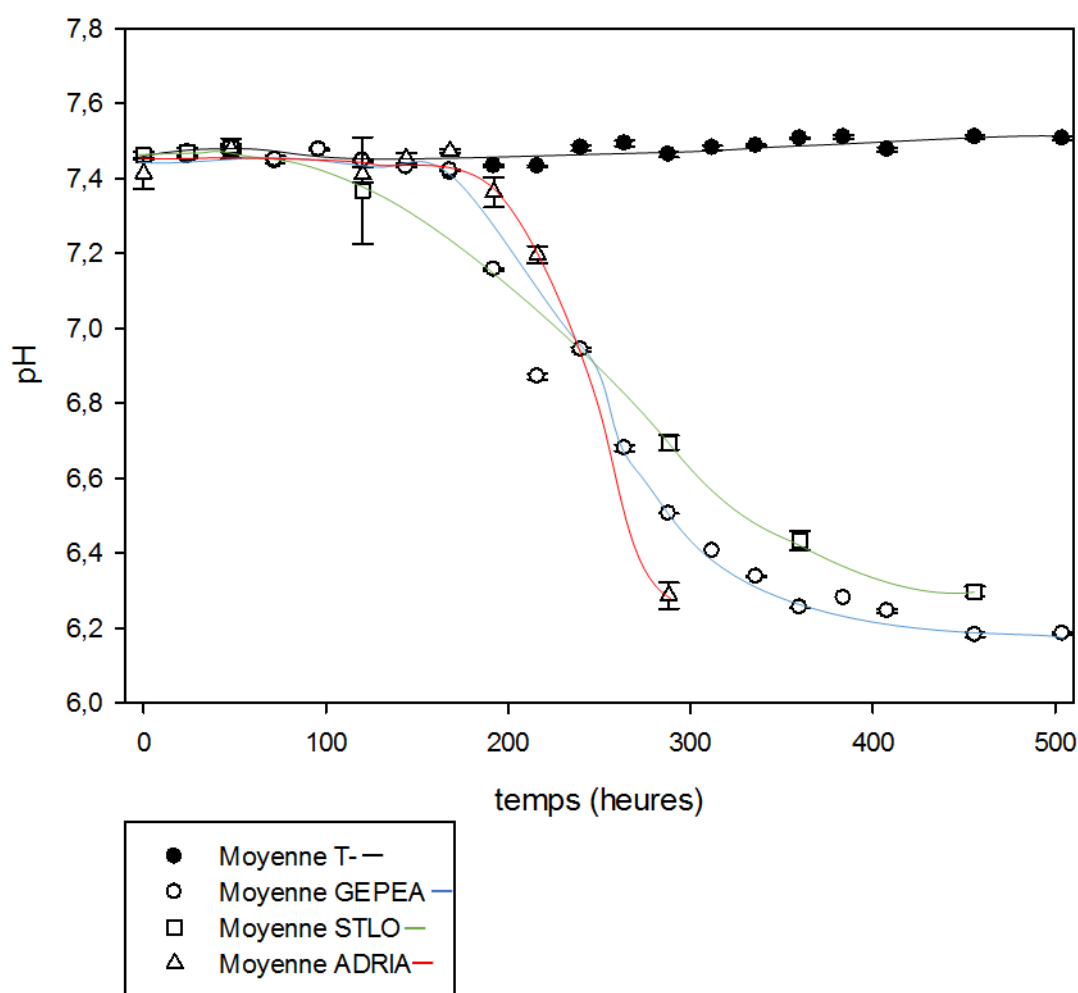


Figure 77. Valeurs de pH (centrées) enregistrées par chacun des partenaires pour les différents temps d'analyse au cours de l'altération à 8°C par la souche *E. faecium*.

Comme pour l'étude cinétique de l'altération de type 2, les trois distributions présentent une évolution très proche. Un début de chute du pH est observé aux alentours de 192h jusqu'à atteindre

une valeur minimale. Les valeurs finales de pH de 6,28, 6,29 et 6,17 obtenues par les équipes de la société ADRIA, et des laboratoires STLO et GEPEA sont respectivement atteintes aux temps d'analyses 288h, 456h et 504h. La distribution correspondant aux résultats du laboratoire GEPEA présente une chute de pH plus rapide aux temps d'analyses 192h et 216h. Le pH présente une légère augmentation au temps d'analyse 264h. Elle atteint un plateau au temps d'analyse 360h (le pH diminue encore de 0,3 unités jusqu'au temps d'analyse 504h). La distribution correspondant aux échantillons de la société ADRIA présente une chute de pH légèrement plus lente pour les points d'analyse 192h et 216h puis plus rapide jusqu'à atteindre le point le plus bas à 288h (dernier point d'analyse pour cette distribution) avec une valeur de 6,29, proche du pH final obtenu par les autres équipes. La chute de pH de la distribution correspondant aux échantillons du laboratoire STLO est difficile à décrire en raison du faible nombre de points présents sur cette zone du suivi. La différence de pH entre les témoins et les échantillons pour le laboratoire GEPEA est considérée comme significative à partir du temps d'analyse 192h avec une diminution de 0,27 unités de pH, correspondant à la première variation enregistrée au-dessus de 0,04 (seuil de significativité fixé au cours des développements méthodologiques, voir chapitre 3 - pHmétrie).

Les distributions présentent une évolution très similaire en termes de début de chute du pH, de pente et de pH final. Cette observation nous permet de confirmer que le phénomène d'altération avec la souche *Enterococcus faecium* est bien suivi et reproduit entre les différentes équipes du projet.

Les résultats d'analyse par colorimétrie sont présentés dans l'Annexe Z de ce manuscrit

4.2.1.2 Conclusion

Malgré les résultats mitigés des mesures colorimétriques, la cohérence observée dans les résultats de pH permet de confirmer la pertinence de l'intégration de données complémentaires obtenues par les partenaires du programme. Les résultats des mesures de pH permettent également de mettre en évidence un phénomène d'altération plus lent à démarrer que pour l'altération de type 2. Le début de la chute du pH étant proche de 192h.

Au vu de ces observations il a été décidé d'analyser les résultats à travers trois jeux de données distincts. L'analyse par GC-MS du premier jeu de données constitué des échantillons correspondant aux six premiers temps d'analyse (24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h) aura pour objectif de mettre en évidence des marqueurs précoces de l'altération. Ces marqueurs pourraient permettre de détecter le phénomène d'altération avant le début de la modification de ses propriétés physico-chimiques (baisse de pH). L'analyse par GC-MS du deuxième jeu de données correspondant à des points répartis tout au long de la cinétique d'altération (24h, 120h, 216h, 312h et 384h) aura pour objectif de confirmer les tendances identifiées dans le premier jeu de données et de permettre la mise en évidence de marqueurs plus tardifs de l'altération. Ce deuxième jeu de données sera également

profilé par RMN¹H, cette analyse devrait permettre la confirmation de l'identité et des profils de variation de certains marqueurs ainsi que l'identification d'autres marqueurs potentiels, non analysés par GC-MS. Un troisième et dernier jeu de données constitué des points d'analyse 240h et 456h (points avancé et très avancé de la cinétique d'altération) sera également étudié. Cette analyse réalisée à la fois sur des échantillons traités classiquement et sur des échantillons filtrés en amont de l'étape de déprotéination devrait permettre d'obtenir des informations complémentaires sur l'origine des composés d'intérêt identifiés (métabolites bactériens ou métabolites excrétés et propres à la matrice EL).

4.2.2 Résultats des analyses complémentaires réalisées par les partenaires du consortium ALTOVOP

4.2.2.1 Croissance

La Figure 78 présente les résultats de croissance de la souche *E. faecium* dans l'EL à 8°C telle que mesurée par les différents partenaires. Les dénombrements effectués par les équipes des laboratoires STLO et la société ADRIA sont présentés.

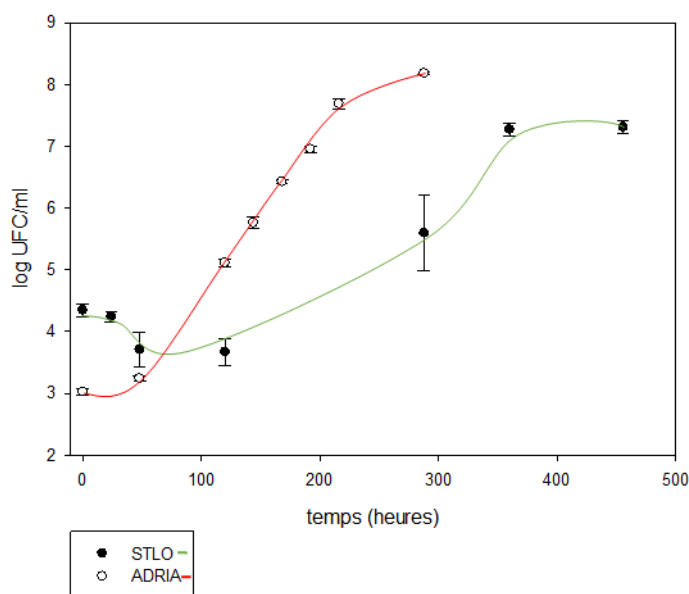


Figure 78. Résultats des dénombrements effectués par les différents partenaires au cours de la croissance de la souche *E. faecium* inoculée à 3 log UFC.mL⁻¹ dans l'EL à 8°C à chaque temps d'analyse

Une différence significative est observable entre les résultats obtenus par la société ADRIA et par le laboratoire STLO. L'augmentation plus rapide du nombre d'UFC et la concentration maximale plus élevée (8,17 log UFC.mL⁻¹ contre 7,31 log UCF.mL⁻¹) mesurée par la société ADRIA pourrait expliquer la pente plus abrupte obtenue par ce partenaire lors des mesures de pH. La différence

observée dans les résultats de croissance pourrait être également expliquée par des différences d'état physiologique des souches à l'inoculation ou par des différences mineures des procédures d'inoculation, d'incubation et de suivi.

4.2.2.2 Activité enzymatique

Aucune activité enzymatique n'a été détectée avec la souche *Enterococcus faecium* lors des mesures effectuées par le laboratoire LUBEM. Ces analyses étant réalisées en milieu inducteur, il est possible que certaines enzymes actives dans l'EL n'aient pas été détectées.

4.2.2.3 Propriétés fonctionnelles

La Figure 79 présente les résultats de caractérisation des propriétés de gélification de l'EL au cours de l'altération par la souche *Enterococcus faecium* inoculée à 3 log UFC.mL⁻¹ à 8°C.

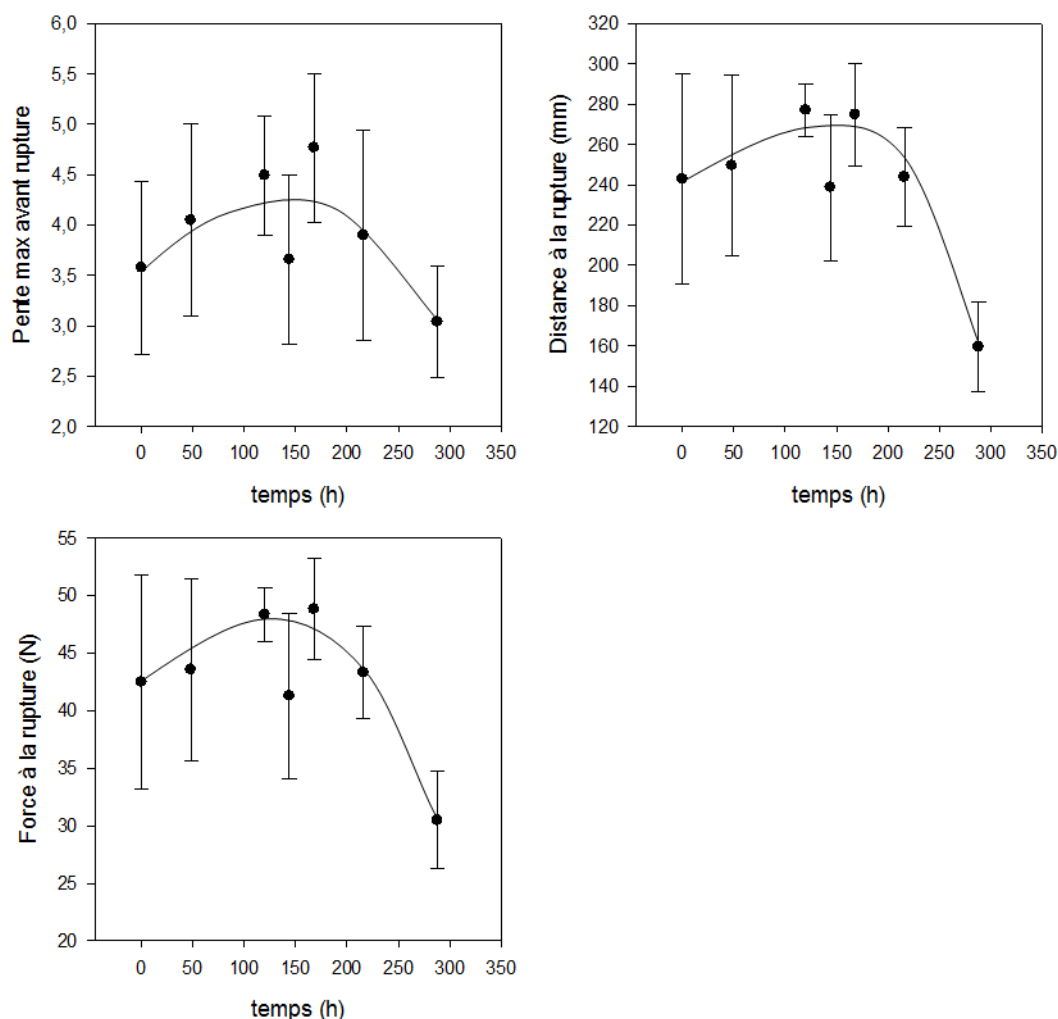


Figure 79. Résultats des analyses des propriétés de gélification au cours de l'altération par la souche *E. faecium*

L'altération de type 1 impacte les propriétés de gélification des EL de façon moins marquée que l'altération de type 2. Les indicateurs (pente max avant rupture, distance à la rupture et force à la rupture) présentent tous des distributions non monotones avec une tendance à l'augmentation pour les trois premiers points d'analyse (0h, 24h et 120h) suivi d'un point plus faible au point d'analyse 144h, d'un point plus élevé au point d'analyse 168h. Les valeurs diminuent ensuite au point d'analyse 216h et atteignent leur minimum au point d'analyse 288h. A l'exception du point d'analyse 288h, il est difficile de distinguer une variation significative au regard de la variabilité mesurée au cours de l'altération sauf pour le dernier temps d'analyse. L'altération de type 1 implique donc une modification des propriétés de gélification des EL (augmentation ou diminution) en fonction du temps d'incubation et présentant une variabilité importante. Les échantillons arrivés à un stade avancé d'altération présentent des capacités de gélification significativement dégradées. Ces observations sont cohérentes avec celles réalisées sur les échantillons industriels altérés. En effet l'échantillon altéré de type 1 présentait des propriétés de gélification légèrement dégradées sur les indicateurs mesurés à l'exception de la distance de rupture.

La Figure 80 présente les résultats de caractérisation des propriétés émulsifiantes de l'EL au cours de l'altération par la souche *Enterococcus faecium* inoculée à 3 log UFC.mL⁻¹ à 8°C.

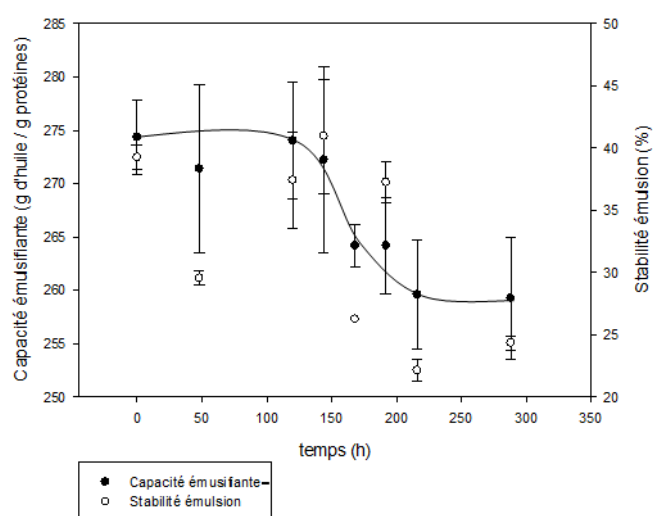


Figure 80. Résultats des analyses de la capacité émulsifiante des EL à chaque temps d'analyse pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche *E. faecium*

Les propriétés émulsifiantes sont plus clairement impactées par l'altération de type 1 que les capacités de gélification étudiées précédemment. Bien que peu significative, une tendance à la diminution au cours de l'altération est clairement identifiable. La valeur de capacité émulsifiante présente un plateau jusqu'au point d'analyse 144h. Une diminution d'environ 1,5% de la capacité émulsifiante est ensuite observable pour le point 168h, la valeur reste stable au point 192h puis chute à nouveau d'environ 1% au point 216h et reste stable jusqu'au point 259h. La stabilité de l'émulsion

présente une évolution non monotone et une variabilité plus ou moins importante en fonction des points d'analyse. Les échantillons à un stade avancé d'altération présentent des valeurs de stabilité d'émulsions significativement plus faibles qu'au temps initial. L'altération de type 1 présente un impact négatif faible mais mesurable sur les propriétés émulsifiantes de l'EL à partir du temps d'analyse 168h. La stabilité des émulsions formées tend à diminuer au cours de l'altération, atteignant leurs valeurs minimales en fin d'altération malgré un profil d'évolution non monotone. Ces observations sont contradictoires avec celles effectuées sur l'échantillon industriel altéré de type 1. Comme précédemment il est possible que la présence d'autres souches altérantes ait provoqué un impact différent sur les propriétés fonctionnelles de l'EL pour l'échantillon industriel.

La Figure 81 présente les résultats de caractérisation des propriétés moussantes de l'EL au cours de l'altération par la souche *Enterococcus faecium* inoculée à 3 log UFC.mL⁻¹ à 8°C.

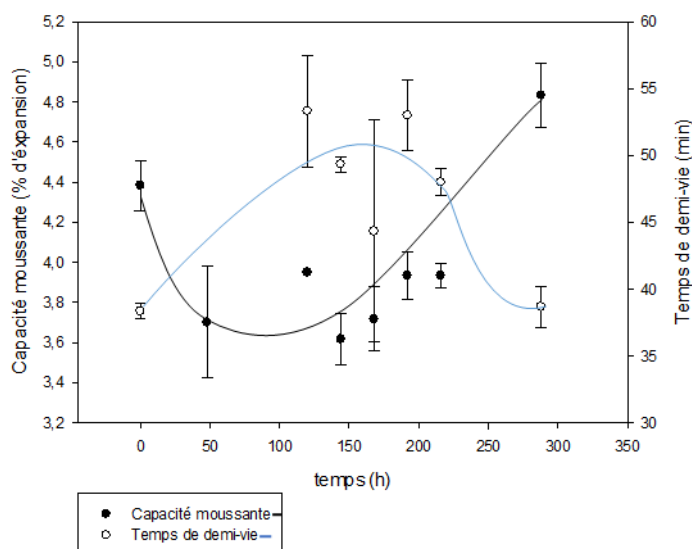


Figure 81. Résultats des analyses des propriétés moussantes et de stabilité moussante (temps de demi-vie) des EL à chaque temps d'analyse pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche *E. faecium*

Les mesures de propriétés moussantes présentent une nette diminution au début de la cinétique l'altération (entre les points d'analyse 24h et 48h). Le point d'analyse 120h présente une légère augmentation suivie d'une diminution équivalente au temps d'analyse 144h. Les valeurs présentent ensuite une nette tendance à l'augmentation jusqu'à la fin de la cinétique d'altération, atteignant leur valeur maximum de 4,83% d'expansion au point d'analyse 288h. La mesure du temps de demi-vie donne des valeurs qui augmentent à partir du point 120h. Elles présentent une relative stabilité et une grande variabilité au cours de la cinétique, avant de revenir à sa valeur initiale pour le dernier point d'analyse à 288h.

L'altération de type 1 a un impact significatif quoique dépendant du temps d'analyse sur les propriétés moussantes des EL. Les propriétés moussantes sont tout d'abord diminuées en cours d'altération pour revenir à un point plus élevé qu'au départ en fin d'altération. Au contraire, le temps de demi-vie est positivement impacté en cours de cinétique pour revenir à une valeur proche de la valeur initiale en fin de cinétique. Ces observations sont cohérentes avec celles réalisées sur l'échantillon industriel altéré de type 1 pour la capacité moussante, et inversées pour la stabilité de la mousse. Encore une fois, il est possible que la présence d'autres souches altérantes ait impliqué un impact différent sur les propriétés fonctionnelles de l'EL pour l'échantillon industriel.

4.2.2.4 Conclusion

L'approche de caractérisation macroscopique employée a permis, comme dans le cadre de l'étude de l'altération de type 2, de mettre en évidence des différences de profils physico-chimiques entre les différents temps d'analyse de la cinétique. Il est intéressant de noter que les variations de phénotype physico-chimique mesurées au cours de l'altération de type 1 sont moins intenses que dans le cas de l'altération de type 2. Ce qui suit sera consacré à la caractérisation des modifications de la composition chimique fine des échantillons, pour lesquels des modifications macroscopiques ont été constatées. La suite de cette partie présentera les analyses chimiques réalisées pour investiguer ces modifications et leurs mécanismes.

4.3 Phénotype chimique

Les échantillons dilués d'EL ont été comme pour l'analyse de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis* profilés par IRTF à chaque temps d'analyse de la cinétique. Il apparaît qu'il n'est apparu comme précédemment qu'aucune différence significative n'était détectable entre les échantillons de début et de fin d'altération, ces résultats sont présentés dans l'Annexe AA de ce manuscrit.

4.4 Métabotype

4.4.1 Prise d'empreinte métabolique et profilage métabolique par GC-MS

4.4.1.1 *Protocole de prise d'empreinte métabolique et de traitement des données*

Les échantillons sont traités selon le protocole présenté dans la partie 4.1. Les données sont analysées selon le protocole de traitement des données présenté dans le chapitre 3 (voir - Protocole complet de traitement des données brutes extraites des empreintes métaboliques).

Les paramètres filtration MCF et MCS sont, comme précédemment, remplacés par une étape de filtration manuelle. Pour rappel, les analyses étant réalisées sur 3 réplicas par condition, l'application d'une filtration avec un paramètre MCF 0,5 implique que seuls les signaux présents dans 2 (1,5) des 3 réplicas de chaque condition seront conservés. Les étapes de normalisation et de filtration du bruit de fond (seuil de coupure 0,01) sont effectuées comme précédemment.

L'analyse des données de l'étude cinétique de l'altération avec la souche *E. faecium* a été, comme expliqué dans les conclusions des résultats d'analyses macroscopiques, réalisée en trois temps sur trois jeux de données distincts.

4.4.1.2 *Analyse du jeu de données 1 – Recherche de marqueurs précoces de l'altération*

Une première analyse des données correspondant aux échantillons seuls a chaque temps d'analyse a permis de confirmer la pertinence de regrouper les six premiers points d'analyses en trois groupes (début, milieu et fin), cette analyse est présentée dans l'Annexe BB.

- *Analyse détaillée des fractions - analyse simultanée des échantillons et des témoins aux temps d'analyses regroupés selon les sous-groupes « début », « milieu » et « fin »*

Une analyse portant à la fois sur les échantillons et les témoins aux temps d'analyse regroupés a ensuite été réalisée afin de quantifier l'évolution de l'abondance des signaux correspondant aux composés détectés à la fois dans les échantillons sains (témoins) et altérés. Les six premiers temps d'analyse ont été répartis en trois groupes correspondant au début (24h, 48h), au milieu (72h, 96h) et la fin (120h, 144h) de la plage d'étude sélectionnée. Ces points correspondent au tout début de la cinétique d'altération, avant que les valeurs de pH des échantillons n'aient commencé à chuter de manière significative (Figure 82).

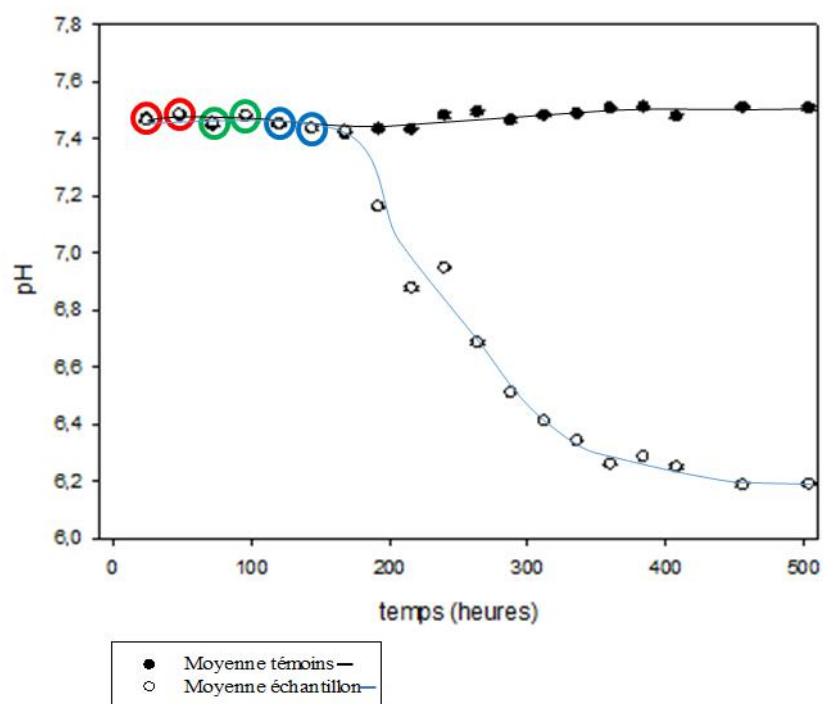


Figure 82. Résultats de suivi du pH au cours de la cinétique d'altération pour la plage d'analyse sélectionnée. Les points correspondant au début de plage d'étude (24h et 48h) sont entourés en rouge, ceux correspondant au milieu de la plage (72h et 96h) en vert et ceux correspondant à la fin de la plage (120h et 144h) en bleu.

Les valeurs de pH moyennes enregistrées pour ces points d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h sont respectivement de 7,46, 7,48, 7,45, 7,48, 7,45 et 7,43 pour les échantillons et de 7,47, 7,48, 7,44, 7,47 7,44 et 7,43 pour les témoins.

Les résultats d'ACP, de PLS-DA et de classification ascendante hiérarchique pour les points regroupés 24h et 48h, 72h et 96h et 120h et 144h sont présentés dans l'Annexe CC. En résumé, un recouvrement important entre les échantillons de début et de fin de la plage d'étude est constaté dans les résultats de classification comme dans ceux de PLS-DA. L'analyse des résultats permet de mettre en évidence que la capacité à séparer les échantillons est dégradée lors de l'analyse des temps regroupés pour l'ensemble des fractions à l'exception de la fraction polaire éthanol.

Suite à ces observations il a été décidé d'effectuer les calculs de « Fold Change » sur les temps d'analyse 24h, 72h et 120h plutôt que sur les points d'analyse regroupés afin de maximiser les chances d'identifier des marqueurs d'altération en limitant le recouvrement entre les signatures chimiques des échantillons.

- Calcul des Fold Change

L'analyse des Fold Change (FC) a été réalisée afin d'identifier les signaux d'intérêt de chaque fraction. Ici on considère l'échantillon altéré comme l'état final et le témoin comme l'état initial à chaque point d'analyse. Les FC correspondant aux temps d'analyses 24h, 72h et 120h ont été calculés (Figure 83).

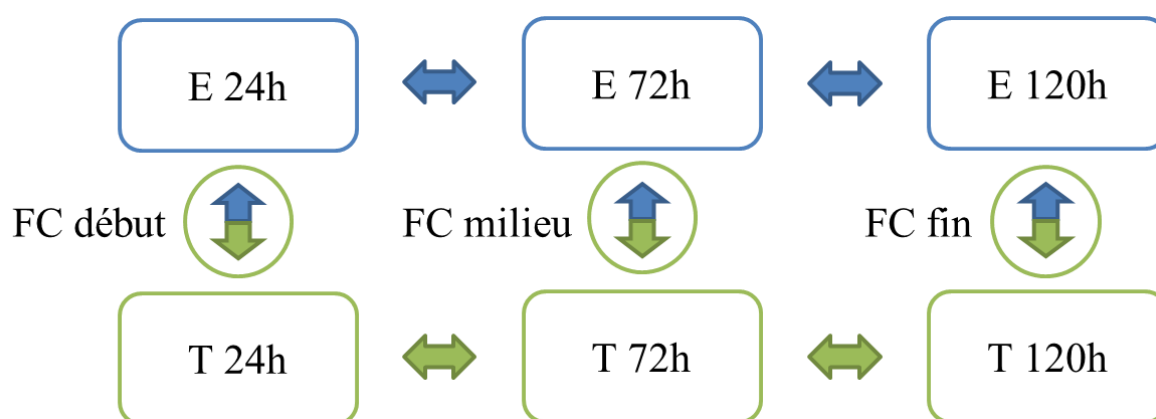


Figure 83. Schéma représentant les FC calculés pour l'identification des signaux d'intérêt

Les signaux ont ensuite été filtrés de manière à ne conserver que ceux présentant une variation significative au cours de l'altération et ceux présentant une cinétique d'évolution monotone sur les trois points d'analyse (début, milieu et fin). Ainsi les signaux présentant une intensité croissante ou décroissante et ceux avec un $FC > 1$ (variation d'intensité de plus de 100% entre deux points) ont été retenus.

A l'issue de ce processus, 84 marqueurs précoces potentiels ont été identifiés dans l'ensemble des fractions. Le nombre de composés retenus pour chaque fraction est présenté dans le Tableau 70.

Tableau 70. Nombre de composés retenus pour chaque fraction

Polaire éthanol	Polaire acétone	Apolaire éthanol	Apolaire acétone
36	21	17	10

Une fois ces signaux filtrés, un processus d'identification dans deux bases de données distinctes (Golm Metabolome Database ou GMD et NIST08) a été réalisé. Comme précédemment, les composés ont été annotés selon trois niveaux distincts, Identification (L'identité du composé a été confirmée par comparaison avec un standard injecté dans les mêmes conditions), Annotation de niveau 1 (2 bases de données concordantes - Spectre de masse + Index de rétention) et Annotation de niveau 2 (1 base de données – Spectre de masse + Index de rétention). Les marqueurs potentiels identifiés

dans chacune des fractions ainsi que leur évolution au cours du temps sont présentés dans le Tableau 71.

Tableau 71. Marqueurs potentiels identifiés dans chacune des fractions pour les temps d'analyse 24h, 48h et 72h dans le cadre de l'étude cinétique de l'altération avec la souche *E. faecium*. Les différents niveaux d'identifications sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1 et orange pour ceux annotés au niveau 2).

Polaire Ethanol	Polaire Acétone	Apolaire Ethanol	Apolaire Acétone
Augmentation			
Acide aspartique	Isoleucine		
Acide glutamique	Cadavérine		
Acide lactique	Urée		
Asparagine	Acide pyroglutamique		
	Beta Alanine		
Diminution			
Proline	Acide oléique	Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	Glucose
Norvaline		Glucose	Glycérol
Cholestérol			Acide stéarique
Phénylalanine			Myo-inositol
Acide palmitique			Acide phosphorique
Urée			
Acide oléique			
Glucose			
Mannitol			
L-Tryptophane			
Acide stéarique			

La présence de 2 composés (glucose et urée) présentant des comportements opposés dans différentes fractions sera discutée après analyse détaillée des signaux. En plus des signaux identifiés, différents composés retenus comme potentiellement intéressants n'ont pas pu être identifiés. Le nombre de ces composés d'intérêt non identifiés pour chaque fraction est présenté dans le Tableau 72.

Tableau 72. Nombre de composés d'intérêt non identifiés pour chaque fraction

Polaire éthanol	Polaire acétone	Apolaire éthanol	Apolaire acétone
15	13	11	8

Une analyse détaillée des marqueurs potentiels incluant la répartition des marqueurs potentiels dans les différentes fractions, la quantification relative et absolue de ces marqueurs potentiels est présentée dans l'Annexe DD.

- *Marqueurs d'altération potentiels identifiés*

Les marqueurs potentiels présentant une variation significative au cours de l'altération par la souche *E. faecium* ont été sélectionnés et leur évolution temporelle discutée. Les résultats sont également mis en perspective avec ceux obtenus pour les échantillons ayant subi une altération de type 1 lors de l'étude des échantillons industriels. Globalement, les évolutions d'intensités mesurées sont faibles pour l'ensemble des marqueurs potentiels. Le stade précoce de la cinétique sur lequel se concentre ce jeu de données semble difficile à caractériser.

o *Acide glutamique*

Pour la fraction polaire éthanol, le signal présente une légère augmentation dans les échantillons par rapport aux témoins sur l'ensemble des points d'analyse. Elle reste cependant inférieure au seuil de significativité et à la variabilité mesurée. Cette observation est cohérente avec l'augmentation du signal de l'acide glutamique détecté dans le cadre de l'analyse de l'échantillon altéré de type 1.

o *Acide lactique*

Pour la fraction polaire éthanol on constate une légère augmentation (inférieure à la variabilité mesurée) de l'intensité dans l'échantillon au temps d'analyse 144h. Les données du témoin pour ce temps d'analyse ne sont pas disponibles. Une augmentation de l'acide lactique serait cohérente avec les résultats observés lors de l'analyse des échantillons industriels où l'acide lactique présenterait une forte augmentation dans la même fraction pour l'échantillon altéré de type 1 (FC>10 en GC-MS et non détectée dans les témoins en RMN ¹H).

o *Cholestérol*

Le signal du cholestérol dans la fraction polaire éthanol présente une légère diminution (inférieure au seuil de significativité) mais supérieure à la variabilité interne mesurée sur certains points d'analyse (96h, pas de données pour le témoin du point d'analyse 144h). Le cholestérol a déjà été identifié dans une autre fraction dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels comme un marqueur potentiel de l'altération de type 1 et 2. Ce signal est non détectable dans les analyses par GC-MS de la fraction apolaire acétone de l'échantillon altéré de type 1 alors qu'il est détectable dans la même fraction de l'échantillon sain, ce qui est cohérent avec la diminution observée du signal dans l'échantillon au point d'analyse 144h

o *Glucose*

Le signal du glucose n'est plus détectable dans la fraction polaire éthanol au temps d'analyse 144h. Les données du témoin sont manquantes pour ce point d'analyse. Dans la fraction polaire

acétone, le signal n'est plus détectable dans l'échantillon au temps d'analyse 144h ; le témoin présente pour ce point d'analyse une augmentation aberrante du signal (augmentation de 100%). La diminution du signal du glucose dans les échantillons au point d'analyse 144h est cohérente avec les observations réalisées dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels où son signal disparaît ou bien diminue fortement dans l'échantillon altéré de type 1 (FC>500 en GC-MS et >75 en RMN ¹H).

o *Acide oléique*

Le signal de l'acide oléique présente dans la fraction polaire acétone une augmentation dans les échantillons au temps d'analyse 144h. Cette variation est supérieure à la variabilité mesurée et présente un FC proche de 1.

- *Conclusion*

L'objectif de l'analyse de ce jeu de données était l'identification de marqueurs de l'altération qui permettraient de détecter ce phénomène dans son stade précoce, avant la modification des propriétés physico-chimiques enregistrées sur le plan macroscopique, notamment la chute de pH. L'étude des échantillons correspondant aux points d'analyse sélectionnés ne permet pas l'identification claire de marqueurs d'altération du type 1. Cependant, différents composés présentent un signal monotone au cours de l'altération (acide glutamique, cholestérol) ou une modification de l'intensité des échantillons au point d'analyse 144h (acide lactique, glucose, acide oléique)

Ces marqueurs potentiels seront mis en perspective avec les résultats du jeu de données suivant correspondant à l'étude de la fraction polaire éthanol à des points plus avancés de la cinétique d'altération.

4.4.1.3 Analyse du jeu de données 2 – Confirmation des tendances et recherche d'autres marqueurs d'altération

Les échantillons correspondant à la première analyse (24h) et aux différents points de la cinétique analysés en RMN (120h, 216h, 312h et 384h) ont également été profilés par GC-MS selon le même schéma que précédemment dans le but d'effectuer une analyse croisée des données obtenues par GC-MS et RMN. De plus, l'étude du premier jeu de données obtenu pour l'altération des EL avec la souche *E. faecium* étant réalisée sur des points d'analyse de début d'altération (placés avant le début de la chute de pH de l'échantillon), des marqueurs dont la variation était non détectable dans cette dernière analyse pourraient être détectés sur les points plus avancés de ce deuxième jeu de données.

En raison des contraintes techniques du plateau analytique réalisant les mesures en RMN, une seule fraction a pu être profilée. La fraction polaire éthanol a été sélectionnée après étude des résultats des analyses précédentes, car elle s'est avérée être la plus informative et la plus simplement exploitable en RMN (superposition des différents spectres moins complexe pour l'annotation).

- Filtration des répliques aberrants

Dans le but d'affiner l'analyse, la détection des échantillons aberrants est réalisée, comme pour la première étude cinétique de l'altération, visuellement sur les données à l'aide des résultats d'ACP ainsi qu'à l'aide du module « Quality metrics » de la plateforme W4M. Les échantillons présentant un score de Hotelling p-value inférieur à 0,03 (limite fixée empiriquement pour l'élimination des répliques aberrants identifiés visuellement) sont éliminés. Aucun réplique ne présentant de seuil supérieur à la valeur fixée, l'ensemble des répliques a été conservé pour les analyses.

- Visualisation des résultats – échantillons seuls et témoins seuls

La représentation des résultats sous forme d'analyse en composantes principales a été employée pour permettre une première visualisation de la séparation des différentes conditions analysées (témoins / échantillons, temps d'analyse). Les résultats de cette analyse pour la fraction polaire éthanol (seule fraction profilée en RMN ^1H) sont présentés. La

Figure 84 présente les résultats des ACP réalisées sur les données correspondant aux témoins seuls et aux échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 120h, 216h, 312h et 384h. Les données sont soumises à une transformation log et Pareto (centrées sur la moyenne et divisées par l'écart type de chaque variable).

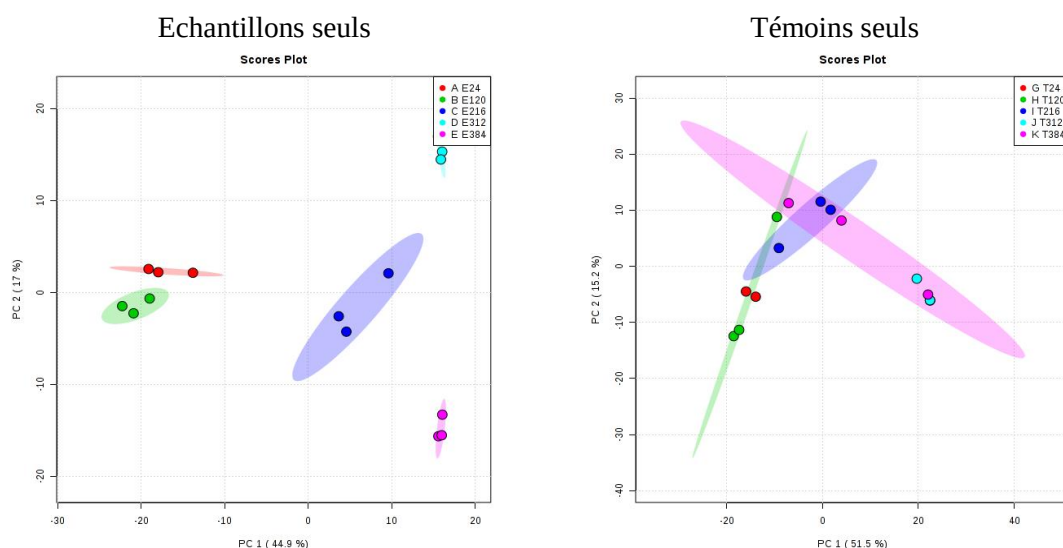


Figure 84. Résultats des ACP réalisées sur les données de prise d'empreinte par GC-MS correspondant aux témoins seuls et aux échantillons seuls aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

Un effet cinétique se dessine très clairement pour les échantillons selon la première composante (représentant 44,9% de la variance mesurée). Selon cette composante, on peut noter un recouvrement important entre les groupes d'échantillons 24h et 120h ainsi qu'entre les groupes d'échantillons 312h et 384h. Le contraste observé sur les témoins seuls aux mêmes temps d'analyse est nettement moins important. En effet, tous les groupes d'échantillons présentent des recouvrements importants.

- Analyse détaillée des échantillons

Les résultats d'ACP, de PLS-DA et de classification hiérarchique ascendante ont été étudiés pour les échantillons seuls de la fraction polaire éthanol. Les résultats d'ACP et de PLS-DA sont présentés dans la Figure 85.

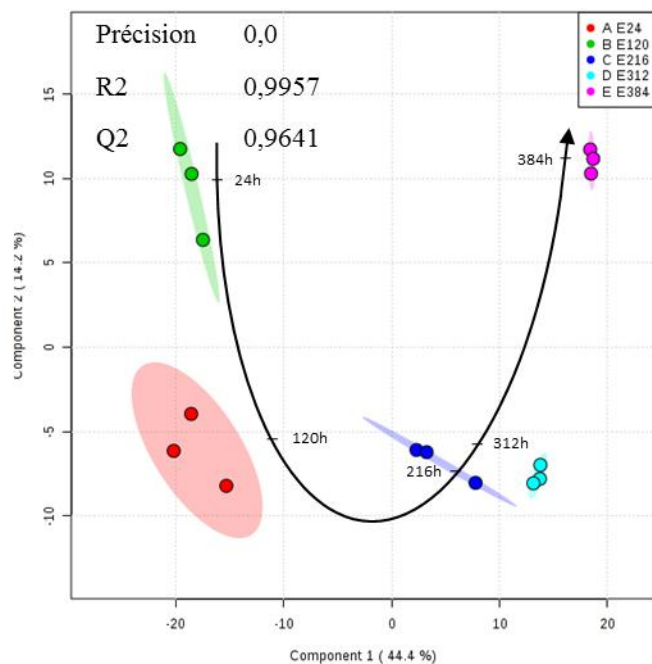


Figure 85. Résultats de PLS-DA pour les données de prise d'empreinte par GC-MS des échantillons seuls de la fraction polaire éthanol au temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

Les résultats de PLS-DA décrivent un effet cinétique bien marqué permettant une bonne séparation de tous les temps d'analyses sur les deux composantes. Les scores de validation R2 et Q2 obtenus (0,9957 et 0,9641) indiquent, comme pour l'étude du jeu de données 1, une très bonne qualité des modèles de prédiction employés pour cette analyse. Les résultats ont également été soumis à une classification ascendante hiérarchique. La Figure 86 présente les résultats de cette analyse pour la fraction polaire éthanol aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h.

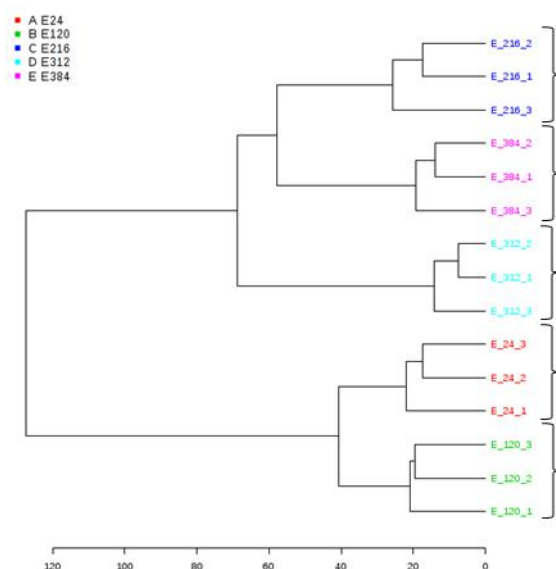


Figure 86. Résultats de classification hiérarchique ascendante pour les données de prise d'empreinte par GC-MS des échantillons seuls de la fraction polaire éthanol au temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

Les échantillons sont bien classés lors de l'analyse en dehors de l'inversion des échantillons correspondants aux temps d'analyse 216h et 312h (probablement due à la proximité déjà observée entre ces groupes d'échantillons). Les observations précédentes ont permis de mettre en évidence le contraste entre les échantillons aux différents points d'analyse. L'analyse des cartes de chaleur a été employée pour permettre de confirmer l'existence de signaux ou de groupes de signaux caractéristiques de chacun des groupes d'échantillons. La Figure 87. présente les résultats pour la fraction polaire éthanol.

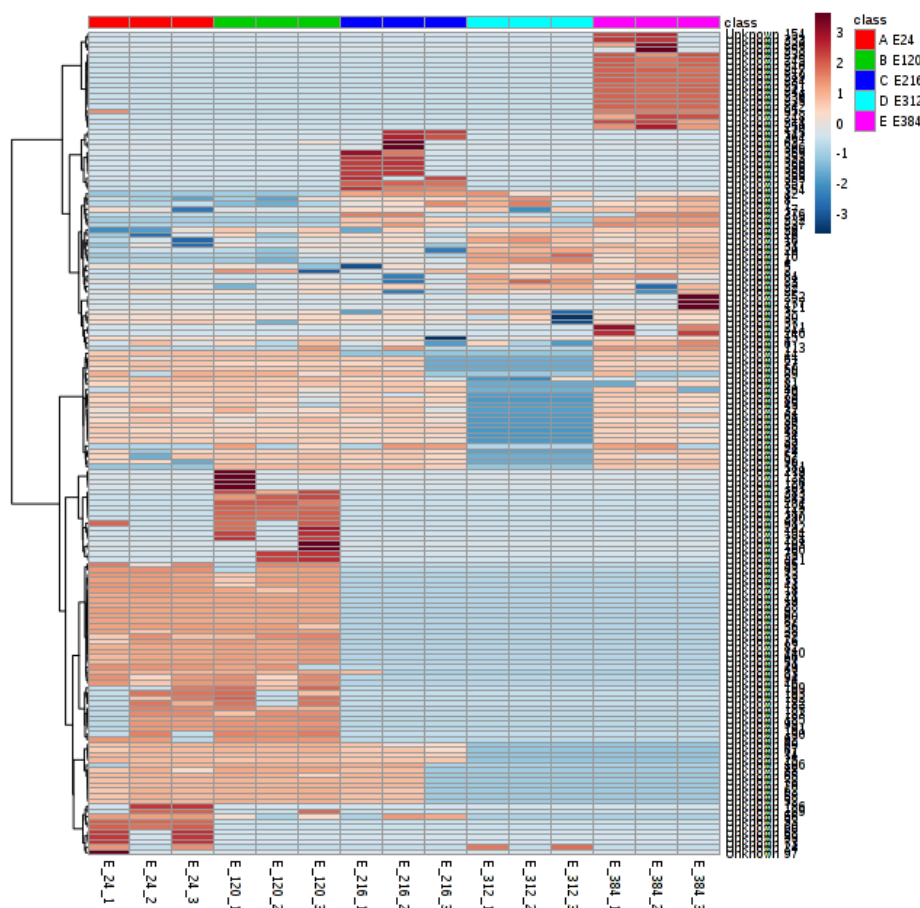


Figure 87. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls au temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.

L'analyse des données sous forme de carte de chaleur permet de confirmer l'existence de signaux ou groupes de signaux responsables de la séparation observée entre les différents groupes d'échantillons. L'analyse des Fold Change présentée dans la partie suivante a été employée pour identifier les signaux responsables de la discrimination observée entre les groupes d'échantillons.

- Calculs des Fold Change

Les FC ont été calculés de la même manière que précédemment pour les cinq points d'analyse. Le choix des signaux considérés comme significatifs à lui été effectué quelque peu différemment. Le

calcul des FC étant réalisé sur 5 points et non sur trois comme précédemment, une analyse ne retenant que les signaux présentant un profil monotone sur les cinq points risquerait d'ignorer les signaux présentant une variation en sens inverse sur un point seulement. Les signaux présentant une variation de FC monotone (augmentation ou diminution) sur au moins 3 points d'analyse successifs ont été retenus. Cette méthode permet de sélectionner les composés présentant une variation intéressante des intensités échantillon / témoin au cours de la cinétique d'altération constituée de 5 points sans éliminer les composés pouvant présenter un comportement d'intermédiaire métabolique (non monotone sur l'ensemble des 5 points) ou modulés tardivement. En tout, 50 signaux ont été retenus, 22 présentant une tendance à l'augmentation, 28 présentant une tendance à la diminution.

- *Analyse détaillée des marqueurs potentiels*

Les composés retenus ont ensuite été annotés selon la même méthode que précédemment. La liste des composés annotés et leurs tendances mesurées via la mesure des FC sont présentées dans le Tableau 73.

Tableau 73. Marqueurs potentiels identifiés dans les données de prise d'empreinte GC-MS de la fraction polaire acétone aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*. Les différents niveaux d'identification sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1, et orange pour ceux annotés au niveau 2).

Polaire Ethanol
Augmentation
Acide lactique
Cholestérol
Phénylalanine
Sérine
Thréonine
Acide glutamique
Isoleucine
Acide octanoïque
Diminution
Glucose
Hexadécane-1-ol
Acide azélaïque
Acide aspartique
Autres profils
Myo inositol
Cadavérine
Acide 3,4
dyhydroxybenzoïque
Acide oléique
Tryptophane

En plus de ces 17 signaux annotés, 31 signaux présentant des profils d'intérêt n'ont pas pu être identifiés (annotation non satisfaisante).

Les résultats détaillés de la quantification relative et absolue des marqueurs potentiels identifiés est présentée dans l'Annexe GG de ce manuscrit.

- *Marqueurs présentant un profil d'intérêt*

o *Glucose*

Le signal est toujours plus faible dans les échantillons altérés que dans les témoins. Il présente une augmentation aberrante du signal au point d'analyse 312h. Le signal du glucose est ensuite non détectable dans l'échantillon et revient proche de la valeur initiale pour le témoin. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels par GC-MS et RMN où le signal du glucose diminue fortement, ou bien n'est plus détectable dans les échantillons altérés.

o *Isoleucine*

Le signal augmente dans l'échantillon par rapport au témoin. Cette augmentation est significative quant à la variabilité mesurée au temps d'analyse 312h ; une variabilité importante du signal est constatée sur le point d'analyse suivant. La variation dépasse le seuil de significativité fixé ($FC > 1$) aux temps d'analyse 24h et 312h (l'intensité du témoin est faible au point 312h), elle n'est cependant plus significative au point d'analyse 384h. La tendance générale à l'augmentation est cohérente avec les observations effectuées sur échantillons industriels. En effet, l'échantillon dégradé type 1 présentait un signal de l'isoleucine plus important que le témoin dans la fraction polaire éthanol ($FC > 1$).

o *Acide lactique*

Le signal est déjà plus intense dans les échantillons que dans les témoins au temps d'analyse 24h. Cette différence devient significative à partir du temps d'analyse 216h ($FC > 16$). Le signal reste relativement stable dans le témoin. L'augmentation du signal de l'acide lactique dans les échantillons est cohérente avec les observations effectuées sur l'échantillon industriel altéré de type 1 (dans les résultats de GC-MS et de RMN). Il est important de noter que l'intensité du signal enregistré à 24h n'est que très légèrement supérieure dans l'échantillon. L'analyse du jeu de données 1 a permis de mettre en évidence que cette augmentation n'était pas pertinente pour les points d'analyse 24h à 120h (variations inférieures à la variabilité mesurée).

o *Acide glutamique*

Le signal de l'acide glutamique présente une augmentation dans les échantillons, détectable à partir de 120h et significative à partir de 216h. Le signal reste relativement stable dans les témoins. L'augmentation du signal de l'acide glutamique dans les échantillons est cohérente avec les observations effectuées sur les résultats de GC-MS de l'échantillon industriel altéré de type 1.

o *Thréonine*

Le signal de la thréonine augmente dans les échantillons à partir de 216h. Cette différence devient significative à 312h ($FC > 1$). Cette observation est cohérente avec celles effectuées sur l'échantillon industriel altéré de type 1.

o *Sérine*

Le signal de la sérine augmente dans les échantillons à partir de 216h et présente un $FC > 1$ au point d'analyse 312h. Le FC repasse sous la barre du 1 au point d'analyse 384h. Cette observation est contradictoire avec les résultats obtenus lors de l'analyse par GC-MS de l'échantillon altéré de type 1 où le signal de la sérine présentait une diminution.

o *Cholestérol*

Le signal du cholestérol présente une légère augmentation dans l'échantillon par rapport au témoin au point d'analyse 384h ($FC > 1$). Cette observation est contradictoire avec celles réalisées dans la fraction apolaire acétone sur les échantillons industriels, où le signal du cholestérol n'était détectable que dans le témoin. Il est possible que cette différence soit due au fait que ces observations sont réalisées dans deux fractions distinctes, le cholestérol présentant logiquement un signal de faible intensité dans les fractions polaires.

o *Phénylalanine*

Le signal augmente significativement dans les échantillons à partir de 312h ($FC > 1$). L'intensité dans les témoins est relativement stable au cours de l'altération. Cette observation est cohérente avec celles effectuées sur l'échantillon industriel altéré de type 1.

- *Conclusion*

Différents composés présentent une cinétique d'évolution caractéristique au cours de l'altération. Leur pertinence sera évaluée par comparaison avec les résultats obtenus par RMN et par GC-MS pour le jeu de données correspondant aux points de début de cinétiques dans la suite de cette partie. On peut cependant déjà mettre en avant le fait que les signaux du glucose, de l'acide lactique et de l'acide glutamique présentent des profils d'évolution cohérents dans les deux jeux de données. Ces

marqueurs présentent le potentiel de détecter l'altération de manière précoce (avant le début de modification des propriétés physico-chimiques).

4.4.2 Prise d'empreinte métabolique par RMN-HR

Le protocole de profilage employé est décrit dans le chapitre 2 de ce manuscrit (voir - Expérience de RMN ^1H). Des échantillons prélevés aux temps d'analyse 120, 216, 312 et 384h ont été profilés en RMN ^1H . En raison de contraintes techniques, il n'a pas été possible de réaliser les analyses sur plusieurs répliques. Les résultats transmis par le CEISAM étant déjà regroupés en buckets et identifiés (lorsque cela était possible), et l'absence de répliques ne permettant pas une étude visuelle pertinente de la distribution des données, les signaux (buckets) ont été directement sélectionnés en fonction de l'évolution de leur intensité dans les échantillons et témoins aux différents temps d'analyse (par le calcul des FC).

4.4.2.1 *Calculs des FC*

Les FC ont été calculés de la même manière que précédemment. Les signaux présentant une variation de FC monotone (augmentation ou diminution) sur trois des quatre points d'analyse ont été retenus. En tout, 128 signaux ont été retenus, 81 présentant une tendance à l'augmentation, 47 présentant une tendance à la diminution.

4.4.2.2 *Quantification relative des marqueurs d'intérêt*

Parmi ces signaux, 60 ont été identifiés avec un niveau de confiance et de complexité acceptable (certaines identifications trop complexes pouvant rendre difficile l'analyse des résultats). Certains signaux redondants étant présents dans ces données, ils ont été filtrés manuellement pour n'associer qu'un signal par composé ou groupe de composés. La liste des composés annotés et leurs évolutions temporelles mesurées via la mesure des FC sont présentées dans le Tableau 74.

Tableau 74. Marqueurs potentiels identifiés dans les données de prise d'empreinte RMN ^1H de la fraction polaire acétone aux temps d'analyses 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

Augmentation
Acide lactique + Thréonine
Lysine / Isoleucine
Lysine / Arginine
Acide acétique (+Lysine / Arginine)
Tyrosine / Cystéine / Lysine
Choline
Phénylalanine / Histidine / Myo-inositol
Phénylalanine / Histidine / Myo-inositol

Acide lactique
Acide fumarique
Histidine
Tryptophane
Histidine
Acide formique
Diminution
Isoleucine / Leucine
Méthionine
β -Glucose / Proline
α -Glucose / Proline
β -Glucose
α -Glucose
Autre profil
Glutamine

En plus de ces 21 signaux annotés, 68 signaux présentant des profils d'intérêt n'ont pas pu être identifiés (annotation inconnue, non satisfaisante ou trop complexe). Les données détaillées d'évolution d'intensité de ces signaux sont présentées dans l'Annexe HH.

4.4.2.3 Marqueurs présentant un profil d'intérêt

o Acide lactique

Deux signaux qui présentent une très nette augmentation dans l'échantillon sont identifiés pour l'acide lactique. Pour le premier signal (Acide lactique + Thréonine), le FC est supérieur à 10 au temps 216h et >25 au temps 384h. L'intensité pour le témoin est proche de celle du temps 120h pour tous les temps d'analyse. Pour le deuxième signal (acide lactique seul), un FC>10 est calculé à 216h et >25 à 384h. Ce signal présente une faible intensité dans les témoins (proche de celle du temps d'analyse 120h). Ces observations sont cohérentes avec celles effectuées sur les résultats de GC-MS et de RMN pour les échantillons industriels altérés, où le signal de l'acide lactique présente une forte intensité, alors que ce signal n'était pas détecté dans l'échantillon sain.

o Glucose

Quatre signaux du glucose sont clairement identifiés, dont deux sans recouvrement. Ces signaux présentent déjà une valeur d'intensité légèrement plus faible dans les échantillons que dans les témoins à 120h. Les intensités diminuent dans l'échantillon avec une valeur d'intensité dans l'échantillon cinq fois plus faible que dans le témoin à 384h. Le signal est globalement stable dans le témoin (petite inflexion à 312h). Ces observations sont également cohérentes avec celles effectuées sur les échantillons industriels où le signal du glucose présente une forte diminution entre l'échantillon sain et l'échantillon altéré de type 1 (dans les résultats de GC-MS et RMN).

o *Acide fumarique*

Le signal présente une forte augmentation dans l'échantillon avec un $FC > 1$ à partir de 216h, non détecté ou intensité très faible dans le témoin. Ce signal présente une intensité relative très faible ($< 0,01$).

o *Tryptophane*

Le signal du tryptophane présente une légère augmentation d'intensité dans l'échantillon à partir de 216h, mais la variation reste inférieure au seuil de significativité fixé. Cette observation est cohérente avec l'augmentation d'intensité constatée dans l'échantillon altéré de type 1 dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels.

o *Histidine*

Deux signaux présentent des intensités de variations distinctes. Légère augmentation du signal dans l'échantillon à partir de 312h, très nette au point 384h pour le premier signal avec un $FC > 1$ à 312h et > 12 à 384h, augmentation plus faible mais présente pour l'ensemble des points d'analyse à partir de 216h pour le deuxième avec un $FC > 1$ au point 312h mais < 1 au point 384h.

Acide formique

L'intensité du signal dans l'échantillon présente une forte augmentation à partir de 216h avec un $FC > 1$ à partir de 312h, intensité stable dans le témoin (signal très faible). Cette observation est cohérente avec l'augmentation de signal détecté pour l'acide formique dans la fraction polaire acétone de l'échantillon altéré de type 1 dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels. Cependant ce composé n'a pas été retenu comme présentant une variation significative dans la fraction polaire éthanol de cette même analyse.

o *Lysine / Isoleucine*

L'intensité du signal augmente dans l'échantillon par rapport au témoin dès le temps d'analyse 216h avec un FC supérieur à 1 au point 312h, mais inférieur à 1 au point 384h. Cette augmentation d'intensité du signal de la lysine est contradictoire avec la baisse d'intensité mesurée pour ce même signal dans les analyses par RMN de la fraction polaire éthanol de l'échantillon industriel altéré de type 1.

4.4.3 Résultats croisés des analyses

Cette partie discute les composés retenus comme pertinents dans le cadre du suivi de l'altération dans plusieurs jeux de données. Les composés retenus à la fois dans le cadre de l'étude du premier jeu de données (24h-144h) et du second (24h, 120h, 216h, 312h, 384h) par GC-MS sont tout

d'abord discutés. Les composés retenus à la fois dans les résultats de profilage par GC-MS et par RMN ^1H du jeu de données 2 sont ensuite abordés. La détermination des profils d'endo/ exo métabolites est ensuite explorée à travers l'étude des résultats de l'analyse du troisième jeu de données (échantillons filtré et non filtrés).

4.4.3.1 *Résultats croisés du profilage GC-MS des jeux de données 1(24h-144h) et 2 (24h – 120h)*

- *Glucose*

Certains signaux du glucose présentent des intensités plus importantes dans les échantillons que dans les témoins pour les fractions apolaires. Les signaux étant significativement plus intenses dans les fractions polaires, les données issues de ces fractions ont été retenues pour l'analyse. Le glucose présente jusqu'à quatre signaux sur un TIC de GC-MS. Les signaux majoritaires présentent dans le cadre de ces analyses, des intensités très élevées (proche de la saturation du détecteur) qui impliquent une très forte variabilité des mesures. Certains des signaux majoritaires n'ont donc pas été retenus lors des analyses car leurs FC (échantillon-témoin) ne présentaient pas le profil d'évolution attendu en fonction du stade d'altération en raison de la variabilité des résultats. Dans le cas présent le signal du glucose retenu comme pertinent dans le cadre de l'étude du jeu de donnée 1 correspond à un autre signal du glucose présentant une intensité plus faible. Pour cette analyse, le signal du glucose disparaît dans la fraction polaire éthanol au temps d'analyse 144h. Pour le jeu de données 2 (0h, 384h), le signal du glucose (le signal majoritaire) présente une intensité plus faible dans les échantillons altérés que dans les témoins, devenant non détectable dans les échantillons après le temps d'analyse 336h. La tendance globale à la diminution du signal du glucose dans les fractions polaire éthanol des deux jeux de données est cohérente avec les observations réalisées dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels où son signal disparaît ou diminue fortement dans l'échantillon altéré de type 1 (FC>500 en GC-MS et >75 en RMN ^1H). Certains signaux du glucose présentent des intensités plus importantes dans les échantillons que dans les témoins pour les fractions apolaires. Les signaux étant significativement plus intenses dans les fractions polaires, les données issues de ces fractions ont été retenues.

- *Cholestérol*

Bien que plus intense dans les fractions apolaires, le signal du cholestérol dans la fraction polaire éthanol s'est avéré présenter la variation d'intensité la plus significative au cours de l'altération. Pour le jeu de données ,1 le signal du cholestérol dans la fraction apolaire éthanol présente une légère diminution dans l'échantillon (inférieure au seuil de significativité). Ce signal est non détectable dans les analyses par GC-MS de la fraction apolaire acétone de l'échantillon altéré de type 1 alors qu'il est détectable dans la même fraction de l'échantillon sain, ce qui est cohérent avec la

diminution observée du signal dans l'échantillon au point d'analyse 144h. Pour le jeu de données 2, le signal ne présente pas de variation significative entre les conditions jusqu'au temps d'analyse 216h (les données du point 312h présentant des valeurs aberrantes), puis augmente significativement dans les échantillons au point d'analyse 384h. Cette observation est contradictoire avec celles réalisées précédemment. Ces observations contradictoires ne permettent pas de conclure quant au profil d'évolution du cholestérol au cours de l'altération.

- *Acide lactique*

Dans le cadre de l'étude du jeu de données 1, on constate dans la fraction polaire éthanol une légère augmentation (inférieure au seuil de significativité) de l'intensité dans l'échantillon au temps d'analyse 144h ; les données du témoin pour ce temps d'analyse ne sont pas disponibles. L'étude du jeu de données 2 permet de confirmer la tendance observée pour le signal de l'acide lactique, ce dernier présente une intensité plus importante dans les échantillons que dans les témoins pour l'ensemble des temps d'analyse. La différence devient significative à partir de 216h (FC>16). Ces observations sont cohérentes avec les résultats observés lors de l'analyse des échantillons industriels où l'acide lactique présente une forte augmentation dans la même fraction pour l'échantillon altéré de type 1 (FC>10 en GC-MS et non détecté dans les témoins en RMN ^1H).

- *Acide glutamique*

Le signal de l'acide glutamique présente une légère augmentation dans les échantillons par rapport aux témoins sur l'ensemble des points d'analyse. Cette augmentation est inférieure au seuil de significativité ainsi qu'à la variabilité mesurée. Il présente la même tendance dans les résultats du jeu de données 2. L'augmentation est cette fois clairement détectable à partir du point d'analyse 120h et significative à partir de 216h. L'augmentation constatée du signal de l'acide glutamique dans les échantillons est cohérente avec les observations effectuées sur les résultats de GC-MS de l'échantillon industriel altéré de type 1.

Les autres marqueurs potentiels retenus dans le cadre de l'étude d'un des jeux de données seulement, pour l'altération avec la souche *E. faecium* sont listés ici. Pour le jeu de données 1 : acide oléique. Pour le jeu de données 2 (0h – 384h) : Acide fumarique, tryptophane, histidine, acide formique, lysine.

4.4.3.2 *Résultats croisés des profilages par GC-MS et RMN ^1H*

- *Acide lactique*

Le signal de l'acide lactique présente une nette augmentation dans les résultats de GC-MS de la fraction polaire éthanol (jeu de données 1 et 2) dès le temps d'analyse 120h, présentant un FC>16 au point d'analyse 216h. Dans les résultats de profilage par RMN, deux signaux qui présentent une

très nette augmentation dans l'échantillon sont identifiés pour l'acide lactique. Ces signaux présentent des FC > 10 à 216h et >25 à 384h. L'intensité du signal correspondant dans les témoins reste stable, proche de la valeur du point d'analyse 120h au cours de l'altération. Ces observations sont cohérentes avec celles effectuées sur les résultats de GC-MS et de RMN pour les échantillons industriels altérés.

- *Glucose*

La tendance globale à la diminution du signal du glucose dans les fractions polaire éthanol analysées par GC-MS et cohérente avec les observations réalisées dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels est confirmée par les résultats de profilage RMN. Quatre signaux distincts du glucose sont clairement identifiés dans les analyses RMN dont deux sans recouvrement. Ces signaux présentent déjà une valeur d'intensité légèrement plus faible dans les échantillons que dans les témoins à 120h. Les intensités diminuent dans l'échantillon avec une valeur d'intensité dans l'échantillon cinq fois plus faible que dans le témoin à 384h. Le signal est globalement stable dans le témoin. La diminution du signal du glucose observée malgré une forte variabilité des mesures par GC-MS est donc confirmée par les résultats de profilage RMN.

4.4.3.3 *Analyse des échantillons filtrés*

Des échantillons filtrés et non filtrés ont été profilés à deux temps d'analyse au cours de l'altération (240h et 456h). Cette analyse avait pour but de différencier, parmi les marqueurs identifiés, ceux étant libérés dans le milieu au cours de l'altération (exométabolites), de ceux contenus dans les cellules bactériennes au moment du prélèvement et donc avant déprotéination (endométabolites). Suite à une erreur de manipulation, les données correspondant à l'échantillon filtré au temps d'analyse 240h se sont avérés non exploitables. L'analyse a donc été réalisée sur un point unique (456h). L'ensemble des signaux détectés dans les quatre fractions analysées ont été identifiés selon la procédure présentée précédemment (Identification et annotation niveau 1 et 2). Pour chaque composé, les intensités ont été comparées entre les témoins filtrés et non filtrés et les échantillons filtrés et non filtrés. L'analyse des échantillons filtrés étant réalisée de la même façon sur le même volume de produit et l'EL étant dilué au 1/3 avant l'étape de filtration, les intensités mesurées devraient être trois fois moindres que dans les échantillons non filtrés. Cependant, la réponse des composés en GC-MS étant non linéaire, les données de cette analyse devront être interprétées avec précaution. D'autres sources de biais potentielles ont été identifiées pour cette analyse. Il est notamment possible que la diminution d'intensité des composés majoritaires impacte favorablement les autres signaux analysés. Les signaux présentant une intensité relative inférieure à 0,5 ont été retirés de l'analyse pour éviter de considérer un composé dont le signal serait passé sous le seuil de coupure comme un endométabolite.

Afin de limiter les risques de faux positifs pour l'identification des endométabolites, seuls les signaux présentant une diminution de plus de 75% (équivalent du signal approximatif attendu pour une

dilution au 1/4) entre un échantillon ou témoin non filtré et un échantillon ou témoin filtré ont été retenus comme présentant un profil d'endométabolite. Les autres composés sont considérés comme des exométabolites. Certains métabolites présentent une abondance supérieure ou proche dans les échantillons ou témoins filtrés. Ces composés sont décrits comme présentant un profil d'augmentation dans le Tableau 75. L'étape de filtration ayant été ajoutée au protocole après la réalisation des développements méthodologiques, elle n'a pas fait l'objet d'une étude détaillée. Il est donc difficile de conclure quant à ces composés présentant un profil d'augmentation. On peut cependant proposer comme théorie que certains composés pouvant être potentiellement entraînés avec les protéines lors de l'étape de déprotéination, seraient mieux récupérés dans le solvant de déprotéination après l'étape de dilution et de centrifugation nécessaire à la filtration. Cette étape de dilution provoquant une précipitation partielle moins « brutale » des protéines.

La liste des profils observés (endométabolite, exométabolite, augmentation) pour chaque marqueur d'altération identifié dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium* est présentée dans le Tableau 75.

Tableau 75. Profils observés pour chaque marqueur d'altération identifié pour les échantillons filtrés et non filtrés dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*

Fraction polaire éthanol	Témoin 456h	Témoin filtré 456H	Echantillon 456h	Echantillon filtré 456h	Profil
Acide glutamique	0,6348	0,3319	2,1253	2,5725	Augmentation
Acide lactique	1,3216	0,5858	36,2150	22,3460	Exométabolite
Cholestérol	0,6195	0,3658	1,0749	0,3669	Exométabolite
Glucose	36,8459	11,9715	4,7950	0,1666	Endométabolite
Isoleucine	NA	NA	NA	NA	
3,4 DHB	NA	NA	NA	NA	
Thréonine	0,5622	0,2507	2,7535	0,9021	Exométabolite
Sérine	0,4082	0,2855	1,0802	0,4201	Exométabolite
Tryptophane	0,0557	0,0145	0,0173	0,0209	Augmentation
Acide aspartique	0,3696	0,4172	0,3139	0,7976	Augmentation
Fraction apolaire acétone					
Acide oléique	0,1728	0,0655	0,4647	0,1014	Endométabolite

Parmi les marqueurs d'altération retenus, deux ne sont pas détectables dans les échantillons analysés (t = 546h). Deux autres (le glucose et l'acide oléique) présentent un profil d'endométabolites, suggèrent que ces composés étaient localisés dans les cellules bactériennes au moment de l'étape de filtration. Quatre présentent un profil d'exométabolites suggèrent cette fois que ces composés étaient « libres » dans la matrice EL. Enfin, 3 composés présentent un profil d'augmentation.

4.5 Conclusion sur les marqueurs d'altération

Différents marqueurs d'altération ont pu être identifiés à l'issue des analyses réalisées sur l'altération de type 1 avec la souche *E. faecium* (Figure 88). Certains de ces marqueurs (acide glutamique) présentent des variations détectables dans les échantillons à partir de 48h d'altération. Les premières variations significatives (présentant un FC >1 ou < -1) apparaissent pour quelques marqueurs après le temps d'analyse 144h (acide lactique, glucose) et pour la plupart des marqueurs à partir du point d'analyse 216h. Parmi les marqueurs identifiés dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*, l'acide lactique est le seul à être largement discuté dans la littérature concernant l'altération des œufs. A notre connaissance, seules quelques études portant sur l'altération des œufs et des ovoproduits traitent également des acides acétique et formique (Morris 1987; Morris *et al.* 1989; Lepper *et al.* 1956).

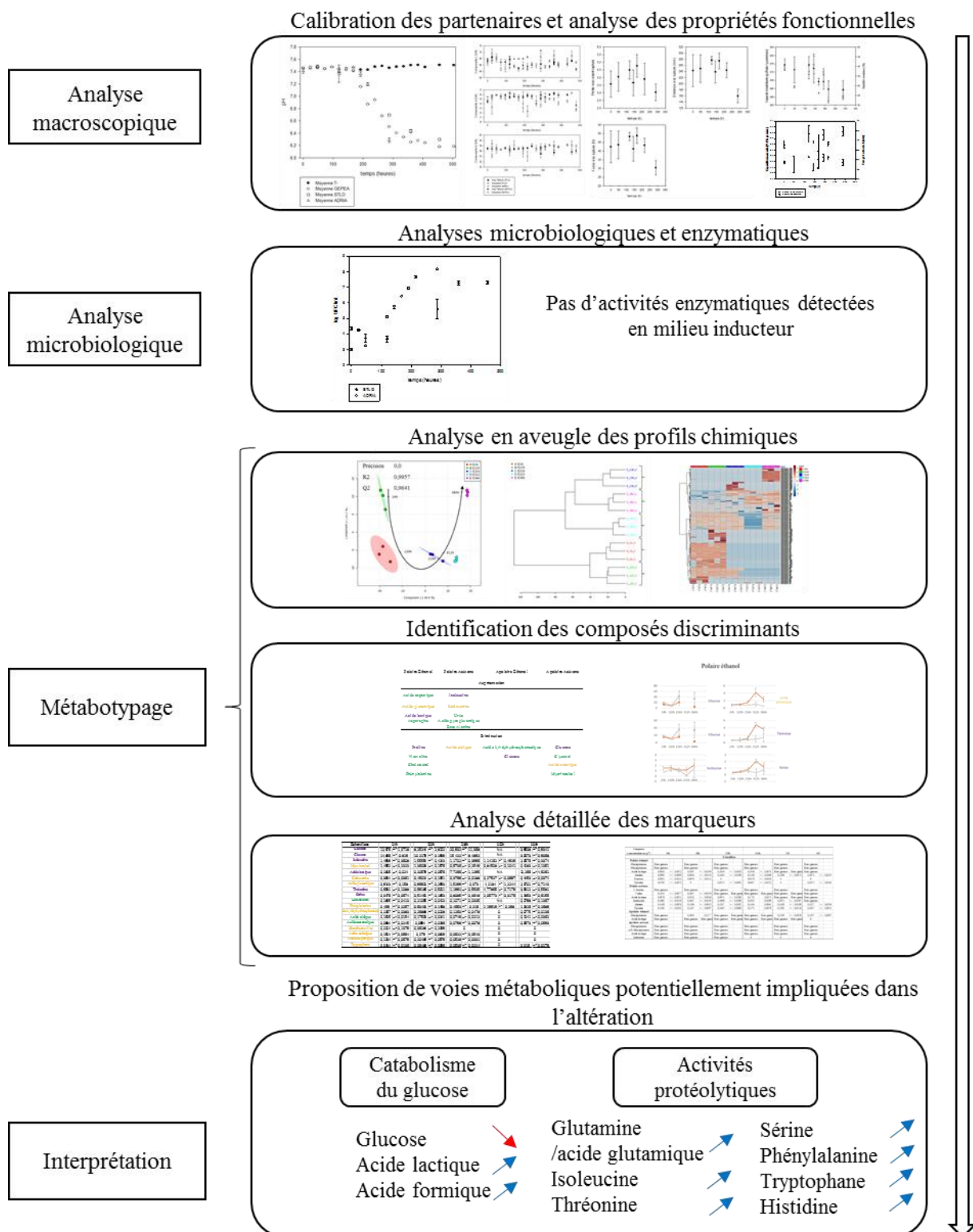


Figure 88. Schéma récapitulatif des mécanismes d'altération potentiels mis en évidence pour l'altération de type 1 avec la souche *E. faecium*

L'altération de type 1 est plus difficile à repérer dans son stade précoce en raison de la plus faible modulation des marqueurs identifiés au cours des premiers jours d'altération. Cette observation est cohérente avec celles effectuées dans le cadre de l'analyse physico-chimique des échantillons au cours de l'altération (avec la souche *E. faecium*). La chute de pH, la dégradation des propriétés

fonctionnelles et la modulation des profils chimiques interviennent à des points plus tardifs que dans le cadre de l'analyse de l'altération de type 2 (avec la souche *B. weihenstephanensis*). Il est intéressant de noter que la modulation de certains marqueurs (glutamine/acide glutamique, acide lactique, glucose) intervient avant que la diminution des valeurs de pH ne soit significative, permettant d'envisager une détection de l'altération plus précoce qu'avec les indicateurs physico-chimiques employés.

Deux principales voies d'altération peuvent déjà être proposées pour expliquer les variations d'intensité enregistrées entre les échantillons et les témoins pour les marqueurs identifiés. L'augmentation de l'intensité du signal des acides lactique et formique, et la diminution de celle du signal du glucose constatés dans les résultats de profilage par GC-MS et RMN¹H pourraient être liées au catabolisme du glucose par la bactérie *E. faecium* au cours de l'altération. Les augmentations enregistrées pour les signaux de la glutamine/ acide glutamique, de l'isoleucine, de la thréonine, de la sérine, de la phénylalanine, du tryptophane et de l'histidine pourraient être liées aux activités protéolytiques de cette même bactéries sur les protéines de l'EL. Aucune trace claire d'activité lipolytique n'a été détectée pour l'altération de type 1 avec la souche *E. faecium*. L'origine et les mécanismes potentiels des marqueurs identifiés ainsi que les résultats de l'analyse croisée marqueurs / suivi macroscopique sont discutées dans la dernière partie de ce manuscrit.

5 Discussion des marqueurs identifiés

Dans cette partie sont discutés les différents marqueurs d'altération identifiés dans le cadre de ces travaux. Les résultats de profilage sont résumés pour chaque marqueur puis mis en perspectives avec les analyses de propriétés fonctionnelles et les données de suivi microbiologique et enzymatique. L'origine et les mécanismes / voies métaboliques des marqueurs retenus comme les plus pertinents sont également discutés. Une analyse des points limitants de ces travaux, ainsi qu'un aperçu des perspectives sont enfin présentés.

5.1 Marqueurs d'altération identifiés

Différents marqueurs d'altération ont été identifiés pour chacune des études cinétiques de l'altération. Ces marqueurs se séparent en différents groupes présentant des profils d'évolution communs (augmentation / diminution dans les échantillons) ou plus spécifiques au cours de l'altération. La majorité des signaux étudiés présent des résultats cohérents entre les différentes analyses réalisées (jeux de données correspondant à des points d'analyse distincts, profilage par GC-MS et RMN, analyse des échantillons industriels). La suite de cette discussion portera sur les marqueurs ne présentant pas de contradictions dans les profils enregistrés et pour lesquels il a été possible de conclure quant au profil d'évolution au cours de l'altération. Il est intéressant de noter que pour chaque analyse, certains marqueurs non identifiés présentaient également le potentiel de servir de marqueur d'altération, avec pour certains une modulation détectable dès les premiers points d'analyse. Les résultats de profilage par GC-MS et RMN, quand ces analyses ont pu être réalisées, se sont avérés très complémentaires. Ils ont permis la validation croisée des identifications et profils d'évolution pour certains composés et l'identification de marqueurs non détectés ou non retenus comme pertinents dans le cadre de l'analyse des échantillons par l'une de ces deux techniques.

La complémentarité des différentes fractions métaboliques analysées s'est vérifiée tout au long des développements méthodologiques et des analyses en aveugle des signaux pour les analyses cinétiques de l'altération. Cependant, une fois l'annotation et l'analyse détaillée des profils d'évolution des signaux réalisées, il apparaît que les signaux retenus comme marqueurs d'altération pertinents sont exclusivement issus des fractions polaires (principalement la fraction polaire éthanol). Le fait que seule la fraction polaire éthanol du jeu de données 2 ait pu être profilée par GC-MS et RMN dans le cadre de l'étude de l'altération de type 1 explique également en partie que plus de marqueurs soient identifiés dans cette fraction. Des modulations plus fines des composés présents dans les fractions apolaires et l'étape d'identification plus complexe pour ces composés, principalement dans les résultats de RMN, pourraient également en partie expliquer cette observation. Les différences observées dans les signatures chimiques des échantillons (représentées par les analyse de type ACP et

PLS-DA dans ce chapitre) confirment pourtant l'existence de signaux caractéristiques des différents temps d'analyse au cours de l'altération dans ces fractions apolaires également. Il est possible que les composés à l'origine des différences de profils observées n'aient pas pu être annotés avec un niveau de confiance suffisant. Afin d'identifier ces composés, on pourrait envisager d'analyser les fractions étudiées par une approche complémentaire telle que la LCHRMS. Cette technique hautement résolutive pourrait permettre l'identification de certains de ces composés présentant un profil d'intérêt. Certains composés identifiés comme présentant une variation d'intensité significative dans le cadre de l'analyse des échantillons industriels n'ont pas été identifiés ou retenus comme pertinents dans le cadre des études cinétiques de l'altération. Il est possible que ces marqueurs aient été présents dans les échantillons mais n'aient pu être identifiés avec un niveau de confiance suffisant. Il est également possible que ces signaux aient présenté une trop faible intensité dans les échantillons correspondant aux analyses cinétiques de l'altération, les analyses réalisées sur les échantillons industriels ayant été effectuées sur des EL très contrastés.

Parmi les composés identifiés comme marqueurs de l'altération dans le cadre des études cinétiques avec les souches *B. weihenstephanensis* et *E. faecium*, certains se sont avérés être à la fois représentatifs des altérations de type 1 et 2. La diminution du signal du glucose et l'augmentation du signal de l'acide lactique sont en effet détectables dans le cas de l'altération avec l'une ou l'autre des souches. Ces deux composés (glucose et acide lactique) semblent, à l'issue de l'analyse des résultats, présenter le meilleur potentiel pour la détection précoce des altérations de type 1 et 2. L'altération de type 1 semble être à la fois un phénomène plus lent et plus long à détecter, la modulation de ces marqueurs ne survenant qu'à partir de 120h contre 48h pour l'altération de type 2. Le glycérol, dont l'augmentation est détectable dans les échantillons dès 48h d'analyse, pourrait également servir de marqueur précoce de l'altération (de type 2 uniquement).

Les différents marqueurs d'altération précoces et non précoces identifiés sont rappelés dans le Tableau 76 pour l'altération de type 2 et dans le Tableau 77 pour l'altération de type 1. Le FC représentant l'intensité de la variation de signal enregistrée entre les échantillons (altérés) et les témoins (sains) est également rappelé pour chaque marqueur aux différents temps d'analyse. Le pH s'étant avéré être le plus pertinent des indicateurs macroscopiques employés pour le suivi de l'altération, les résultats de FC calculés sur ces mesures sont également présentés à des fins de comparaison.

Tableau 76. Intensité de variation des marqueurs de l'altération de type 2 avec la souche *B. weihenstephanensis*. Les cases grisées correspondent à des valeurs aberrantes présentant des écarts type importants (CV>50% pour les échantillons ou les témoins). Avec « NA » : non détecté dans les échantillons et les témoins, et « -1 » : non détecté dans les échantillons seulement. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation.

Altération de type 2 avec <i>B. weihenstephanensis</i>						
Temps d'altération	24h	48h	120h	144h	216h	240h
pH	-0,54	0,09	-1,64	-3,06	-9,91	-12,80
Catabolisme du glucose						
Glucose	10,83	-23,48	-21,01	-20,77	-74,03	-37,04
Acide lactique	-2,37	21,42	151,96	846,79	7505,39	2105,20
Activités lipolytiques						
Glycérol	-17,08	30,34	61,20	121,86	70,40	125,17
Acide phosphorique	59,03	-4,08	737,86	20,95	360,84	1701,50
Activités protéolytiques et catabolisme des acides aminés						
Glutamine / Acide glutamique	-9,30	NA	-9,19	82,35	213,99	212,89
Acide aspartique	0,44	-100,00	-100,00	-19,65	-100,00	-85,97

Tableau 77. Intensité de variation des marqueurs de l'altération de type 1 avec la souche *E. faecium*, les cases grisées correspondent à des valeurs aberrantes présentant des écarts type importants (CV>50% pour les échantillons ou les témoins). Avec « NA » : non détecté dans les échantillons et les témoins. Les valeurs en vert correspondent au jeu de données 1 (analyse de la phase précoce), les valeurs en violet correspondent au jeu de données 2 (analyse complète). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation.

Altération de type 1 avec <i>E. faecium</i>								
Temps d'altération	24h	48h	72h	96h	120h	216h	312h	384h
pH	-0,16	0,00	0,07	-0,02	-0,02	-7,54	-14,39	-16,38
Catabolisme du glucose								
Glucose (GC-MS)	-17,88	10,92	4,28	-21,33	-7,62	-56,07	NA	-91,03
Glucose (RMN)					-8,82	-31,93	-68,65	-84,54
Acide lactique (GC-MS)	5,60	11,33	-6,01	-4,22	11,15	1670,86	NA	1853,95
Acide lactique (RMN)					-7,85	752,47	2761,62	2433,21
Acide formique (RMN)					-12,09	69,21	490,32	283,34
Activités protéolytiques et catabolisme des acides aminés								
Glutamine / Acide glutamique	14,66	15,80	5,74	9,48	17,00	106,79	312,35	352,98
Isoleucine	124,74	NA	NA	NA	22,58	5,95	891,11	42,60
Thréonine	11,24	NA	NA	NA	3,66	54,52	388,24	168,33
Sérine	35,75	NA	NA	NA	37,53	40,47	547,85	59,38
Phénylalanine	64,33	NA	NA	NA	31,06	79,28	NA	1199,64
Tryptophane	31,70	NA	NA	NA	21,76	70,03	NA	99,20
Histidine (RMN)	NA	NA	NA	NA	-4,43	-29,37	135,83	1298,92

L'ensemble des marqueurs retenus présentent des variations d'intensité entre les échantillons et les témoins plus importantes que celles calculées sur les mesures de pH. On peut donc en conclure qu'en plus de présenter pour certains (glucose, acide lactique, glycérol, acide aspartique) des

variations détectables plus tôt au cours du phénomène d'altération (marqueurs précoces), les marqueurs d'altération identifiés présentent des variations d'intensité plus significatives, parfois de plusieurs ordres de grandeur, que les mesures de pH. Ces résultats permettent de mettre en évidence le potentiel de ces marqueurs pour la détection de l'altération en milieu industriel.

L'identification de plusieurs marqueurs appartenant potentiellement à des mêmes voies métaboliques (par exemple le glucose, l'acide lactique et l'acide formique pour le catabolisme du glucose dans le cas de l'altération de type 1) permet aussi d'envisager un suivi des marqueurs par groupes. L'étude de ces groupes ou « Patterns » de marqueurs pourrait permettre un suivi plus fin des mécanismes biologiques impliqués dans l'altération.

5.2 Origine et mécanismes potentiels

Dans cette partie seront discutés les marqueurs d'altération identifiés dans le cadre des deux études cinétiques de l'altération. Les marqueurs retenus sont analysés par groupes en fonction des voies métaboliques dans lesquelles ils pourraient être impliqués. Les observations sont comparées avec les informations disponibles dans la littérature et mis en perspectives avec les résultats des analyses de profilage physico-chimique (suivi macroscopique).

5.2.1 Etude cinétique de l'altération de type 2 avec la souche modèle *Bacillus weihenstephanensis*

5.2.1.1 Catabolisme du glucose

L'acide lactique est un composé bien décrit dans la littérature comme représentatif du développement bactérien dans les échantillons d'œuf et d'EL. Il est naturellement présent dans les ovoproduits à hauteur de 1 à 7 mg/kg de matière sèche et représente un indice intéressant de la qualité hygiénique des ovoproduits (Hidalgo *et al.* 2008).

Comme vu dans le cadre de l'étude bibliographique, les bactéries du groupe *B. cereus* ont la capacité de cataboliser une vaste gamme de glucides, principalement via la voie d'Emden-Meyeroff mais également par la voie des pentoses phosphates (Rosenfeld *et al.* 2005 ; Zigha *et al.* 2006a ; Ouhib *et al.* 2006). Cependant, leur comportement en anaérobiose est extrêmement dépendant des sucres présents dans le milieu. Dans le cas de l'étude de Zigha *et al.* (2006b), le principal produit de dégradation du glucose formé était l'acide lactique, représentant 65% du total des produits formés. Il est probable que l'acide lactique détecté au cours de l'altération soit ici le principal produit du catabolisme du glucose contenu dans l'EL.

L'hypothèse proposée pour expliquer la diminution du signal du glucose et l'augmentation de celui de l'acide lactique serait donc liée au catabolisme du glucose réalisé principalement via la voie d'Emden-Meyeroff (ou glycolyse) comme représenté dans la Figure 89.

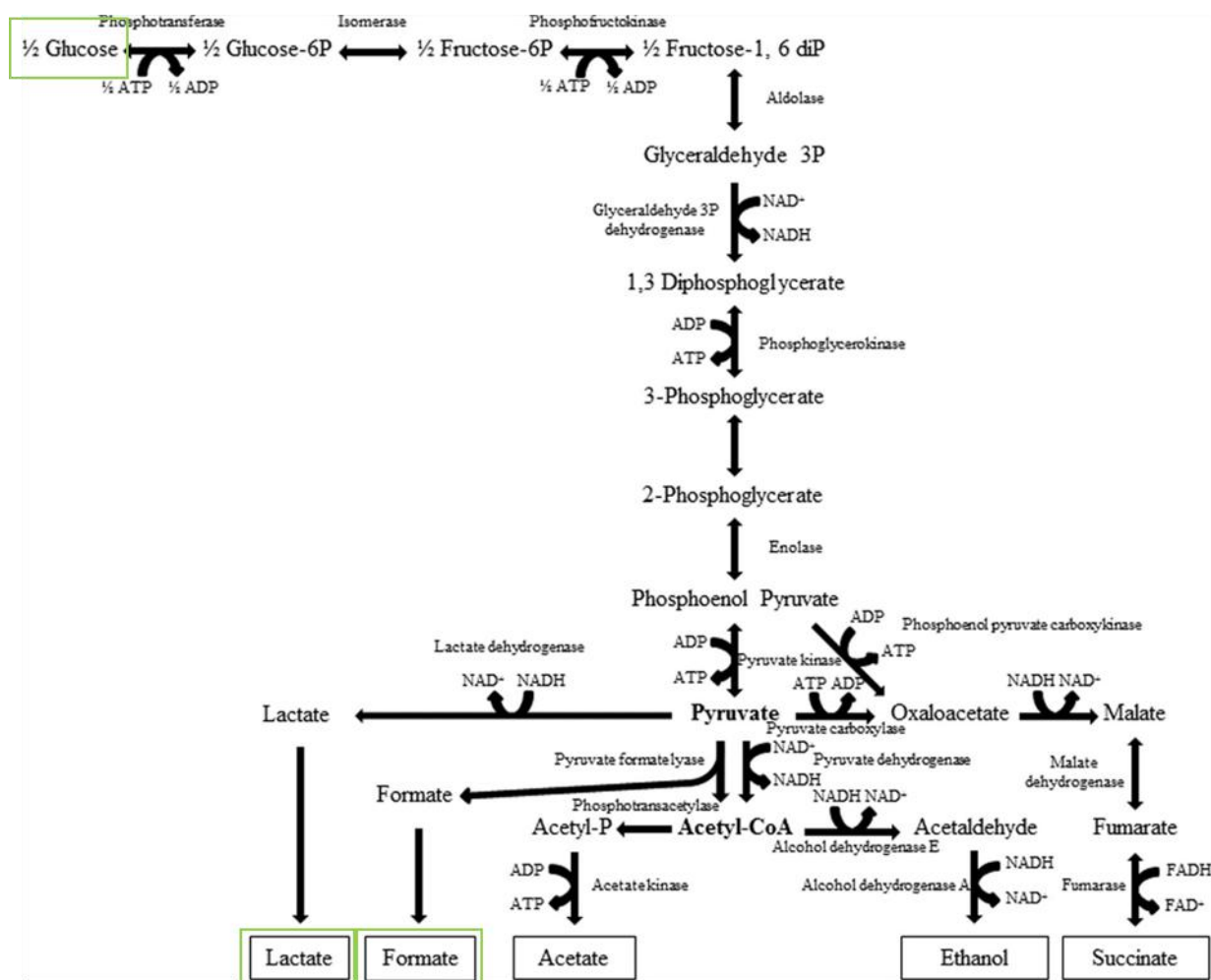


Figure 89. Métabolisme fermentatif de *B. cereus* (De Sarrau et al. 2012)

L'augmentation significative du signal de l'acide lactique coïncide avec le début de la chute significative de pH dans les échantillons (120h), ce dernier participant à l'acidification de l'EL au cours de l'altération. La modulation d'intensité de ces deux marqueurs (acide lactique et glucose) intervenant dès le point d'analyse 48h et présentant une forte intensité (FC>50 à 312h pour l'acide lactique, disparition du signal du glucose à 384h) en fait de bons candidats pour détecter de manière précoce l'altération des EL. La possibilité d'étudier les profils d'évolution d'un groupe de marqueurs représentatifs d'une voie métabolique impliquée dans l'altération (substrats, intermédiaires métaboliques, produits finaux) plutôt qu'un composé unique permettrait de suivre plus fidèlement la transformation de l'EL au cours de cette dernière.

La concentration absolue mesurée pour l'acide lactique dans les témoins et les échantillons en début d'altération est proche de 0,05 g.l⁻¹, soit environ 50 mg/kg d'EL et donc environ 200mg/kg MS (mg/kg de matière sèche). Cette concentration est nettement supérieure à celle obtenue par Hidalgo *et al.* (2008) dans des EL sains, située entre 1 et 7mg/kg MS. Les valeurs dans les échantillons en fin d'altération n'ont pas pu être calculées car en dehors de la gamme de calibration. On peut cependant confirmer que la concentration d'acide lactique dépasse les 0,19 g.l⁻¹ soit environ 1187mg/kg MS dans les échantillons au temps d'analyse 144h. Cette valeur est supérieure à la limite légale pour l'acide lactique dans les matières premières utilisées pour la production d'ovoproduits (1000mg/kg MS) suggérant bien un fort niveau de contamination au point d'analyse suivant le début de la chute significative du pH (120h).

5.2.1.2 Activités lipolytiques et catabolisme des lipides

L'hypothèse proposée pour expliquer l'augmentation du signal du glycérol est liée aux activités lipolytiques des bactéries dans l'EL. Le glycérol est un composant important des œufs puisqu'il entre dans la composition des triacylglycerols (TAG) et des phospholipides, représentant la majeure partie des lipides du jaune d'œuf (respectivement 67% et 25%) (Privett *et al.* 1962). L'augmentation de signal du glycérol pourrait être liée aux activités lipolytiques des bactéries sur les TAG et phospholipides des EL au cours de l'altération.

A notre connaissance, seules deux publications font état d'activités lipases dans le cadre de l'étude de l'altération des ovoproduits (Miller *et al.* 2010 ; Techer *et al.* 2015). Cependant, aucune bactérie du groupe *B. cereus* n'a exprimé d'activités lipolytiques dans les conditions étudiées. De plus, aucune activité lipase autre que la lécithinase n'a été détectée lors des essais en milieu inducteur (LUBEM). Les activités lipases ont pourtant été décrites dans la littérature pour différentes bactéries du genre *Bacillus* (Decimo *et al.* 2017) et du groupe *Bacillus cereus* (Montanhini *et al.* 2013)(Jan *et al.* 2018). Une explication possible réside dans la complexité du système de régulation des activités hydrolytiques des bactéries du groupe *Bacillus cereus*, reposant sur différents facteurs bactériens et des facteurs environnementaux. Il est possible que les bactéries aient exprimé une activité lipase dans les échantillons d'EL mais pas dans le milieu inducteur employé lors des analyses enzymatiques. La détection de composés présentant une variation, sans présenter de profil clairement identifiable au cours de l'étude cinétique de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis*, tels que les acides oléique, linoléique, stéarique naturellement présents dans les TAG du jaune d'œuf (Schreiner *et al.* 2006), appuie l'hypothèse d'une hydrolyse des TAG par des lipases bactériennes au cours de l'altération.

L'acide phosphorique détecté par GC-MS pourrait correspondre à des groupements phosphates libérés par l'hydrolyse enzymatique des phospholipides de l'EL. La présence d'activités lipases et phospholipases rapportée dans la littérature pour des bactéries du groupe *B. cereus* (Jan *et al.*

2018), dont certaines spécifiques de la phosphatidylcholine, et la composition de l'œuf, riche en phospholipides (principalement en phosphatidylcholine) appuie cette dernière hypothèse. L'analyse des activités enzymatiques de la souche *B. weihenstephanensis* au cours de l'altération (LUBEM) a également permis de mettre en évidence une importante activité lécithinase, détectable à partir de 120h. Cette observation serait cohérente avec l'augmentation de signal détectée pour l'acide phosphorique à partir de 144h et significative à partir de 216h d'altération.

Les propriétés émulsifiantes des œufs sont complexes et font intervenir notamment les lipoprotéines (Chang *et al.* 2016) et les phospholipides (Mine 1998). L'effet de chaque composé sur la capacité émulsifiante de l'EL est complexe à évaluer. Cependant, la dégradation nette de ces propriétés à partir du temps d'analyse 192h est cohérente avec les variations d'intensité observées pour le glycérol et l'acide phosphorique, permettant d'appuyer l'hypothèse d'une dégradation des phospholipides de l'EL par des lécithinases bactériennes au cours de l'altération.

Le glycérol et l'acide phosphorique ne sont, à notre connaissance, pas décrits dans la littérature portant sur l'analyse de la fraîcheur ou de l'altération des œufs et ovoproduits. Ces deux composés présentent le potentiel d'être employés comme marqueurs de l'altération. Le glycérol, qui présente une augmentation de signal dans les échantillons dès 48h d'analyse, pourrait, comme l'acide lactique et le glucose, permettre de détecter cette altération dans son stade précoce.

5.2.1.3 Activités protéolytiques et catabolisme des acides aminés

Les activités protéases des bactéries du groupe *Bacillus cereus* sont largement décrites dans la littérature. Selon Ivanova *et al.* (2003), la présence de nombreux gènes codant pour des enzymes protéolytiques et transporteurs d'acides aminés dans son génome montrent une préférence de ces souches pour les acides aminés. Des bactéries du groupe *B. cereus* ont été rapportées dans la littérature comme présentant des activités protéolytiques dans des desserts à base d'ovoproduits (Techer *et al.* 2015). De nombreuses peptidases et protéases sont également présentes dans le protéome extracellulaire dans le cas où les cellules sont incubées dans un milieu riche en protéines. L'activité hydrolytique sur les protéines et les peptides doit aider les cellules à utiliser les peptides exogènes comme sources d'acides aminés (Luo *et al.* 2007 ; Gohar *et al.* 2005). L'analyse des activités enzymatiques de la souche *B. weihenstephanensis* au cours de l'altération (LUBEM) a également permis de mettre en évidence une des activités protéases, détectable à partir de 112h.

Cette observation, cohérente avec l'augmentation du signal détecté pour la glutamine à partir de 144h (significative à partir de 216h), et l'abondance des protéines dans l'EL permettent de proposer comme hypothèse que l'augmentation du signal de la glutamine pourrait être liée aux activités des protéases bactériennes sur les protéines de l'EL au cours de l'altération. Il est important de noter que la glutamine, l'acide glutamique et l'acide pyroglutamique sont difficilement différenciables par GC-MS.

L'analyse des échantillons de l'étude cinétique de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis* n'ayant été réalisée que par GC-MS il est difficile de confirmer l'identité exacte du métabolite. On peut cependant dire qu'il s'agit d'un dérivé de la glutamine.

Le signal de l'acide aspartique disparaît dans les échantillons au temps d'analyse 48h. Il est de nouveau détectable aux temps d'analyses 144h et 240 avec des intensités plus faibles que dans le témoin. Il présente cependant une forte variabilité. L'hypothèse proposée pour expliquer l'évolution de ce signal est liée à celle présentée pour la leucine et la glutamine, même si l'acide aspartique présente une variation d'intensité en sens opposé. L'activité hydrolytique sur les protéines et les peptides des bactéries du groupe *B. cereus* peut être proposée comme hypothèse pour expliquer la diminution d'intensité du signal de cet acide aminé, à ceci près que ce composé serait métabolisé par les bactéries au cours de l'altération. Il pourrait s'agir d'un précurseur d'une des voies de biosynthèse bactérienne. La Figure 90 présente une carte du métabolisme de l'acide aspartique pour la souche *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 (obtenue dans la base de données KEGG Pathways). Pour l'espèce *Bacillus weihenstephanensis*, une seule souche était décrite dans les bases de données explorées, *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 (également classifiée comme *Bacillus mycoides* KBAB4) isolée d'un échantillon de sol en France. Les autres souches du groupe *Bacillus* décrites étant pour la plupart isolées de tissus biologiques humains et originaires de zones géographiques éloignées.

augmentation du temps de demi vie de la mousse). Ces observations appuient l'hypothèse d'une dégradation des protéines de l'EL liée aux activités protéolytiques bactériennes au cours de l'altération.

5.2.1.4 Conclusion sur les voies métaboliques potentiellement impliquées dans les mécanismes d'altération de type 2 de l'EL

Différents composés présentant le potentiel pour servir de marqueurs de l'altération par la souche *B. weihenstephanensis* ont été mis en évidence. On trouve parmi ces composés le glucose et son principal produit de fermentation (l'acide lactique), ainsi que des composés potentiellement liés aux activités lipolytiques (glycérol, acide phosphorique) et protéolytiques (glutamine/acide glutamique, acide aspartique). L'évolution de l'intensité de ces composés est, selon les hypothèses proposées, cohérente avec les observations effectuées dans le cadre du suivi microbiologique (activité enzymatiques) et macroscopique de l'altération (acidification, changement de couleur, dégradation des propriétés fonctionnelles).

Parmi ces composés, le glucose, l'acide lactique, le glycérol et l'acide aspartique présentent les variations détectables le plus rapidement après le début de l'altération (dès le point d'analyse 48h). Cependant, selon les résultats obtenus dans le cadre de cette étude, les variations enregistrées ne deviennent significatives qu'à partir de 120h pour l'acide lactique et 216h pour le glucose et le glycérol. La variation d'intensité de l'acide aspartique est significative dès 48h d'analyse puisque le signal n'est plus détecté dans l'échantillon. Il est cependant à nouveau détecté aux temps d'analyses 144h et 240h avec des intensités plus faibles que dans les témoins. Une analyse plus fine de l'évolution de l'intensité de ces marqueurs employant une technique telle que la LC-HRMS serait nécessaire pour permettre de valider leur potentiel comme marqueurs précoces de l'altération.

Un schéma récapitulatif des mécanismes identifiés comme potentiellement impliqués dans l'altération de type 2 par la souche *B. weihenstephanensis* est présenté dans la Figure 91.

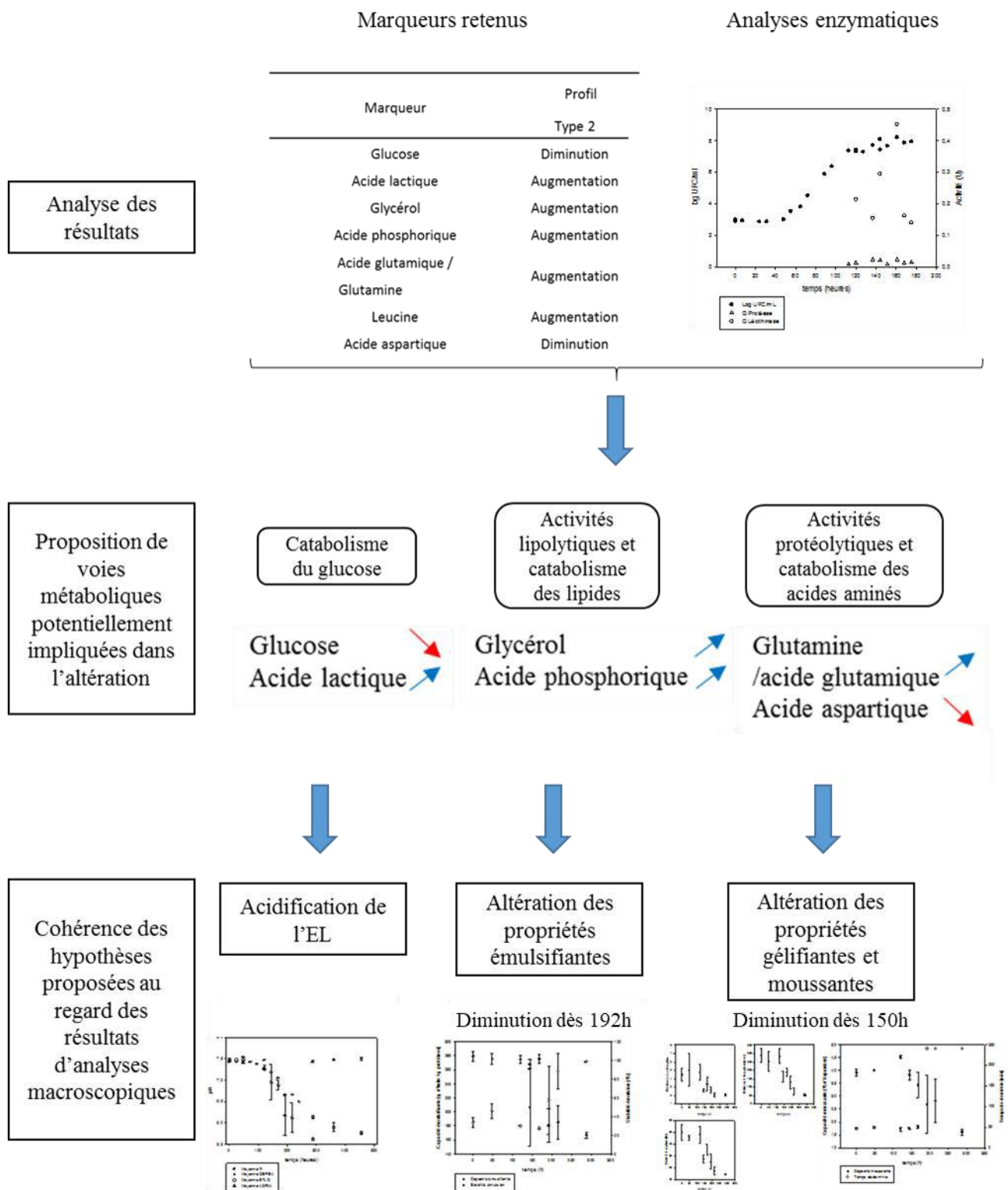


Figure 91. Schéma récapitulatif des mécanismes identifiés comme potentiellement impliqués dans l'altération de type 2 par la souche *B. weihenstephanensis*

5.2.2 Etude cinétique de l'altération de type 1 avec la souche modèle *Enterococcus faecium*

5.2.2.1 Catabolisme du glucose

- Acide lactique, acide formique

Les différentes espèces du genre *Enterococcus* ont la capacité de métaboliser entre 15 et 30 sucres différents. Toutes les espèces de ce genre partagent la capacité de métaboliser le glucose (Schleifer et Kilpper-Bälz 1984b). Les bactéries du genre *Enterococcus* étant homofermentaires, les produits finaux de leur métabolisme dépendent des conditions de culture. En anaérobiose, la voie majeure se trouve être la voie d'Emden-Meyerhoff (ou glycolyse), conduisant à la formation de lactate comme principal produit final du métabolisme. La fermentation conduit aussi à la production de quantités non négligeables d'acétate, de formiate et d'éthanol (Aguilar-Galvez *et al.* 2012). Un schéma récapitulatif du métabolisme du pyruvate chez *E. faecalis* (l'espèce la mieux décrite du genre dans la littérature) présentant les potentiels substrats pour sa synthèse (entourée d'un cercle) est présenté dans la Figure 92.

présentant des temps de rétention très distincts, une confusion entre ces deux composés lors de l'analyse est exclue.

Les variations d'intensité du glucose et de l'acide lactique sont détectables à partir de 120h et significatives à partir de 216h d'altération. Pour l'acide formique, l'intensité augmente de façon détectable au point d'analyse 216h. Le début de la chute de pH enregistrée est situé entre ces deux points d'analyse (environ 200h), confirmant que les acides lactique et formique produits participent à l'acidification de l'EL.

Ces composés représentent des marqueurs d'altération intéressants même s'ils ne permettent pas d'envisager une détection de l'altération aussi rapide que dans le cadre de l'altération de type 2 avec *B. weihenstephanensis*. Le phénomène d'altération de type 1 étant, comme vu précédemment, moins marqué que celui de type 2 sur le plan macroscopique, il est logique que les modulations d'intensité des métabolites caractéristiques de cette altération ne soient détectables qu'à un stade plus avancé.

La concentration absolue mesurée pour l'acide lactique en début d'altération (jeu de données 1) est proche de la valeur mesurée dans le cadre de l'étude de l'altération de type 2 (environ 0,07 g/l) soit environ 280 mg/kg MS (mg/kg de matière sèche). Cette concentration, est comme précédemment observé, très supérieure à celle obtenue par Hidalgo *et al.* (2008) dans des EL sains (située entre 1 et 7mg/kg MS). Les valeurs pour le jeu de données 2 présentent dans les résultats de GCMS des intensités plus faibles que pour le jeu de données 1 (non calculables pour les deux premiers points puis allant de 0,002 à 0,05 g.l-1 dans les témoins). Il est possible que les échantillons aient subi une dégradation au cours du stockage entre les deux analyses. Il est également possible que la maintenance du système analytique entre les deux analyses ai impliqué un impact sur les valeurs enregistrées pour le jeu de données 2. Les valeurs pour les échantillons du jeu de données 2 correspondant aux stades avancés de l'altération présentent des intensités élevées (jusqu'à 0,31g.l-1, soit environ 1240 mg/kg MS après 384h d'altération). Cette valeur supérieure à la limite légale pour l'acide lactique dans les matières premières utilisées pour la production d'ovoproduits (1000mg/kg MS) met en avant comme précédemment un fort niveau de contamination.

5.2.2.2 Activités lipolytiques et catabolisme des lipides

Les souches du genre *Enterococcus* semblent plus actives sur les triglycérides que les souches du genre *Streptococcus* (Dovat *et al.* 1970). Elles présentent une grande hétérogénéité d'activités lipolytiques dans les matrices alimentaires comme le lait, allant d'une activité nulle à une large gamme d'activités en termes d'acides gras (Carrasco de Mendoza *et al.* 1992). Les travaux de Miller *et al.* (2010) mettent en évidence des activités lipolytiques exprimées par des souches d'*E. faecium* et *E. faecalis* isolées d'EL altérés. Dans les travaux de Techer *et al.* (2015), la moitié des souches du

genre *Enterococcus* testées (issues de blanc d'œufs industriels) ont présenté des activités lipases détectables lors de l'altération d'une crème anglaise. Dans le cadre de cette étude, différentes traces du catabolisme des lipides sont détectées sans toutefois présenter de profils clairement identifiables. Les signaux du glycérol, et des acides stéarique, palmitique, et oléique présentent des variations non monotones et non significatives dans les différentes analyses.

L'acide fumarique est impliqué dans le métabolisme anaérobie du glycérol par les bactéries du genre *Enterococcus*. Il est nécessaire à la réoxydation du NADH au cours de réactions de réduction de l'acide fumarique en acide succinique par la fumarate réductase Ramsey *et al.* (2014). Cependant le signal de l'acide fumarique présente dans les analyses une nette augmentation (même si l'intensité du signal est très faible). Aucune hypothèse permettant d'expliquer cette augmentation n'a été trouvée.

Ces observations couplées à la capacité bien décrite dans la littérature de fermentation du glycérol par les bactéries du genre *Enterococcus*, y compris *Enterococcus faecium* (Leblanc 2006b) appuient l'hypothèse d'activités lipolytiques bactériennes au cours de l'altération sans pouvoir les confirmer. Les propriétés émulsifiantes des œufs sont, comme vu précédemment, complexes et font notamment intervenir les lipoprotéines et les phospholipides. Encore une fois, l'effet de chaque composé sur la capacité émulsifiante de l'EL est complexe à évaluer. Cependant, la dégradation nette de ces propriétés à partir du temps d'analyse 168h au cours de l'altération avec la souche *E. faecium* permet également d'appuyer l'hypothèse d'une dégradation des phospholipides de l'EL par des lécithinases bactériennes au cours de l'altération.

5.2.2.3 Activités protéolytiques

Des activités protéolytiques à faible température ont déjà été rapportées dans la littérature pour différentes souches d'*E. faecium* isolées de produits laitiers (Wessels *et al.* 1990). L'analyse des activités enzymatiques de la souche *E. faecium* au cours de l'altération par le laboratoire LUBEM n'a pas permis de mettre en évidence des activités protéases. Ces essais ayant été réalisés en milieu inducteur, il est possible que des activités enzymatiques survenant au cours de l'altération dans l'EL n'aient pas été détectées. On peut proposer comme hypothèse que l'augmentation des signaux de l'acide glutamique, de l'isoleucine, de la thréonine, de la sérine, de la phénylalanine, du tryptophane et de l'histidine dans les échantillons pourrait être liée aux activités des protéases bactériennes sur les protéines de l'EL au cours de l'altération. Il est intéressant de noter que les signaux de l'acide glutamique et du tryptophane présentent des intensités plus importantes dans les échantillons filtrés que dans les échantillons non filtrés. Le profil du signal de la sérine dans les mêmes analyses permet de préciser que ce composé est présent dans l'EL (exométabolite). Les autres composés n'ont pas été détectés ou identifiés avec un niveau de confiance suffisant dans le cadre de l'étude des échantillons filtrés.

Les activités protéolytiques pouvant également mener à la formation d'amines biogènes à partir des acides aminés libres (Ogier et Serror 2008; Benkerroum 2016), il est intéressant de noter que la variation d'intensité du signal de la cadavérine dans les résultats de profilage par GC-MS a été détectée comme significative lors des analyses de FC, sans toutefois présenter de profil réellement discriminant lors des analyses détaillées.

Les acides aminés identifiés dans cette partie représentent des marqueurs potentiels des activités protéolytiques des bactéries sur les protéines de l'EL. La modulation de l'intensité de l'acide glutamique /glutamine est la première détectable dès 48h d'analyse. Cependant, l'augmentation enregistrée dans les échantillons n'est pas significative avant le point d'analyse 216h. Pour les autres acides aminés, la variation d'intensité est détectable à 216h d'analyse et significative à 384h. Ces composés présentent également le potentiel de servir de marqueurs d'altération. Cependant, ils ne permettent pas de la détecter avant un stade plus avancé que les marqueurs issus du catabolisme du glucose.

Les propriétés de gélification des EL étant basées sur la dénaturation et la coagulation de ses protéines, il serait logique, comme proposé pour l'étude de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis*, que les activités protéases des bactéries au cours de l'altération induisent une dégradation de ces propriétés. L'étude de l'altération avec la souche *E. faecium* a permis de mettre en évidence un impact limité de l'altération sur les capacités gélifiantes de l'EL. Le seul point d'analyse où les propriétés de gélification sont significativement impactées pour certains indicateurs (distance à la rupture du gel, force à la rupture) est le dernier point d'analyse (320h). Cette observation appuie l'hypothèse d'une dégradation des protéines de l'EL liée aux activités protéolytiques bactériennes au cours de l'altération.

Les propriétés moussantes des EL également basées sur les propriétés de ses protéines présentent un profil d'évolution plus complexe (nette diminution en début de cinétique et retour proche du niveau initial au dernier point d'analyse) ne permettant pas de faire de lien avec les résultats de profilage.

5.2.2.4 Conclusion sur les voies métaboliques potentiellement impliquées dans les mécanismes d'altération de type 1 de l'EL

Différents composés présentant le potentiel de servir de marqueurs de l'altération par la souche *E. faecium* ont été mis en évidence. On trouve parmi ces composés, comme pour l'altération de type 2 (avec la souche *B. weihenstephanensis*), le glucose et son principal produit de fermentation (l'acide lactique). Un autre produit de fermentation moins abondant est également détecté dans les analyses par RMN, l'acide formique. Des composés potentiellement représentatifs des activités protéolytiques des bactéries au cours de l'altération (acide glutamique, isoleucine, thréonine, sérine,

phénylalanine, tryptophane et histidine) ont également été mis en évidence. L'évolution de l'intensité de ces composés est, selon les hypothèses proposées, cohérente avec les observations effectuées dans le cadre du suivi microbiologique (activité enzymatiques) et macroscopique de l'altération (acidification, changement de couleur, dégradation des propriétés fonctionnelles).

Aucun composé potentiellement représentatif des activités lipolytiques des bactéries au cours de l'altération n'a été retenu dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*. Différentes traces de ces activités ont pourtant été trouvées sans que des tendances claires permettent la mise en évidence de marqueurs pertinents. Les observations effectuées dans le cadre du suivi macroscopique de l'altération (acidification, changement de couleur, dégradation des propriétés fonctionnelles) tendent pourtant à confirmer l'existence d'activités lipolytiques au cours de l'altération.

Parmi ces composés, le glucose, l'acide lactique et l'acide glutamique présentent les variations détectables le plus rapidement après le début de l'altération (dès le point d'analyse 48h pour l'acide lactique et la glutamine). Cependant les variations enregistrées ne deviennent significatives qu'à partir de 216h pour l'acide lactique et l'acide glutamique et à partir de 384h pour le glucose. Une analyse plus fine de l'évolution de l'intensité de ces marqueurs serait nécessaire pour permettre de valider leur potentiel comme marqueurs précoces de l'altération.

On peut constater que les marqueurs de l'altération de type 1 présentent des variations d'intensité significatives après un temps d'altération plus long que pour l'altération de type 2. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus dans le cadre de l'analyse macroscopique de l'altération. En effet, l'altération de type 2 apparait comme un phénomène visiblement plus marqué et plus rapide que l'altération de type 1 (chute de pH, impact sur les mesures de colorimétrie et les propriétés fonctionnelles).

La Figure 93 présente un schéma récapitulatif des mécanismes identifiés comme potentiellement impliqués dans l'altération de type 1 par la souche *E. faecium*.

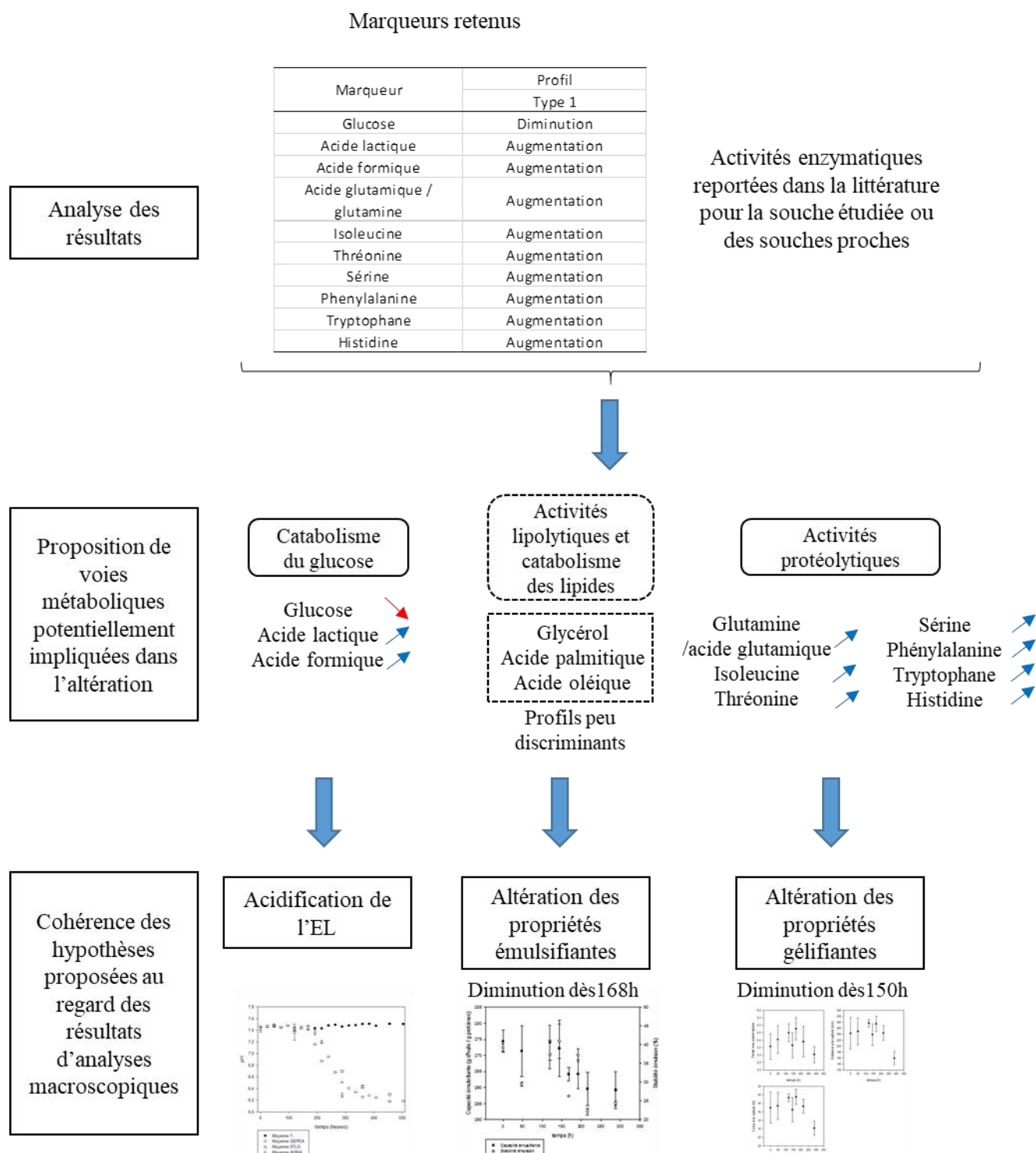


Figure 93. Schéma récapitulatif des mécanismes identifiés comme potentiellement impliqués dans l'altération de type 1 par la souche *E. faecium*

5.3 Conclusion du chapitre - perspectives

Les signatures physicochimiques des altérations de type 1 et 2 présentent des similitudes. Pour ces deux types d'altération, des marqueurs du catabolisme du glucose ont été identifiés. Les profils d'évolution de ces composés sont cependant différents, l'augmentation d'intensité du signal de l'acide lactique intervenant plus tôt dans le cadre de l'altération de type 2 (48h contre 120h pour l'altération de type 1). En plus de ces différences d'intensité de variation, il est possible de différencier les types 1 et 2 selon les autres mécanismes proposés comme impliqués dans l'altération (Figure 94).

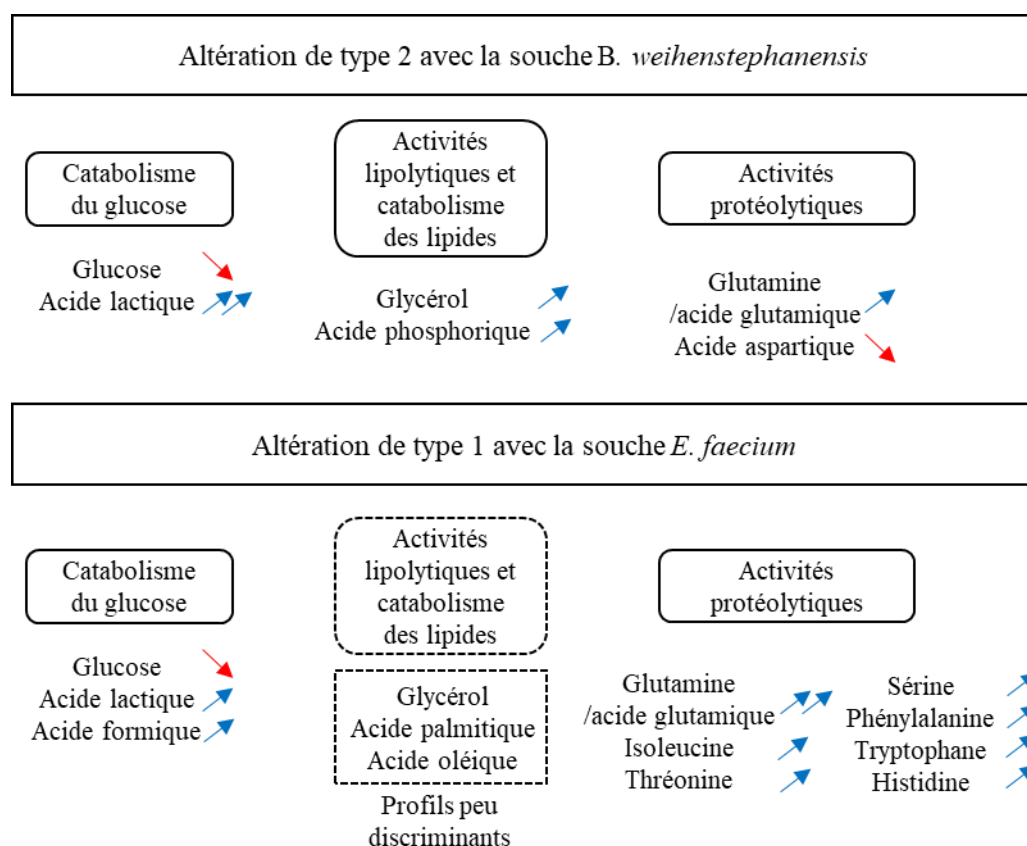


Figure 94. Mécanismes proposés comme impliqués dans les altérations de type 1 et 2 et tendance d'évolution des marqueurs.

Les marqueurs de l'activité lipolytique apparaissent plus clairement dans le cadre de l'altération de type 2 et les profils de variation d'intensité des acides aminés potentiellement liés aux activités protéolytiques sont spécifiques à chaque type d'altération. La diminution d'intensité du signal de l'acide aspartique étant spécifique de l'altération de type 2 et l'augmentation des signaux de l'isoleucine, la théonine, la sérine, la phénylalanine le tryptophane et l'histidine de l'altération de type 1. Il est donc possible de distinguer les types 1 et 2 selon les profils d'acides aminés ou des métabolites liés aux activités lipolytiques. Les informations temporelles permettraient de plus d'envisager une utilisation encore plus fine de ces marqueurs, pour la détection de l'altération à des stades précoces avec plus de finesse que les indicateurs physico-chimiques employés dans ce projet.

La Figure 95 présente un récapitulatif des différences d'évolution des profils physico-chimiques et métaboliques enregistrées au cours des altérations de type 1 et 2. Les modulations sont indiquées depuis le début de leur évolution monotone (cercle de couleur) jusqu'au point où cette modulation dépasse le seuil de significativité (rectangle de couleur).

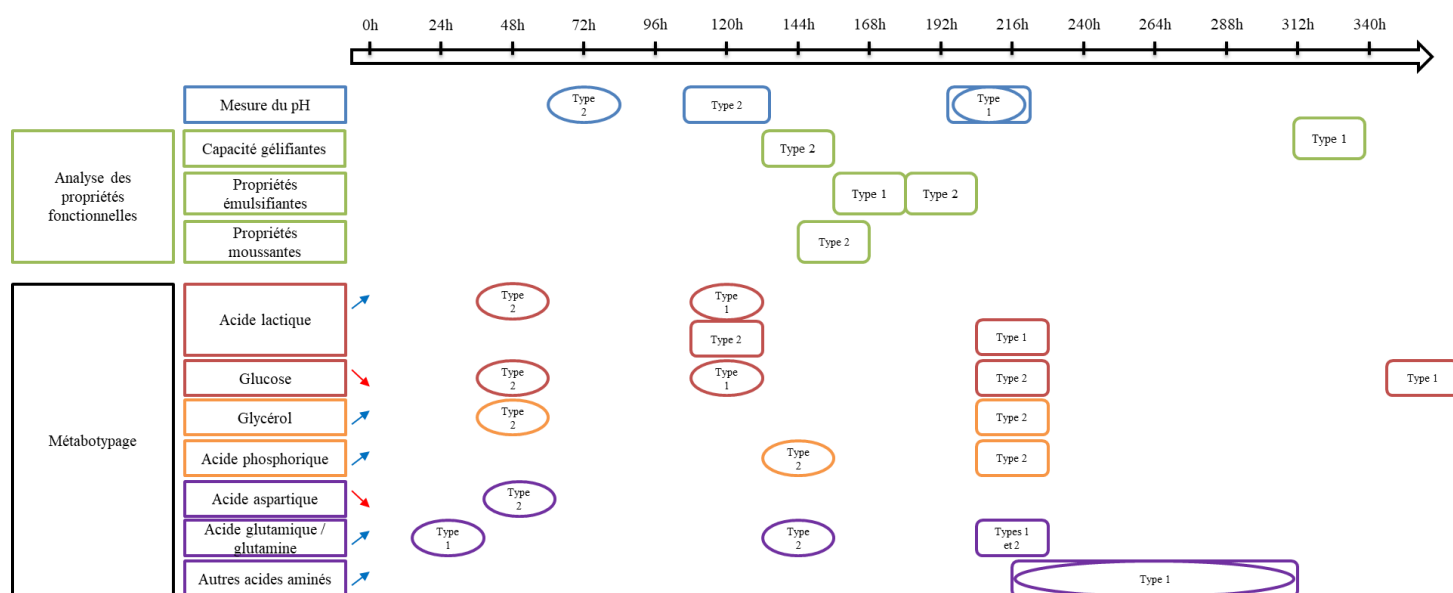


Figure 95. Schéma récapitulatif des différences de profils physico-chimiques et métaboliques enregistrées au cours des altérations de type 1 et 2 avec les souches *B. weihenstephanensis* et *E. faecium*

Les marqueurs proposés comme liés aux activités lipolytiques et protéolytiques ne présentent des variations significatives qu'à des stades tardifs de l'altération (après 216h). Le seul signal présentant une variation significative en même temps que les mesures de pH est l'acide lactique. Il est important de souligner que le seuil de variation fixé pour déterminer la significativité d'une variation d'intensité pour un métabolite (variation de 100%) est plus important que pour les mesures de pH (variation de 0,5%). Les variations d'intensité des signaux associés à l'acide lactique, au glucose, au glycérol, et à l'acide glutamique/glutamine pourraient permettre de détecter le phénomène d'altération dans son stade précoce (dès 48h d'altération), et même de préciser le type d'altération rencontré (type 1 ou type 2). D'autres marqueurs qui ne sont pas identifiés avec certitude ou dont les profils de variation sont contradictoires et/ou peu discriminants dans les différentes analyses (acides gras, acides aminés, amines biogènes, cholestérol) présenteraient également le potentiel de servir de marqueurs d'altération.

Quoiqu'il en soit, pour l'ensemble de ces composés, des méthodes de profilage ciblées, plus fines et sensibles (LC-HRMS) devront être employées afin de confirmer la pertinence de leur analyse dans le cadre de l'étude de l'altération et d'affiner la connaissance de leurs profils d'évolution. En effet, en misant sur une meilleure résolution et sensibilité de la technique analytique, il est raisonnable d'envisager l'amélioration des capacités de détection précoces de l'altération. Ainsi, il serait tout à fait

possible d'exploiter ces groupes de marqueurs simultanément, formant ainsi des « patterns » de marqueurs, caractéristiques des deux types d'altération.

Conclusion générale

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse de doctorat ont permis de mettre en évidence différents composés issus du métabolisme bactérien et présentant le potentiel de servir de marqueur de l'altération microbiologique des EL. Certains de ces marqueurs, dont la modulation d'intensité intervient tôt au cours du processus d'altération, pourraient permettre de détecter l'altération dans son stade précoce. Certains composés comme l'acide lactique sont largement décrits dans la littérature portant sur l'étude de la fraîcheur et de l'altération des œufs et des ovoproduits. D'autres comme le glucose ou le glycérol ne sont, à notre connaissance, pas décrits dans cette littérature. L'intégration des données de suivi microbiologique et macroscopique a permis de proposer des hypothèses appuyées par différentes approches (analyse du pH, dénombrement, analyse des activités enzymatiques et des propriétés fonctionnelles) quant aux voies métaboliques impliquées dans le phénomène d'altération des EL rencontré en milieu industriel. La cohérence observée entre les résultats obtenus dans le cadre des analyses d'échantillons industriels et d'échantillons reproduits en laboratoire et altérés par une souche unique dans des conditions de croissance contrôlées, a permis également de confirmer dans un contexte industriel la pertinence des résultats obtenus en laboratoire. L'identification de différents groupes de marqueurs potentiellement représentatifs de voies d'altération (par exemple : Glucose – Acides lactique et formique) permet d'envisager le suivi de l'altération à travers le suivi des profils d'intensité de ces « patterns » de marqueurs et non plus de marqueurs simples. L'analyse des FC a également permis de mettre en évidence une variation d'intensité du signal plus importante pour l'ensemble des marqueurs identifiés que pour le pH (indicateur macroscopique le plus pertinent dans le cadre de ces analyses). Ceci met en évidence le potentiel de l'approche métabolomique pour l'identification de marqueurs d'altération dans les matrices alimentaires complexes telles que l'EL.

Une lourde étape de développement méthodologique a été nécessaire en amont de ces analyses, en partie en raison de l'absence d'étude employant une approche de type métabolomique non ciblée appliquée à l'analyse de la fraîcheur et de l'altération des ovoproduits. Ces développements, ainsi que les contraintes inhérentes aux techniques hautement résolutes employées (maintenance, encrassement du détecteur,...) ont limité le nombre d'études cinétiques de l'altération réalisées et ont impliqué la séparation des analyses de la s étude cinétique (réalisée avec la souche *E. faecium*) en deux jeux de données, complexifiant ainsi leur analyse.

Différents éléments de réponse ont pu cependant être apportés concernant la question scientifique du projet à travers les hypothèses proposées quant aux voies métaboliques impliquées dans l'altération microbiologique des EL. Les études cinétiques de l'altération n'ayant été effectuées qu'une fois par souche étudiée, ces résultats devront être confirmés lors d'autres analyses afin d'assurer leur répétabilité. Une analyse employant des techniques complémentaires pourrait également

permettre de mettre en évidence d'autres marqueurs d'altération microbiologique des EL. L'utilisation de techniques (comme la GC-HRMS, la LC-HRMS ou la RMN) sur des fractions purifiées, pourrait permettre d'identifier les marqueurs présentant des profils intéressants dans le cadre de ces travaux, mais n'ayant pas pu être identifiés dans les bases de données. Des analyses des COV employant des techniques de prélèvement des espaces de tête ou un profilage des classes de lipides par HPTLC pourraient également permettre de mettre en évidence d'autres marqueurs de cette altération. Enfin, une analyse systématique des échantillons avec ou sans filtration stérilisante permettrait de caractériser plus fidèlement les différentes voies d'altération identifiées en profilant les métabolites internes et excrétés par les bactéries.

Ces travaux permettent également de proposer différentes approches pouvant être employées à plus ou moins long terme en milieu industriel pour détecter l'altération des EL. Des analyses simples pourraient être réalisées pour valider la pertinence des marqueurs proposés, incluant par exemple la mise en place de contrôles d'évolutions des profils de l'acide lactique et du glucose dans des aliquots de lots de production au cours de la production/conservation via des tests biochimiques ou enzymatiques simples. Ces tests, disponibles commercialement, sont parfois déjà employés par les industriels pour le contrôle qualité des matières premières ou des lots de produits. A plus long terme et une fois la pertinence des marqueurs d'altération confirmée et leurs profils d'évolution plus finement déterminés, on pourrait envisager la mise en place de capteurs en ligne de type Micro GC ou RMN bas champ, permettant le contrôle de l'évolution d'intensité de composés ciblés directement sur les chaînes de production (technologie NeSSI). Cette approche nécessite cependant de lever différents verrous technologiques concernant la préparation et l'analyse des échantillons en ligne.

Bibliographie

- Agaisse, Hervé, Myriam Gominet, Ole Andreas Økstad, Anne-Brit Kolstø, et Didier Lereclus. 1999. « PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis* ». *Molecular microbiology* 32 (5): 1043–1053.
- Agata, Norio, Masashi Mori, Michio Ohta, Sathorn Suwan, Ikuko Ohtani, et Minoru Isobe. 1994. « A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells ». *FEMS microbiology letters* 121 (1): 31–34.
- Agostoni, Carlo, Brunella Carratù, Concetta Boniglia, Enrica Riva, et Elisabetta Sanzini. 2000. « Free amino acid content in standard infant formulas: comparison with human milk ». *Journal of the American College of Nutrition* 19 (4): 434–438.
- Aguilar-Galvez, Ana, Robin Dubois-Dauphin, Jacqueline Destain, David Campos, et Philippe Thonart. 2012. « Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique) ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 16 (1): 67.
- Akoka, S. 2016. « Principes de base ». In *Une introduction à la RMN*, Espace pédagogique-Laboratoire CEISAM. <http://www.sciences.univ-nantes.fr/CEISAM/index.php?page=43&lang=FR>.
- Al Bulushi, Ismail M, Susan E Poole, Robert Barlow, Hilton C Deeth, et Gary A Dykes. 2010. « Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish ». *International journal of food microbiology* 138 (1): 32–38.
- Alamprese, C. 2004. « Hygienic Quality Evaluation of the Egg Product Used as Ingredient in Fresh Egg Pasta ». *Food Chemistry* 87 (2): 313–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.030>.
- Álvarez-Sánchez, B., F. Priego-Capote, et M.D. Luque de Castro. 2010. « Metabolomics Analysis I. Selection of Biological Samples and Practical Aspects Preceding Sample Preparation ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (2): 111–19. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.003>.
- Anderson, Annette C, Daniel Jonas, Ingrid Huber, Lamprini Karygianni, Johan Wölber, Elmar Hellwig, Nicole Arweiler, Kirstin Vach, Annette Wittmer, et Ali Al-Ahmad. 2016. « *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation ». *Frontiers in microbiology* 6: 1534.
- Anton, Marc. 2007. « Composition and Structure of Hen Egg Yolk ». In *Bioactive Egg Compounds*, édité par Professor Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton, et Rüdiger Schade, 1–6. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-37885-3_1.
- Arpino, Patrick J, Bobby G Dawkins, et FW McLafferty. 1974. « A liquid chromatography/mass spectrometry system providing continuous monitoring with nanogram sensitivity ». *Journal of Chromatographic Science* 12 (10): 574–578.
- Bach, H-J, D Errampalli, KT Leung, H Lee, A Hartmann, JT Trevors, et JC Munch. 1999. « Specific detection of the gene for the extracellular neutral protease of *Bacillus cereus* by PCR and blot hybridization ». *Applied and environmental microbiology* 65 (7): 3226–3228.
- Bach, H-J, A Hartmann, M Schloter, et JC Munch. 2001. « PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil ». *Journal of Microbiological Methods* 44 (2): 173–182.
- Baron, Florence, Marie-Francoise Cochet, Noel Grosset, Marie-Noelle Madec, Romain Briandet, Sabine Dessaigne, Severine Chevalier, Michel Gautier, et Sophie Jan. 2007. « Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products ». *Journal of food protection* 70 (12): 2782–2791.
- Baron, Florence, et Sophie Jan. 2010. « Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits. » *Productions Animales* 23 (2): 193.
- Baron, Florence, et SOPHIE Rehault. 2007. « Compounds with antibacterial activity ». In *Bioactive egg compounds*, 191–198. Springer, Berlin.
- Barry, Catherine. 2015. « Production des IAA en 2013 ». *Agreste - Chiffres et Données - Agroalimentaire* 180. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/branches180iaa.pdf>.

- Becker, M, T Zweckmair, A Forneck, T Rosenau, A Potthast, et F Liebner. 2013. « Evaluation of different derivatisation approaches for gas chromatographic–mass spectrometric analysis of carbohydrates in complex matrices of biological and synthetic origin ». *Journal of Chromatography A* 1281: 115–126.
- Bell, Steven EJ, D Thorburn Burns, Andrew C Dennis, et James S Speers. 2000. « Rapid analysis of ecstasy and related phenethylamines in seized tablets by Raman spectroscopy ». *Analyst* 125 (3): 541–544.
- Benkerroum, Noreddine. 2016. « Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15 (4): 801–826.
- Blum, Marc-Michael, et Harald John. 2012. « Historical Perspective and Modern Applications of Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR): Modern Applications of ATR-FTIR ». *Drug Testing and Analysis* 4 (3-4): 298-302. <https://doi.org/10.1002/dta.374>.
- Blume, K., K. Dietrich, S. Lilienthal, W. Ternes, et A.M. Drotleff. 2015. « Exploring the Relationship between Protein Secondary Structures, Temperature-Dependent Viscosities, and Technological Treatments in Egg Yolk and LDL by FTIR and Rheology ». *Food Chemistry* 173 (avril): 584-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.084>.
- Board, RG. 2000. « Eggs and egg products ». In *Microbiological safety and quality of food*, Aspen Publisher, Maryland, 590-619. Lund B, Baird-Parker TC and Gould GW.
- Board, Ronald George, et Roy Fuller. 1994. *Microbiology of the avian egg*. Springer.
- Bobbie, Ronald J., et David C. White. 1980. « Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters ». *Applied and Environmental Microbiology* 39 (6): 1212–1222.
- Bölling, Christian, et Oliver Fiehn. 2005. « Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation ». *Plant physiology* 139 (4): 1995–2005.
- Bouř, Petr, et Timothy A. Keiderling. 2003. « Empirical Modeling of the Peptide Amide I Band IR Intensity in Water Solution ». *The Journal of Chemical Physics* 119 (21): 11253-62. <https://doi.org/10.1063/1.1622384>.
- Boyer, Rodney. 1986. *Modern experimental biochemistry*. Pearson Education India.
- BROWN, MONA L, D MICHAEL HOLBROOK, EDWARD F HOERNING, MICHAEL G LEGENDRE, et ALLEN J ST. ANGELO. 1986. « Volatile indicators of deterioration in liquid egg products ». *Poultry Science* 65 (10): 1925–1933.
- Caboni, M, E Boselli, M Messina, V Velazco, A Fratianni, G Panfili, et E Marconi. 2005. « Effect of Processing and Storage on the Chemical Quality Markers of Spray-Dried Whole Egg ». *Food Chemistry* 92 (2): 293-303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.025>.
- Campagna, Shawn R., Jessica R. Gooding, et Amanda L. May. 2009. « Direct Quantitation of the Quorum Sensing Signal, Autoinducer-2, in Clinically Relevant Samples by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Analytical Chemistry* 81 (15): 6374-81. <https://doi.org/10.1021/ac900824j>.
- Campbell, JJR, et IC Gunsalus. 1944. « Citric acid fermentation by streptococci and lactobacilli ». *Journal of bacteriology* 48 (1): 71.
- Canet, D., J-C. Boubel, et E. Canet Soulas. 2002. *La RMN, Concepts, méthodes et applications*. Dunod. Paris.
- Cansell, Maud. 2007. « Use of Egg Compounds for Cosmetics and Pharmaceuticals ». In *Bioactive egg compounds*. Springer, Berlin.
- Carrasco de Mendoza, M, HE Scarinci, M del Huerto Garat, et AC Simonetta. 1992. « Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities ». *MAN Microbiologie, aliments, nutrition* 10 (3): 289–293.
- Carratù, Brunella, Concetta Boniglia, Francesco Scalise, Amalia Maria Ambruzzi, et Elisabetta Sanzini. 2003. « Nitrogenous components of human milk: non-protein nitrogen, true protein and free amino acids ». *Food Chemistry* 81 (3): 357–362.
- Casaburi, Annalisa, Paola Piombino, George-John Nychas, Francesco Villani, et Danilo Ercolini. 2015. « Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage ». *Food microbiology* 45: 83–102.

- Cavaliere, Brunella, Antonio De Nino, Fourati Hayet, Aida Lazez, Barbara Macchione, Cossentini Moncef, Enzo Perri, Giovanni Sindona, et Antonio Tagarelli. 2007. « A Metabolomic Approach to the Evaluation of the Origin of Extra Virgin Olive Oil: A Convenient Statistical Treatment of Mass Spectrometric Analytical Data ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (4): 1454-62. <https://doi.org/10.1021/jf062929u>.
- Cevallos-Cevallos, Juan Manuel, et Jose Ignacio Reyes-De-Corcuera. 2012. « Metabolomics in Food Science. » *Advances in Food and Nutrition Research* 67: 1-24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394598-3.00001-0>.
- Chang, Cuihua, Fuge Niu, Yujie Su, Yan Qiu, Luping Gu, et Yanjun Yang. 2016. « Characteristics and emulsifying properties of acid and acid-heat induced egg white protein ». *Food Hydrocolloids* 54: 342–350.
- Charalambous, George, éd. 1984. *Analysis of foods and beverages: modern techniques*. Food science and technology. Orlando: Academic Press.
- Chen, L, T Coolbear, et R.M Daniel. 2004. « Characteristics of Proteinases and Lipases Produced by Seven Bacillus Sp. Isolated from Milk Powder Production Lines ». *International Dairy Journal* 14 (6): 495-504. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.006>.
- Chen, LDRM, Roy M. Daniel, et Tim Coolbear. 2003. « Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders ». *International dairy journal* 13 (4): 255–275.
- Chen, T. T., J. F. Owen, R. K. Chang, et B. L. Laube. 1982. « SURFACE-ENHANCED RAMAN-SCATTERING OF WATER ADSORBED ON SILVER ELECTRODES ». *Chemical Physics Letters* 89 (4): 356-61. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(82\)83515-x](https://doi.org/10.1016/0009-2614(82)83515-x).
- Cluff, K., G. Konda Naganathan, D. Jonnalagada, I. Mortensen, R. Wehling, et J. Subbiah. 2016. « Determination of Yolk Contamination in Liquid Egg White Using Raman Spectroscopy ». *Poultry Science* 95 (7): 1702-8. <https://doi.org/10.3382/ps/pew095>.
- Coat, Rémy, Boris Gouilleux, Gérald Thouand, Ali Assaf, Abdellah Arhaliass, Jack Legrand, Anne Thierry, et al. 2018. « Description of the analytical approaches applicable to the ovoproduct matrix ». In *Characterizing the alteration of ovoproducts using new analytical approaches - from metabolomics to on line control*, ISTE - Sous presse.
- Coat, Rémy, Valeria Montalescot, Esteban Serrano León, Delphine Kucma, Candice Perrier, Sébastien Jubeau, Gérald Thouand, Jack Legrand, Jérémy Pruvost, et Olivier Gonçalves. 2014. « Unravelling the matrix effect of fresh sampled cells for in vivo unbiased FTIR determination of the absolute concentration of total lipid content of microalgae ». *Bioprocess and biosystems engineering* 37 (11): 2175–2187.
- Connell, Jodi L, Aimee K Wessel, Matthew R Parsek, Andrew D Ellington, Marvin Whiteley, et Jason B Shear. 2010. « Probing prokaryotic social behaviors with bacterial “lobster traps” ». *MBio* 1 (4): e00202–10.
- Correa, EC, V Diaz-Barcos, J Fuentes-Pila, P Barreiro, et MC Gonzalez. 2008. « Modeling ovoproduct spoilage with red LED light ». In *IV International Symposium on Applications of Modelling as an Innovative Technology in the Agri-Food-Chain: Model-IT 802*, 265–272.
- Courant, Frédérique, Arnaud Martzloff, Graziella Rabin, Jean-Philippe Antignac, Bruno Le Bizec, Patrick Giraudeau, Illa Tea, et al. 2013. « How Metabolomics Can Contribute to Bio-Processes: A Proof of Concept Study for Biomarkers Discovery in the Context of Nitrogen-Starved Microalgae Grown in Photobioreactors ». *Metabolomics* 9 (6): 1286-1300. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0532-y>.
- Dabija, ADRIANA, et Cristian Aurel Hatnean. 2014. « Study concerning the quality of apple vinegar obtained through classical method ». *J Agroaliment Process Technol* 20 (4): 304–310.
- Dalle Zotte, Antonella, Paolo Berzaghi, Lisa-Marie Jansson, et Igino Andrighetto. 2006. « The Use of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) in the Prediction of Chemical Composition of Freeze-Dried Egg Yolk and Discrimination between Different N–3 PUFA Feeding Sources ». *Animal Feed Science and Technology* 128 (1-2): 108-21. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2005.09.009>.
- Davies, T. 1998. « The new automated mass spectrometry deconvolution and identification system (AMDIS) ». *Spectroscopy Europe* 10 (3): 24–27.

- De Keersmaecker, Sigrid CJ, Kathleen Sonck, et Jos Vanderleyden. 2006. « Let LuxS speak up in AI-2 signaling ». *TRENDS in Microbiology* 14 (3): 114–119.
- De Sarrau, Benoit, Thierry Clavel, Caroline Clerté, Frédéric Carlin, Christian Giniès, et others. 2012. « Influence of anaerobiosis and low temperature on *Bacillus cereus* growth, metabolism, and membrane properties ». *Applied and environmental microbiology* 78 (6): 1715–1723.
- Decimo, Marilù, Milena Brasca, Juan A Ordóñez, et M Concepción Cabeza. 2017. « Fatty Acids Released from Cream by Psychrotrophs Isolated from Bovine Raw Milk ». *International Journal of Dairy Technology* 70 (3): 339–44. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12347>.
- Delarozadelgado, B, A Soldado, A Martinezfernandez, F Vicente, A Garridovalo, D Perezmarin, M Delahaba, et J Guerreroginel. 2007. « Application of Near-Infrared Microscopy (NIRM) for the Detection of Meat and Bone Meals in Animal Feeds: A Tool for Food and Feed Safety ». *Food Chemistry* 105 (3): 1164–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.041>.
- Delmer. 1978. « L'utilisation des oeufs et ovoproduits en industrie agro-alimentaire ». *Journées d'étude sur les oeufs et ovoproduits*. 11-13, 1978.
- Dettmer, Katja, Nadine Nürnberger, Hannelore Kaspar, Michael A. Gruber, Martin F. Almstetter, et Peter J. Oefner. 2011. « Metabolite Extraction from Adherently Growing Mammalian Cells for Metabolomics Studies: Optimization of Harvesting and Extraction Protocols ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (3): 1127–39. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4425-x>.
- DIEM, M, éd. 1993. *Introduction to Vibrational Spectroscopy*. John Wiley.
- Diomandé, Sara E, Christophe Nguyen-The, Marie-Hélène Guinebretière, Véronique Broussolle, et Julien Brillard. 2015. « Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation ». *Frontiers in microbiology* 6.
- Dovat, AM, GW Reinbold, EG Hammond, et ER Vedamuthu. 1970. « Lipolytic and proteolytic activity of enterococci and lactic group streptococci isolated from young Cheddar cheese ». *Journal of Milk and Food Technology* 33 (9): 365–372.
- Driessen, AJ, Eddy J Smid, et Wil N Konings. 1988. « Transport of diamines by *Enterococcus faecalis* is mediated by an agmatine-putrescine antiporter. » *Journal of bacteriology* 170 (10): 4522–4527.
- Dunn, WB, et DI Ellis. 2005. « Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies ». *Trends in Analytical Chemistry* 24 (4): 285–94.
- Duport, Catherine, Assia Zigha, Eric Rosenfeld, et Philippe Schmitt. 2006. « Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system ». *Journal of bacteriology* 188 (18): 6640–6651.
- Edwards, Susan T, et William E Sandine. 1981. « Public Health Significance of Amines in Cheese1 ». *Journal of Dairy Science* 64 (12): 2431–2438.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2014. « Scientific Opinion on the Public Health Risks of Table Eggs Due to Deterioration and Development of Pathogens: Public Health Risks of Table Eggs Due to Deterioration and Development of Pathogens ». *EFSA Journal* 12 (7): 3782. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3782>.
- ELSWYK, ME, A. R. Sams, et P. S. Hargis. 1992. « Composition, functionality, and sensory evaluation of eggs from hens fed dietary menhaden oil ». *journal of Food Science* 57 (2): 342–344.
- Erbersdobler, Helmut F., et Veronika Somoza. 2007. « Forty Years of Furosine – Forty Years of Using Maillard Reaction Products as Indicators of the Nutritional Quality of Foods ». *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (4): 423–30. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600154>.
- Ernst, R.R., G. Bodenhausen, et A. Wokaun. 1987. *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*. Oxford Science Publications. Oxford.
- Fernández Pierna, J.A., P. Vermeulen, O. Amand, A. Tossens, P. Dardenne, et V. Baeten. 2012. « NIR Hyperspectral Imaging Spectroscopy and Chemometrics for the Detection of Undesirable Substances in Food and Feed ». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 117 (août): 233–39. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.02.004>.
- Fiehn, Oliver. 2002. « Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes ». In *Functional Genomics*, 155–171. Springer.

- Finer, E.G., A.G. Flook, et H. Hauser. 1971. « The nature and origin of the NMR spectrum of unsonicated and sonicated aqueous egg yolk lecithin dispersions ». *Biochim. Biophys. Acta* 260: 59-69.
- FranceAgriMer. 2015. « Fiche filière 2014 - Oeufs de consommation et ovoproduits ». <http://www.franceagrimer.fr/content/download/39054/361017/file/Fiche%20fili%C3%A8re%202014%20-%20Oeufs%20-%20FR.pdf>.
- . 2016. « Note de conjoncture - Conseil spécialisé viandes blanches - Données filières avicoles arrêtées au 29 mars 2016 ». <http://www.franceagrimer.fr/content/download/44330/423068/file/STA-VBL-VOL-2016-03-29.pdf>.
- Fricker, Martina, Rolf Reissbrodt, et Monika Ehling-Schulz. 2008. « Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus* ». *International journal of food microbiology* 121 (1): 27-34.
- Furlan, Ping Y., Steven A. Scott, et Margaret H. Peaslee. 2007. « FTIR-ATR Study of PH Effects on Egg Albumin Secondary Structure ». *Spectroscopy Letters* 40 (3): 475-82. <https://doi.org/10.1080/00387010701295950>.
- Galobart, J., A. C. Barroeta, M. D. Baucells, L. Cortinas, et F. Guardiola. 2001. « α -Tocopherol transfer efficiency and lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with ω -3 polyunsaturated fatty acids ». *Poultry Science* 80 (10): 1496-1505.
- Gardini, Fausto, Yesim Özogul, Giovanna Suzzi, Giulia Tabanelli, et Fatih Özogul. 2016. « Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review ». *Frontiers in microbiology* 7.
- Gauthier, Didier. 2009. « Siitub pro - Précipitation des protéines ». http://professeur.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/files/umcm-gauthier_didier/wf/wf/documents/siitub%20pro%20precipit.docx.
- Giacomoni, Franck, Gildas Le Corguillé, Misharl Monsoor, Marion Landi, Pierre Pericard, Mélanie Pétéra, Christophe Duperier, et al. 2014. « Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics ». *Bioinformatics* 31 (9): 1493-1495.
- Giunchi, Alessandro, Annachiara Berardinelli, Luigi Ragni, Angelo Fabbri, et Florina Aurelia Silaghi. 2008. « Non-Destructive Freshness Assessment of Shell Eggs Using FT-NIR Spectroscopy ». *Journal of Food Engineering* 89 (2): 142-48. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.013>.
- Gohar, Michel, Nathalie Gilois, Richard Graveline, Christelle Garreau, Vincent Sanchis, et Didier Lereclus. 2005. « A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes ». *Proteomics* 5 (14): 3696-3711.
- Goulden, J. D. S. 1964. « Analysis of milk by infra-red absorption ». *Journal of Dairy Research* 31 (3): 273-284.
- Grass, Gregor, Angelika Schierhorn, Eduard Sorkau, Helmut Müller, Peter Rücknagel, Dietrich H Nies, et Beate Fricke. 2004. « Camelysin is a novel surface metalloproteinase from *Bacillus cereus* ». *Infection and immunity* 72 (1): 219-228.
- Guérin-Dubiard, Catherine, M Anton, J. Gautron, Y. Nys, et F Nau. 2010. *Composition de l'oeuf. Science et technologie de l'oeuf, volume 2: de l'oeuf aux ovoproduits*. Lavoisier. <https://books.google.fr/books?id=7c3uAQAAQBAJ>.
- Guérin-Dubiard, Catherine, Maryvonne Pasco, Daniel Mollé, Colette Désert, Thomas Croguennec, et Françoise Nau. 2006. « Proteomic analysis of hen egg white ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (11): 3901-3910.
- Guitton, Yann, Marie Tremblay-Franco, Gildas Le Corguillé, Jean-François Martin, Mélanie Pétéra, Pierrick Roger-Mele, Alexis Delabrière, et al. 2017. « Create, run, share, publish, and reference your LC-MS, FIA-MS, GC-MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 93: 89-101.
- Guzmán, Elena, Vincent Baeten, Juan Antonio Fernández Pierna, et José A García-Mesa. 2011. « Application of low-resolution Raman spectroscopy for the analysis of oxidized olive oil ». *Food Control* 22 (12): 2036-2040.

- Hanai, Toshihiko, éd. 1991. *Liquid chromatography in biomedical analysis*. Journal of chromatography library, v. 50. Amsterdam ; New York: Elsevier.
- Hansen, Steen, Stig Pedersen-Bjergaard, et Knut Rasmussen. 2011. « IR Spectrophotometry ». In *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*, 103–114. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119953647.ch8>.
- Hasunuma, T., F. Kikuyama, M. Matsuda, S. Aikawa, Y. Izumi, et A. Kondo. 2013. « Dynamic Metabolic Profiling of Cyanobacterial Glycogen Biosynthesis under Conditions of Nitrate Depletion ». *Journal of Experimental Botany* 64 (10): 2943–54. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert134>.
- Heaney, Robert K., et R. Frank Curtis. 1976. « Some further studies on incubator reject eggs ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27 (11): 1057–1063.
- Hergenrother, Paul J, Mark R Spaller, Michelle K Haas, et Stephen F Martin. 1995. « Chromogenic assay for phospholipase C from *Bacillus cereus* ». *Analytical biochemistry* 229 (2): 313–316.
- Hesterberg, Karoline, Sabine Schanzer, Alexa Patzelt, Wolfram Sterry, Joachim W Fluhr, Martina C Meinke, Jürgen Lademann, et Maxim E Darwin. 2012. « Raman spectroscopic analysis of the carotenoid concentration in egg yolks depending on the feeding and housing conditions of the laying hens ». *Journal of Biophotonics* 5 (1): 33–39.
- Hidalgo, A., M. Rossi, C. Pompei, et E. Casiraghi. 2004. « URACIL AS AN INDEX OF HYGIENIC QUALITY IN EGG PRODUCTS. » *Italian journal of food science* 16 (4). <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=11201770&AN=15562836&h=04W7Ky400bOXYX6L13P2E88X9Jl8vNfGSehq8x7%2FKaGTIUumyyICepxeNcBlkyAwjV6iBa7ULrU%2FC9zdNlkDsw%3D%3D&crl=c>.
- Hidalgo, Alyssa, Laura Franzetti, Margherita Rossi, et Carlo Pompei. 2008. « Chemical Markers for the Evaluation of Raw Material Hygienic Quality in Egg Products ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (4): 1289–97. <https://doi.org/10.1021/jf072201t>.
- Hidalgo, Alyssa, Margherita Rossi, et Carlo Pompei. 1995. « Furosine as a freshness parameter of shell eggs ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (6): 1673–1677.
- . 2006. « Estimation of equivalent egg age through furosine analysis ». *Food Chemistry* 94 (4): 608–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.022>.
- Hondal, Robert J., Zhong Zhao, Alexander V. Kravchuk, Hua Liao, Suzette R. Riddle, Xiangjun Yue, Karol S. Bruzik, et Ming-Daw Tsai. 1998. « Mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C: a unified view of the mechanism of catalysis ». *Biochemistry* 37 (13): 4568–4580.
- Horning, EC, DI Carroll, I Dzidic, KD Haegele, MG Horning, et RN Stillwell. 1974. « Liquid chromatograph—mass spectrometer—computer analytical systems: A continuous-flow system based on atmospheric pressure ionization mass spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 99: 13–21.
- Huang, Chien-Jui, Jia-Fang Tsay, Shu-Yu Chang, Hsiu-Ping Yang, Wen-Shi Wu, et Chao-Ying Chen. 2012. « Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L ». *Pest management science* 68 (9): 1306–1310.
- Huege, Jan, Ronan Sulpice, Yves Gibon, Jan Lisec, Karin Koehl, et Joachim Kopka. 2007. « GC-EI-TOF-MS analysis of in vivo carbon-partitioning into soluble metabolite pools of higher plants by monitoring isotope dilution after 13 CO₂ labelling ». *Phytochemistry* 68 (16): 2258–2272.
- Hugenholtz, Jeroen, Leo Perdon, et Tjakko Abee. 1993. « Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during citrate metabolism ». *Applied and environmental microbiology* 59 (12): 4216–4222.
- Hušek, Petr. 1998. « Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents ». *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 717 (1): 57–91.
- Ibáñez, Clara, Virginia García-Cañas, Alberto Valdés, et Carolina Simó. 2013. « Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 52: 100–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.06.015>.
- Ibanez, Clara, Carolina Simo, Virginia Garcia-Canas, Tanize Acunha, et Alejandro Cifuentes. 2015. « The Role of Direct High-Resolution Mass Spectrometry in Foodomics. » *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (21): 6275–87. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8812-1>.

- « Infos filière CNPO - Interprofession des oeufs - Source ITAVI ». 2018. <http://oeuf-info.fr/infos-filiere/les-chiffres-cles/>.
- Ivanov, IT, S Boytcheva, et G Mihailova. 1999. « Parallel study of thermal resistance and permeability barrier stability of *Enterococcus faecalis* as affected by salt composition, growth temperature and pre-incubation temperature ». *Journal of thermal biology* 24 (4): 217–227.
- Ivanova, Natalia, Alexei Sorokin, Iain Anderson, Nathalie Galleron, Benjamin Candelon, Vinayak Kapatral, Anamitra Bhattacharyya, et al. 2003. « Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis* ». *Nature* 423 (6935): 87–91.
- Jacob, Daniel, Catherine Deborde, Marie Lefebvre, Mickael Maucourt, et Anick Moing. 2017. « NMRProcFlow: A graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics ». *Metabolomics* 13 (4): 36.
- Jan, S., N. Brunet, C. Techer, C. Le Maréchal, A.Z. Koné, N. Grosset, M.F. Cochet, et al. 2011. « Biodiversity of Psychrotrophic Bacteria of the *Bacillus Cereus* Group Collected on Farm and in Egg Product Industry ». *Food Microbiology* 28 (2): 261–65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.029>.
- Jan, Sophie, Florence Baron, Rémy Coat, et Olivier Gonçalves. 2018. « Physicochemical and microbiological alteration of the ovoproduct matrix ». In *Characterizing the alteration of ovoproducts using new analytical approaches - from metabolomics to on line control*, ISTE - sous presse.
- Jett, Bradley D., Mark M. Huycke, et Michael S. Gilmore. 1994. « Virulence of enterococci. » *Clinical microbiology reviews* 7 (4): 462–478.
- Johnson, Brandy J, Baochuan Lin, Robert A Rubin, et Anthony P Malanoski. 2009. « Media acidification by *Escherichia coli* in the presence of cranberry juice ». *BMC research notes* 2 (1): 226.
- Kanani, Harin, Panagiotis K Chrysanthopoulos, et Maria I Klapa. 2008. « Standardizing GC–MS metabolomics ». *Journal of Chromatography B* 871 (2): 191–201.
- KANG, KYUNG R., GEETHA CHERIAN, et JEONG S. SIM. 1998. « Tocopherols, retinol and carotenes in chicken egg and tissues as influenced by dietary palm oil ». *Journal of food science* 63 (4): 592–596.
- Karoui, Romdhane, Bart Kemps, Flip Bamelis, Bart De Ketelaere, Eddy Decuypere, et Josse De Baerdemaeker. 2006. « Methods to Evaluate Egg Freshness in Research and Industry: A Review ». *European Food Research and Technology* 222 (5-6): 727–32. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0145-4>.
- Karoui, Romdhane, Bart De Ketelaere, Bart Kemps, Flip Bamelis, Kristof Mertens, et Josse De Baerdemaeker. 2009. « Chapter 15 - Eggs and Egg Products ». In *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, édité par Da-Wen Sun, 399–414. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00015-8>.
- Karoui, Romdhane, Gérard Mazerolles, et Éric Dufour. 2003. « Spectroscopic Techniques Coupled with Chemometric Tools for Structure and Texture Determinations in Dairy Products ». *International Dairy Journal* 13 (8): 607–20. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00076-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00076-1).
- Keeler, J. 2010. *Understanding NMR Spectroscopy -second edition*. John Wiley & Sons. Cambridge.
- Kindt, Ruben t', Kris Morreel, Dieter Deforce, Wout Boerjan, et Jan Van Bocxlaer. 2009. « Joint GC–MS and LC–MS platforms for comprehensive plant metabolomics: Repeatability and sample pre-treatment ». *Journal of Chromatography B* 877 (29): 3572–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.08.041>.
- Knecht, Rene, et Jui Yoa Chang. 1986. « Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysis and derivatization with (dimethylamino) azobenzenesulfonyl chloride ». *Analytical chemistry* 58 (12): 2375–2379.
- Kneipp, Janina, Tom Bakker Schut, Mike Kliffen, Marian Menke-Pluijmers, et Gerwin Puppels. 2003. « Characterization of breast duct epithelia: a Raman spectroscopic study ». *Vibrational spectroscopy* 32 (1): 67–74.
- Kogelnik, H., et S. P. S. Porto. 1963. « CONTINUOUS HELIUM-NEON RED LASER AS A RAMAN SOURCE ». *Journal of the Optical Society of America* 53 (12): 1446-. <https://doi.org/10.1364/josa.53.001446>.

- Kominek, Leo A, et H Orin Halvorson. 1965. « Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus* ». *Journal of bacteriology* 90 (5): 1251–1259.
- Kopka, Joachim, Alisdair Fernie, Wolfram Weckwerth, Yves Gibon, et Mark Stitt. 2004. « Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations ». *Genome biology* 5 (6): 109.
- Krishna, C. Murali, Ganesh D. Sockalingum, Gregory Kegelaer, Sylvain Rubin, Vasudevan B. Kartha, et Michel Manfait. 2005. « Micro-Raman Spectroscopy of Mixed Cancer Cell Populations ». *Vibrational Spectroscopy* 38 (1-2): 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.018>.
- Kuhl, Carsten, Ralf Tautenhahn, Christoph Böttcher, Tony R. Larson, et Steffen Neumann. 2012. « CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets ». *Analytical Chemistry* 84 (1): 283-89. <https://doi.org/10.1021/ac202450g>.
- Kuksis, Aris. 1992. « Yolk lipids ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1124 (3): 205–222.
- Kushner, Donn J. 1957. « An evaluation of the egg-yolk reaction as a test for lecithinase activity ». *Journal of bacteriology* 73 (3): 297.
- Laca, Amanda, Benjamín Paredes, et Mario Díaz. 2010. « A Method of Egg Yolk Fractionation. Characterization of Fractions ». *Food Hydrocolloids* 24 (4): 434-43. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.010>.
- Ladero, Victor, María Fernández, Marina Calles-Enríquez, Esther Sánchez-Llana, Elena Cañedo, M Cruz Martín, et Miguel A Alvarez. 2012. « Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? » *Food microbiology* 30 (1): 132–138.
- Lai, Shu-Mei, J. Ian Gray, et Matthew E. Zabik. 1995. « Evaluation of Solid Phase Extraction and Gas Chromatography for Determination of Cholesterol Oxidation Products in Spray-Dried Whole Egg ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (5): 1122-26. <https://doi.org/10.1021/jf00053a002>.
- Lancefield, Rebecca C. 1933. « A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci ». *Journal of experimental medicine* 57 (4): 571–595.
- Lang, Imke, Ladislav Hodac, Thomas Friedl, et Ivo Feussner. 2011. « Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection ». *BMC plant biology* 11 (1): 124.
- Latorre-Moratalla, ML, J Bosch-Fusté, S Bover-Cid, T Aymerich, et MC Vidal-Carou. 2011. « Contribution of enterococci to the volatile profile of slightly-fermented sausages ». *LWT-Food Science and Technology* 44 (1): 145–152.
- Leblanc, Donald J. 2006a. « Enterococcus ». In *The Prokaryotes*, 3rd Ed, New York: Springer, 175–204. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt.
- Leblanc, Donald J. 2006b. « Enterococcus ». In *The Prokaryotes*, édité par Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, et Erko Stackebrandt, 176. New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_6.
- Lechevalier, Mary P., et C. Wayne Moss. 1977. « Lipids in bacterial taxonomy-a taxonomist's view ». *CRC critical reviews in microbiology* 5 (2): 109–210.
- Lechevalier, Valérie, Thomas Croguennec, Marc Anton, et Yann Desfougères. 2010. *L'oeuf ingrédient alimentaire*. Tec & Doc, Lavoisier.
- Leer, Johan Christian, Karin Hammer-Jespersen, et Marianne Schwartz. 1977. « Uridine Phosphorylase from *Escherichia Coli* ». *European Journal of Biochemistry* 75 (1): 217-24. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11520.x>.
- Lepper, HA, MT Bartram, Fred Hillig, et others. 1956. « Authentic packs of edible and inedible frozen eggs and their organoleptic, bacteriological and chemical examination. » *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 39: 185–194.
- Lereclus, Didier, Herve Agaisse, Myriam Gominet, Sylvie Salameitou, et Vincent Sanchis. 1996. « Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. » *Journal of bacteriology* 178 (10): 2749–2756.

- Li, Changying, Norman E. Schmidt, et Ron Gitaitis. 2011. « Detection of onion postharvest diseases by analyses of headspace volatiles using a gas sensor array and GC-MS ». *{LWT} - Food Science and Technology* 44 (4): 1019-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.036>.
- Li, Ying-Sing, et Jeffrey S Church. 2014. « Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials ». *Journal of food and drug analysis* 22 (1): 29-48.
- Li-Chan, E. C. Y., A. A. Ismail, J. Sedman, et F. R. Van de Voort. 2002. « Vibrational spectroscopy of food and food products ». *Handbook of vibrational spectroscopy*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470027320.s6501/full>.
- Lin, Hao, Jiewen Zhao, Li Sun, Quansheng Chen, et Fang Zhou. 2011. « Freshness Measurement of Eggs Using near Infrared (NIR) Spectroscopy and Multivariate Data Analysis ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 12 (2): 182-86. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.01.008>.
- Lindsay, D, VS Brözel, JF Mostert, et A Von Holy. 2000. « Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range ». *International journal of food microbiology* 54 (1): 49-62.
- Littmann, Sigrid, Ludwig Acker, et Erhard Schulte. 1982. « Evaluation of the hygienic condition of egg products before pasteurisation by the pattern of organic acids ». *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 175 (2): 106-112.
- Liu, M, JM Gray, et MW Griffiths. 2006. « Occurrence of proteolytic activity and N-acyl-homoserine lactone signals in the spoilage of aerobically chill-stored proteinaceous raw foods ». *Journal of food protection* 69 (11): 2729-2737.
- Liu, M, et MW Griffiths. 2003. « The role of quorum sensing in the regulation of protease by *Pseudomonas fluorescens* and its relation to food spoilage ». In *IFT Annual Meeting, vol. Book of Abstracts, 29G-26*. Chicago, 85.
- Liu, M, H Wang, et MW Griffiths. 2007. « Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* ». *Journal of applied microbiology* 103 (6): 2174-2184.
- López-Fandiño, Rosina, Isidra Recio, et Mercedes Ramos. 2007. « Egg-Protein-Derived Peptides with Antihypertensive Activity ». In *Bioactive egg compounds*. Springer, Berlin.
- Lucisano, Mara, Alyssa Hidalgo, Elena M. Comelli, et Margherita Rossi. 1996. « Evolution of chemical and physical albumen characteristics during the storage of shell eggs ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (5): 1235-1240.
- LUND, BARBARA M. 1965. « A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D streptococci ». *Microbiology* 40 (3): 413-419.
- Luo, Bing, Karsten Groenke, Ralf Takors, Christian Wandrey, et Marco Oldiges. 2007. « Simultaneous Determination of Multiple Intracellular Metabolites in Glycolysis, Pentose Phosphate Pathway and Tricarboxylic Acid Cycle by Liquid Chromatography-mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1147 (2): 153-64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.034>.
- Lyon, Gholson J, et Richard P Novick. 2004. « Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria ». *Peptides* 25 (9): 1389-1403.
- Mackenzie, KA, et VBD Skerman. 1982. « Microbial spoilage in unpasteurised liquid whole egg ». *Food technology in Australia*.
- Magnus, CA, AR McCurdy, et WM Ingledew. 1988. « Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham ». *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 21 (2): 209-212.
- Mann, Karlheinz. 2007. « The chicken egg white proteome ». *Proteomics* 7 (19): 3558-3568.
- Maquelin, Kees, C Kirschner, L-P Choo-Smith, Nicole van den Braak, H Ph Endtz, D Naumann, et GJ Puppels. 2002. « Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy ». *Journal of microbiological methods* 51 (3): 255-271.
- Martin, Stephen F., Bruce C. Follows, Paul J. Hergenrother, et Bonnie K. Trotter. 2000. « The Choline Binding Site of Phospholipase C (*Bacillus Cereus*): Insights into Substrate Specificity [†] ». *Biochemistry* 39 (12): 3410-15. <https://doi.org/10.1021/bi9919798>.

- Martinez, S, M Lopez, et A Bernardo. 2003. « Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells ». *Letters in applied microbiology* 37 (6): 475–481.
- Milinsk, M.C., A.E. Murakami, S.T.M. Gomes, M. Matsushita, et N.E. de Souza. 2003. « Fatty Acid Profile of Egg Yolk Lipids from Hens Fed Diets Rich in N-3 Fatty Acids ». *Food Chemistry* 83 (2): 287–92. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00094-3).
- Miller, Petr, Melissa E Haveroen, Kateřina Solichová, Roman Merkl, Lynn M McMullen, Kamila Mikova, Jana Chumchalová, et others. 2010. « Shelf life extension of liquid whole eggs by heat and bacteriocin treatment. » *Czech Journal of Food Sciences* 28 (4): 280–289.
- Mine, Yoshinori. 1995. « Recent advances in the understanding of egg white protein functionality ». *Trends in Food Science & Technology* 6 (7): 225–32. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89083-4).
- . 1998. « Emulsifying characterization of hens egg yolk proteins in oil-in-water emulsions ». *Food Hydrocolloids* 12 (4): 409–415.
- Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. 2017. « VADEMECUM SECTORIEL PRODUCTION D'OVOPRODUITS ET D'OEUFs LIQUIDES - Version 2.0 – Février 2017 ».
- Moigne, A.L., et J. Foucier. 2009. *Biologie du développement - 7e édition: Cours et questions de révision*. Sciences de la vie. Dunod. <https://books.google.fr/books?id=VulEWXIBtEMC>.
- Mols, Maarten, et Tjakko Abec. 2011. « Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus* ». *Environmental microbiology* 13 (6): 1387–1394.
- Montanhini, MTM, RN Montanhini, JPN Pinto, et LS Bersot. 2013. « Effect of temperature on the lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products. » *International Food Research Journal* 20 (3).
- Moreno, MR Foulquié, P Sarantinopoulos, E Tsakalidou, et L De Vuyst. 2006. « The role and application of enterococci in food and health ». *International journal of food microbiology* 106 (1): 1–24.
- Morris, Cletus E. 1987. « Determination of uracil, uridine and formic acid in egg products by high-performance liquid chromatography ». *Journal of Chromatography A* 394 (2): 408–413.
- Morris, Cletus E., Edward F. Hoerning, et Allen J. St. Angelo. 1989. « Uracil as a Potentially Useful Indicator of Spoilage in Egg Products ». *Journal of Food Science* 54 (3): 581–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb04657.x>.
- Murphy, D. V., K. U. Vonraben, R. K. Chang, et P. B. Dorain. 1982. « SURFACE-ENHANCED HYPER-RAMAN SCATTERING FROM SO₂- ADSORBED ON AG POWDER ». *Chemical Physics Letters* 85 (1): 43–47. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(82\)83457-x](https://doi.org/10.1016/0009-2614(82)83457-x).
- Nabrdalik, Małgorzata, Katarzyna Grata, et Adam Latała. 2010. « Proteolytic activity of *Bacillus cereus* strains ». *Proceedings of ECOpole* 4 (2): 273–277.
- Nau, Françoise, Catherine Guérin, Florence Baron, et Jean-Louis Thapon. 2010. *Science et technologie de l'oeuf: Volume 1, Production et qualité*. Lavoisier TEC et DOC Editions.
- Nau, Françoise, Catherine Guérin-Dubiard, Florence Baron, et Jean-Louis Thapon. 2010. *Science et technologie de l'oeuf: Volume 2, De l'oeuf aux ovoproduits*. Paris: Tec & Doc Lavoisier.
- Nawrocka, Agnieszka, et Joanna Lamorsk. 2013. « Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods ». In *Advances in Agrophysical Research*, édité par Stanisaw Grundas. InTech. <https://doi.org/10.5772/52722>.
- Nieto-Arribas, Pedro, Susana Seseña, Justa M Poveda, Rosa Chicón, Lourdes Cabezas, et Llanos Palop. 2011. « *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects ». *Food microbiology* 28 (5): 891–899.
- « NORME CEE-ONU EGG-2 concernant la certification et le contrôle de la qualité commerciale des OVOPRODUITS - ÉDITION 2010 ». s. d.
- Norris, K. H., et W. L. Butler. 1961. « Techniques for obtaining absorption spectra on intact biological samples ». *IRE transactions on bio-medical electronics* 8 (3): 153–157.
- Nottingham, Ioan, Chris Green, Chris Dyer, Elaine Perkins, Neil Hopkins, Chris Lindsay, et Larry L Hench. 2004. « Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy ». *Journal of the Royal Society Interface* 1 (1): 79–90.

- Ogier, Jean-Claude, et Pascale Serror. 2008. « Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus ». *International journal of food microbiology* 126 (3): 291–301.
- O’Gorman, Aoife, Catherine Barry-Ryan, et Jesus M. Frias. 2012. « Evaluation and identification of markers of damage in mushrooms (*Agaricus bisporus*) postharvest using a GC/MS metabolic profiling approach ». *Metabolomics* 8 (1): 120–32. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0294-3>.
- O’Leary, William M. 1962. « The fatty acids of bacteria ». *Bacteriological reviews* 26 (4): 421.
- Orata, Francis. 2012. « Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis ». In *Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. InTech.
- Osborne, B. G., Fearn T., P. T. Hindle, et Osborne B. G. 1993. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis / B.G. Osborne, T. Fearn, and P.H. Hindle*. 2nd ed. Longman Scientific & Technical ; Wiley Harlow, Essex, England : New York.
- Osborne, Brian G. 2000. « Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis ». In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, édité par Robert A. Meyers. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1018>.
- Ouhib, Ouassila, Thierry Clavel, et Philippe Schmitt. 2006. « The Production of *Bacillus Cereus* Enterotoxins Is Influenced by Carbohydrate and Growth Rate ». *Current Microbiology* 53 (3): 222–26. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0094-6>.
- Painter, P. C., et J. L. Koenig. 1976. « Raman Spectroscopic Study of the Proteins of Egg White ». *Biopolymers* 15 (11): 2155–66. <https://doi.org/10.1002/bip.1976.360151105>.
- Palma, Pierangela, Elisabetta Pierini, et Achille Cappiello. 2016. « LC–MS Interfaces ». *Analytical Separation Science*.
- Papenfort, Kai, et Bonnie L Bassler. 2016. « Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (9): 576–588.
- Parry, Anne EJ, David S. Robinson, et Bronislaw L. Wedzicha. 1980. « An enzymic assay for β -hydroxybutyric acid in liquid whole egg ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31 (9): 905–910.
- Pasikanti, KK, PC Ho, et ECY Chan. 2008. « Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids ». *Journal of chromatography B* 871 (2): 202–11.
- Paul, Wolfgang, et Helmut Steinwedel. 1953. « Ein neues massenspektrometer ohne magnetfeld ». *Zeitschrift für Naturforschung A* 8 (7): 448–450.
- Perez, Sanz, P Lopez Lorenzo, ML Garcia, PE Hernandez, et JA Ordonez. 1982. « Heat resistance of enterococci. » *Milchwissenschaft* 37 (12): 724–726.
- Phélippé, Myriam, Rémy Coat, Camille Le Bras, Lorene Perrochaud, Eric Peyretailade, Delphine Kucma, Abdellah Arhaliass, Gérald Thouand, Guillaume Cogne, et Olivier Gonçalves. 2018. « Characterization of an Easy-to-Use Method for the Routine Analysis of the Central Metabolism Using an Affordable Low-Resolution GC–MS System: Application to *Arthrosira Platensis* ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (4): 1341–61. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0776-x>.
- Pinto, Uelinton Manoel, Eliseth de Souza Viana, Maurilio Lopes Martins, et Maria Cristina Dantas Vanetti. 2007. « Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk ». *Food Control* 18 (10): 1322–1327.
- Piot, O, J-C Autran, et M Manfait. 2000. « Spatial distribution of protein and phenolic constituents in wheat grain as probed by confocal Raman microspectroscopy ». *Journal of Cereal Science* 32 (1): 57–71.
- Pirhonen, Minna, Diana Flego, Riikka Heikinheimo, et E Tapio Palva. 1993. « A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. » *The EMBO journal* 12 (6): 2467.
- Pizzoferrato, L., S. Nicoli, et C. Lintas. 1993. « GC-MS characterization and quantification of sterols and cholesterol oxidation products ». *Chromatographia* 35 (5): 269–274.
- Podbielski, Andreas, et Bernd Kreikemeyer. 2004. « Cell density–dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci ». *International journal of infectious diseases* 8 (2): 81–95.

- Posati, Linda P, et Martha Louise Orr. 1976. « Composition of foods: dairy and egg products—raw, processed, prepared. » *Agriculture Handbook-US Dept. of Agriculture (USA)*. no. 8-1.
- Postollec, Florence, Stéphane Bonilla, Florence Baron, Sophie Jan, Michel Gautier, Anne Gabrielle Mathot, Sylvie Hallier-Soulier, Sonia Pavan, et Danièle Sohier. 2010. « A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food ». *International journal of food microbiology* 142 (1): 78–88.
- Powell, J. R., F. M. Wasacz, et R. J. Jakobsen. 1986. « An algorithm for the reproducible spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of proteins in dilute solutions and adsorbed monolayers ». *Applied Spectroscopy* 40 (3): 339–344.
- Powrie, William D, et S Nakai. 1986. « The Chemistry of Eggs and Egg Products-Chapter 6 ». In *Egg science and technology*, 97–139. AVI Publishing Company, Inc.
- Privett, OS, ML Blank, et JA Schmit. 1962. « Studies on the composition of egg lipid ». *Journal of Food Science* 27 (5): 463–468.
- Protais, Jocelyne, Pascale Gerault, Stéphane Queguiner, Evelyne Boscher, Bérengère Chidaine, Gwennola Ermel, Katell Rivoal, et al. 2006. « Identification et comportement des bactéries d'altération dans la matrice ø euf entier liquide ». *Sciences et Techniques Avicoles* 57: 4–13.
- Prüss, Birgit M, Richard Dietrich, Birgit Nibler, Erwin Märklbauer, et Siegfried Scherer. 1999. « The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group ». *Applied and Environmental Microbiology* 65 (12): 5436–5442.
- Purwaha, Preeti, Leslie P. Silva, David H. Hawke, John N. Weinstein, et Philip L. Lorenzi. 2014. « An Artifact in LC-MS/MS Measurement of Glutamine and Glutamic Acid: In-Source Cyclization to Pyroglutamic Acid ». *Analytical Chemistry* 86 (12): 5633–37. <https://doi.org/10.1021/ac501451v>.
- Quinto, Emiliano J., Pilar Jiménez, Irma Caro, Jesús Tejero, Javier Mateo, et Tomás Girbés. 2014. « Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review ». *Food and Nutrition Sciences* 05 (18): 1765–75. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.518190>.
- Rajmohan, S, CER Dodd, et WM Waites. 2002. « Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage ». *Journal of Applied Microbiology* 93 (2): 205–213.
- Raman, C. V., et K. S. Krishnan. 1928. « A new type of secondary radiation ». *Nature* 121 (janvier): 501–2. <https://doi.org/10.1038/121501c0>.
- Ramsey, Matthew, Axel Hartke, et Mark Huycke. 2014. « The physiology and metabolism of enterococci ».
- Randazzo, Cinzia L, Serena De Luca, Aldo Todaro, Cristina Restuccia, Carmela M Lanza, Giovanni Spagna, et Cinzia Caggia. 2007. « Preliminary characterization of wild lactic acid bacteria and their abilities to produce flavour compounds in ripened model cheese system ». *Journal of applied microbiology* 103 (2): 427–435.
- Reading, Nicola C, Alfredo G Torres, Melissa M Kendall, David T Hughes, Kaneyoshi Yamamoto, et Vanessa Sperandio. 2007. « A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin ». *Journal of bacteriology* 189 (6): 2468–2476.
- Redfield, C., et C.M. Dobson. 1988. « Sequential 1H NMR assignments and secondary structure of hen egg white lysozyme in solution ». *Biochemistry* 27: 122–36.
- « Reglement (CE) n° 853-2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale ». s. d.
- « Reglement (CE) n° 2073-2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables au denrées alimentaires ». s. d.
- Riedel, Kathrin, Thomas Ohnesorg, Karen A Krogfelt, Thomas S Hansen, Kenji Omori, Michael Givskov, et Leo Eberl. 2001. « N-Acyl-L-Homoserine Lactone-Mediated Regulation of the Lip Secretion System in *Serratia liquefaciens* MG1 ». *Journal of bacteriology* 183 (5): 1805–1809.
- Riva, Marco, Dimitrios Fessas, et Alberto Schiraldi. 2001. « Isothermal calorimetry approach to evaluate shelf life of foods ». *Thermochimica Acta* 370 (1): 73–81.
- Roessner, Ute, Cornelia Wagner, Joachim Kopka, Richard N Trethewey, et Lothar Willmitzer. 2000. « Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry ». *The Plant Journal* 23 (1): 131–142.

- Rogachev, Ilana, et Asaph Aharoni. 2012. « UPLC-MS-Based Metabolite Analysis in Tomato ». In *Plant Metabolomics: Methods and Protocols*, édité par Nigel W. Hardy et Robert D. Hall, 129-44. Totowa, NJ: Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-594-7_9.
- Rosenberg, S, SM Silver, JM Sayer, et WP Jencks. 1974. « Evidence for two concurrent mechanisms and a kinetically significant proton transfer process in acid-catalyzed O-methyloxime formation ». *Journal of the American Chemical Society* 96 (26): 7986–7998.
- Rosenfeld, Eric, Catherine Duport, Assia Zigha, et Philippe Schmitt. 2005. « Characterization of Aerobic and Anaerobic Vegetative Growth of the Food-Borne Pathogen *Bacillus Cereus* F4430/73 Strain ». *Canadian Journal of Microbiology* 51 (2): 149-58. <https://doi.org/10.1139/w04-132>.
- Rossi, M, A Hidalgo, C Pompei, et F Giuffrida. 1999. « A new approach to the identification of incubator reject eggs in pasteurized whole egg products obtained from fresh eggs ». In *European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*, 451–456. WPSA Italian Branch.
- Rossi, M., Y. Nys, M. Anton, M. Bain, B. De Kelelaere, K. De Reu, I. Dunn, et al. 2013. « Developments in understanding and assessment of egg and egg product quality over the last century ». *World's Poultry Science Journal* 69 (02): 414–429. <https://doi.org/10.1017/S0043933913000408>.
- Rossi, M, C Pompei, et A Hidalgo. 1996. « Influence of pasteurization on some yolk and whole egg characteristics ». In *Proceedings of the 2nd Italian conference in food science and technology*, 617–623.
- Rossi, Margherita, Ernestina Casiraghi, Laura Primavesi, Carlo Pompei, et Alyssa Hidalgo. 2010. « Functional Properties of Pasteurised Liquid Whole Egg Products as Affected by the Hygienic Quality of the Raw Eggs ». *LWT - Food Science and Technology* 43 (3): 436-41. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.008>.
- ROSSI, Margherita, et C. Pompei. 1995. « Changes in some egg components and analytical values due to hen age ». *Poultry science* 74 (1): 152–160.
- Rul, Françoise, et Véronique Monnet. 2015. « How Microbes Communicate in Food: A Review of Signaling Molecules and Their Impact on Food Quality ». *Current Opinion in Food Science* 2 (avril): 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.003>.
- Russell, Hailey, et Gary Siuzdak. 2003. « A Mass Spec Timeline ». *Today's Chemist AT Work*.
- Ryder, Alan G, Gerard M O'Connor, et Thomas J Glynn. 1999. « Identifications and quantitative measurements of narcotics in solid mixtures using near-IR Raman spectroscopy and multivariate analysis ». *Journal of Forensic Science* 44 (5): 1013–1019.
- Saccenti, Edoardo, Huub C. J. Hoefsloot, Age K. Smilde, Johan A. Westerhuis, et Margriet M. W. B. Hendriks. 2014. « Reflections on Univariate and Multivariate Analysis of Metabolomics Data ». *Metabolomics* 10 (3): 361-74. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0598-6>.
- Sadeghi-Jorabchi, H, PJ Hendra, RH Wilson, et PS Belton. 1990. « Determination of the total unsaturation in oils and margarines by Fourier transform Raman spectroscopy ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67 (8): 483–486.
- Sadeghi-Jorabchi, H, RH Wilson, PS Belton, JD Edwards-Webb, et DT Coxon. 1991. « Quantitative analysis of oils and fats by Fourier transform Raman spectroscopy ». *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 47 (9): 1449–1458.
- Salminen, Seppo, éd. 2012. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis.
- Salvatore, Francesco. 2015. « A Strategy for GC/MS Quantification of Polar Compounds via their Silylated Surrogates: Silylation and Quantification of Biological Amino Acids ». *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* 6 (5). <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000263>.
- Salwin, H., W. F. Jr Staruszkiewicz, et J. F. Bond. 1972. « Formation of -Hydroxybutyric Acid in Eggs during Incubation. » *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 55 (3): 458-60.
- Sana, Théodore, et Steve Fischer. 2007. « Maximizing Métabolite Extraction for Comprehensive Metabolomics Studies of Erythrocytes ». Agilent technologies.

- Sanchez-Ruiz, Jose M., et Marino Martinez-Carrion. 1988. « A Fourier-transform infrared spectroscopic study of the phosphoserine residues in hen egg phosvitin and ovalbumin ». *Biochemistry* 27 (9): 3338–3342.
- Sarantinopoulos, Panagiotis, Christian Andrighetto, Marina D Georgalaki, Mary C Rea, Angiolella Lombardi, Timothy M Cogan, George Kalantzopoulos, et Effie Tsakalidou. 2001. « Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance ». *International Dairy Journal* 11 (8): 621–647.
- Sauveur, B. 1988. « Structure, composition et valeur nutritionnelle de l'œuf ». In *Reproduction des volailles et production d'œufs* (ed. INRA), 377–433.
- Schleifer, Karl H, et Renate Kilpper-Bälz. 1984a. « Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 34 (1): 31–34.
- . 1984b. « Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 34 (1): 31–34.
- Schrader, B., et D. S. Moore. 1997. « Nomenclature, symbols, units, and their usage in spectrochemical analysis .18. Laser-based molecular spectroscopy for chemical analysis - Raman scattering processes ». *Pure and Applied Chemistry* 69 (7): 1451–68. <https://doi.org/10.1351/pac199769071451>.
- Schreiner, Matthias, Renata G Moreira, et Howard W Hulan. 2006. « Positional distribution of fatty acids in egg yolk lipids ». *Journal of Food Lipids* 13 (1): 36–56.
- Schuster, Kurt Christian, E Urlaub, et JR Gapes. 2000. « Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture ». *Journal of Microbiological Methods* 42 (1): 29–38.
- Scott, RPW, et CG Scott. 1974. « M. Munroe und J ». *Hess Jr., J. Chromatogr* 99: 395.
- Shanmukh, Saratchandra, Les Jones, Jeremy Driskell, Yiping Zhao, Richard Dluhy, et Ralph A Tripp. 2006. « Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate ». *Nano letters* 6 (11): 2630–2636.
- Shi, Zhizhong, Lili Sun, et Chunbao Li. 2014. « Solvent Polarity-Controlled Selective Synthesis of Methyl Pyranoside and Furanoside ». *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (14): 3287–3292.
- Sifri, Costi D, Eleftherios Mylonakis, Kavindra V Singh, Xiang Qin, Danielle A Garsin, Barbara E Murray, Frederick M Ausubel, et Stephen B Calderwood. 2002. « Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice ». *Infection and immunity* 70 (10): 5647–5650.
- Sisak, C., Z. Csanádi, E. Rónay, et B. Szajáni. 2006. « Elimination of Glucose in Egg White Using Immobilized Glucose Oxidase ». *Enzyme and Microbial Technology* 39 (5): 1002–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.010>.
- Slamti, Leyla, et Didier Lereclus. 2002. « A cell–cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group ». *The EMBO journal* 21 (17): 4550–4559.
- Smart, Kathleen F, Raphael BM Aggio, Jeremy R Van Houtte, et Silas G Villas-Bôas. 2010. « Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry ». *Nature Protocols* 5 (10): 1709–1729.
- Smith, Colin A., Elizabeth J. Want, Grace O'Maille, Ruben Abagyan, et Gary Siuzdak. 2006. « XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification ». *Analytical Chemistry* 78 (3): 779–87. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>.
- Solé, Montserrat, Núria Rius, et José G Lorén. 2000. « Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens* ». *International Microbiology* 3 (1): 39–43.
- Stadelman, William J, Debbie Newkirk, et Lynne Newby. 1995. *Egg science and technology*. CRC Press.

- Staruszkiewicz et al. 1970. « Quantitative gas chromatographic determination of Beta-Hydroxybutyric acid with application to eggs.pdf ».
- Stelios, Kaminarides, Stamou Paraskevi, Massouras Theophilos, et Georgala Aikaterini. 2009. « Study of organic acids, volatile fraction and caseins of a new Halloumi-type cheese during ripening in whey brine ». *International journal of food science & technology* 44 (2): 297–304.
- Stenfors, Lotte P, Ralf Mayr, Siegfried Scherer, et Per Einar Granum. 2002. « Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains ». *FEMS microbiology letters* 215 (1): 47–51.
- Stepaniak, Leszek. 2004. « Dairy enzymology ». *International Journal of Dairy Technology* 57 (2-3): 153–171.
- Stevens, Lewis. 1991. « Egg white proteins ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 100 (1): 1-9. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90076-P](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90076-P).
- Stijve, T, et JM Diserens. 1987. « Simplified method for the routine determination of organic-acids in eggs and egg products ». *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 83 (2): 44–47.
- Strano-Rossi, Sabina, Sara Odoardi, Erika Castrignanò, Giovanni Serpelloni, et Marcello Chiarotti. 2015. « Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements ». *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 106: 144–152.
- Suárez, Cristian, Martín Espariz, Víctor S Blancato, et Christian Magni. 2013. « Expression of the agmatine deiminase pathway in *Enterococcus faecalis* is activated by the AguR regulator and repressed by CcpA and PTSMAN systems ». *PLoS One* 8 (10): e76170.
- Sultanbawa, Y, et Rural Industries Research and Development Corporation (Australia). 2015. *Changes in Quality and Bioactivity of Native Foods during Storage*.
- Tal'roze, VL, GV Karpov, IG Gordetskii, et VE Skurat. 1968. « Preparation of Inlet Devices for a Capillary System for Introducing Liquid Mixtures into a Mass Spectrometer and Measurement of Their Parameters ». *Kh. Fiz. Khim.* 42: 3112–3117.
- Tavaria, FK, S Dahl, FJ Carballo, et FX Malcata. 2002. « Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria ». *Journal of Dairy Science* 85 (10): 2462–2470.
- Techer, C., F. Baron, L. Delbrassinne, R. Belaïd, N. Brunet, A. Gillard, F. Gonnet, et al. 2014. « Global Overview of the Risk Linked to the *Bacillus Cereus* Group in the Egg Product Industry: Identification of Food Safety and Food Spoilage Markers ». *Journal of Applied Microbiology* 116 (5): 1344–58. <https://doi.org/10.1111/jam.12462>.
- Techer, Clarisse, Amina Daoud, Marie-Noëlle Madec, Michel Gautier, Sophie Jan, et Florence Baron. 2015. « Microbial Quality of Industrial Liquid Egg White: Assumptions on Spoiling Issues in Egg-Based Chilled Desserts: Bacteria from Liquid Egg White ... ». *Journal of Food Science* 80 (2): M389–98. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12764>.
- Thapon, Jean-Louis, et Bourgeois, W.G. 1994. *L'Oeuf et les Ovoproduits*. Lavoisier, Paris.
- Thomson, Joseph John. 1911. « XXVI. Rays of positive electricity ». *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 21 (122): 225–249.
- Utagawa, Takashi, Hirokazu Morisawa, Shigeru Yamanaka, Akihiro Yamazaki, Fumihiko Yoshinaga, et Yoshio Hirose. 1985. « Properties of Nucleoside Phosphorylase from *Enterobacter Aerogenes* ». *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (11): 3239–46. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867255>.
- Van de Voort, F. R., J. Sedman, et A. A. Ismail. 1992. « A Rapid FTIR quality control method for fat and moisture determination in butter ».
- Van den Berghe, Erika, Tom De Winter, et Luc De Vuyst. 2006. « Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature-and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion ». *International journal of food microbiology* 107 (2): 159–170.
- Van Der Werf, Paul, Marian Orlowski, et Alton Meister. 1971. « Enzymatic conversion of 5-oxo-L-proline (L-pyrrolidone carboxylate) to L-glutamate coupled with cleavage of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, a reaction in the γ -glutamyl cycle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68 (12): 2982–2985.

- Vankeirsbilck, Tineke, Ann Vercauteren, Willy Baeyens, G Van der Weken, Francis Verpoort, Geert Vergote, et Jean Paul Remon. 2002. « Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis ». *TrAC trends in analytical chemistry* 21 (12): 869–877.
- Villani, F, et S Coppola. 1994. « Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture ». *Annali di Microbiologia ed Enzimologia (Italy)*.
- Voort, F_R van de, J. Sedman, et A. A. Ismail. 1993. « A rapid FTIR quality-control method for determining fat and moisture in high-fat products ». *Food Chemistry* 48 (2): 213–221.
- Vuckovic, Dajana. 2012. « Current Trends and Challenges in Sample Preparation for Global Metabolomics Using Liquid Chromatography–mass Spectrometry ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (6): 1523–48. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6039-y>.
- Wahl, S Aljoscha, Reza Maleki Seifar, Angela ten Pierick, Cor Ras, Jan C van Dam, Joseph J Heijnen, et Walter M van Gulik. 2014. « Quantitative metabolomics using ID-MS ». *Metabolic Flux Analysis: Methods and Protocols*, 91–105.
- Wang, Jiapei, Yue Liang, Dileep A. Omana, Nat N. V. Kav, et Jianping Wu. 2012. « Proteomics Analysis of Egg White Proteins from Different Egg Varieties ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (1): 272–82. <https://doi.org/10.1021/jf2033973>.
- Wang, QH, YL Liu, MH Ma, et H Wang. 2015. « Quantitative Approach to Melamine Detection in Egg White with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy ». *Guang pu xue yu guang pu fen xi= Guang pu* 35 (4): 919–923.
- Wang, Wenbo, et Jitendra Paliwal. 2011. « Conformation analysis of egg white under thermal gelation and determination of protein secondary structures using Raman Spectroscopy ».
- Wehling, R. L., M. M. Pierce, et G. W. Froning. 1988. « Determination of Moisture, Fat and Protein in Spray-Dried Whole Egg by Near Infrared Reflectance Spectroscopy ». *Journal of Food Science* 53 (5): 1355–1359.
- Wehrens, Ron, Georg Weingart, et Fulvio Mattivi. 2014. « MetaMS: An Open-Source Pipeline for GC–MS-Based Untargeted Metabolomics ». *Journal of Chromatography B* 966 (septembre): 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.051>.
- Wessels, Delille, PJ Jooste, et JF Mostert. 1990. « Technologically important characteristics of Enterococcus isolates from milk and dairy products ». *International journal of food microbiology* 10 (3-4): 349–352.
- WHITFIELD, FRANK B, NANCY JENSEN, et KEVIN J SHAW. 2000. « Role of Yersinia intermedia and Pseudomonas putida in the development of a fruity off-flavour in pasteurized milk ». *Journal of dairy research* 67 (4): 561–569.
- Wittmann, Christoph. 2007. « Fluxome analysis using GC-MS ». *Microbial Cell Factories* 6 (1): 6.
- Xu, Yun, William Cheung, Catherine L. Winder, et Royston Goodacre. 2010. « VOC-Based Metabolic Profiling for Food Spoilage Detection with the Application to Detecting Salmonella Typhimurium-Contaminated Pork. » *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (6): 2439–49. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3771-z>.
- Yang, Hong, Joseph Irudayaraj, et Manish M Paradkar. 2005. « Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy ». *Food Chemistry* 93 (1): 25–32.
- Yi, Lunzhao, Naiping Dong, Yonghuan Yun, Baichuan Deng, Dabing Ren, Shao Liu, et Yizeng Liang. 2016. « Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: a review ». *Analytica chimica acta* 914: 17–34.
- Yost, RA, et CG Enke. 1978. « Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer ». *Journal of the American Chemical Society* 100 (7): 2274–2275.
- Zardetto, Stefano, Davide Barbanti, et Marco Dalla Rosa. 2014. « Formation of Cholesterol Oxidation Products (COPs) and Loss of Cholesterol in Fresh Egg Pasta as a Function of Thermal Treatment Processing ». *Food Research International* 62 (août): 177–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.028>.
- Zhang, Hong-Mei, Song-Lin Li, Hong Zhang, Yun Wang, Zhi-Li Zhao, Shi-Lin Chen, et Hong-Xi Xu. 2012. « Holistic quality evaluation of commercial white and red ginseng using a UPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62: 258–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.010>.

- Zhao, Jiewen, Hao Lin, Quansheng Chen, Xingyi Huang, Zongbao Sun, et Fang Zhou. 2010. « Identification of Egg's Freshness Using NIR and Support Vector Data Description ». *Journal of Food Engineering* 98 (4): 408-14. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.018>.
- Zhao, Ying-Yong, et Rui-Chao Lin. 2014. « Chapter Three - Metabolomics in Nephrotoxicity ». In , édité par Gregory S. Makowski, 65:69-89. *Advances in Clinical Chemistry, Supplement C*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800141-7.00003-6>.
- Zigha, A., E. Rosenfeld, P. Schmitt, et C. Duport. 2006a. « Anaerobic Cells of *Bacillus Cereus* F4430/73 Respond to Low Oxidoreduction Potential by Metabolic Readjustments and Activation of Enterotoxin Expression ». *Archives of Microbiology* 185 (3): 222-33. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0090-z>.
- . 2006b. « Anaerobic Cells of *Bacillus Cereus* F4430/73 Respond to Low Oxidoreduction Potential by Metabolic Readjustments and Activation of Enterotoxin Expression ». *Archives of Microbiology* 185 (3): 222-33. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0090-z>.

Annexes

Annexe A. Tableau complet des données relatives au commerce extérieur français en produits d'œufs (2013-2015)

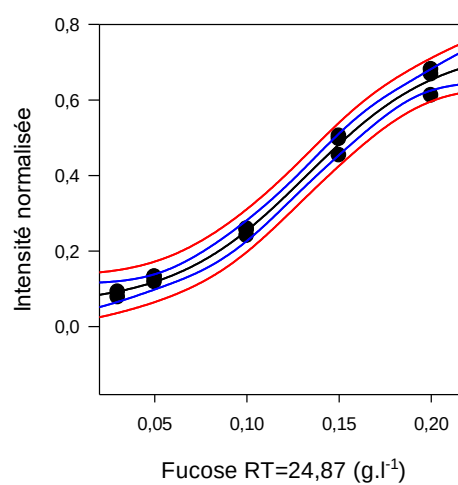
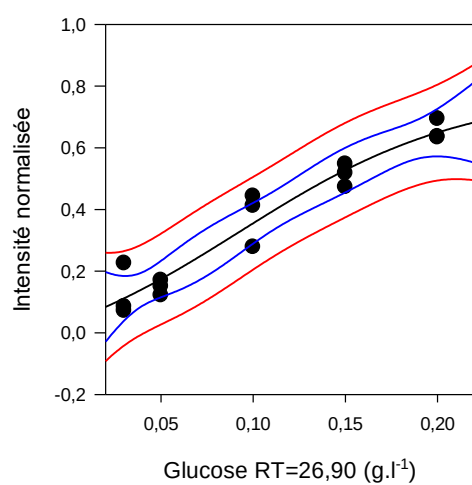
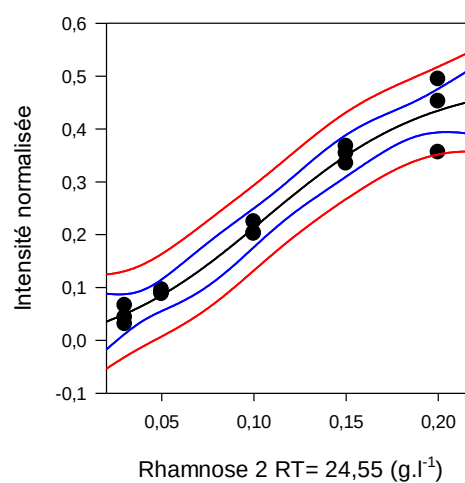
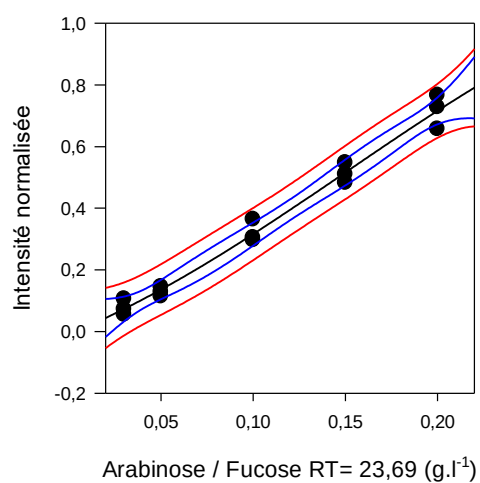
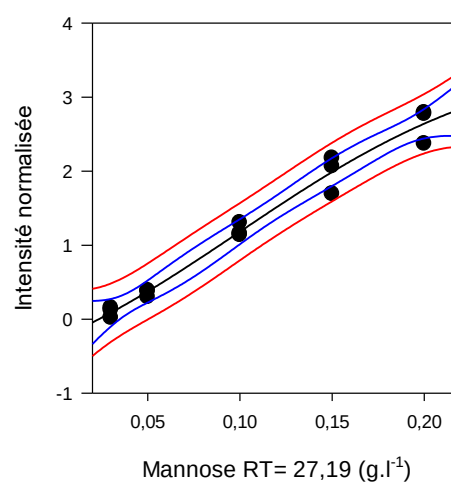
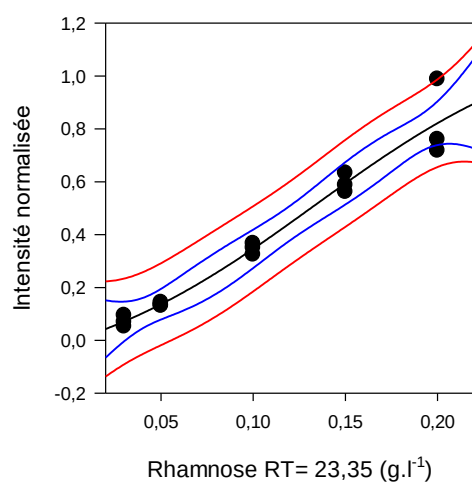
Volumes (tecoq ¹⁹)	2013	2014	2015	%15/14
Exportations	85 110	86 334	88 351	2,3
Ovoproduits alimentaires	66 362	67 718	72 877	7,6
Liquides	40 806	40 542	43 433	7,1
Entiers	9 973	9 533	9 723	2
Jaunes	27 988	26 482	29 457	11,2
Albumines	2 846	4 527	4 253	-6
Séchés	25 555	27 175	29 443	8,3
Entiers	11 423	11 104	12 090	8,9
Jaunes	10 865	12 449	13 653	9,7
Albumines	3 267	3 623	3 700	2,1
Ovoproduits non alimentaires	18 749	18 617	15 474	-16,9
Liquides	4	3	22	753,9
Entiers	4	3	22	753,1
Jaunes	0	0	0	966,7
Albumines	0	0	0	//
Séchés	18 744	18 614	15 452	-17
Entiers	18 728	18 594	15 435	-17
Jaunes	0	0	0	-75
Albumines	16	20	17	-13,8
Importations	71 174	71 113	78 157	9,9
Ovoproduits alimentaires	66 055	66 354	74 227	11,9
Liquides	56 773	56 332	62 551	11
Entiers	31 051	27 621	28 683	3,8
Jaunes	18 148	18 755	22 950	22,4
Albumines	7 574	9 956	10 918	9,7
Séchés	9 282	10 023	11 676	16,5
Entiers	3 399	3 407	4 382	28,6
Jaunes	4 761	5 587	6 235	11,6
Albumines	1 122	1 028	1 059	3
Ovoproduits non alimentaires	5 118	4 759	3 930	-17,4

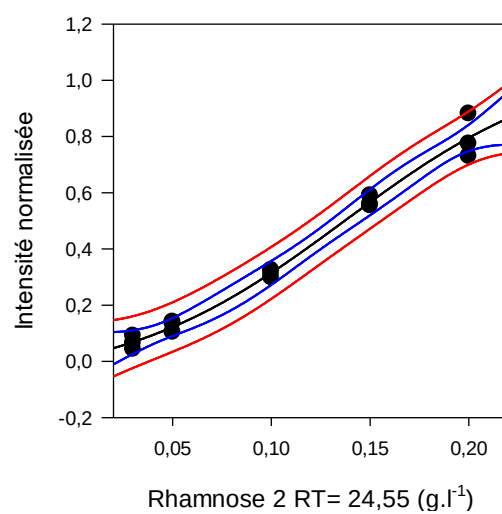
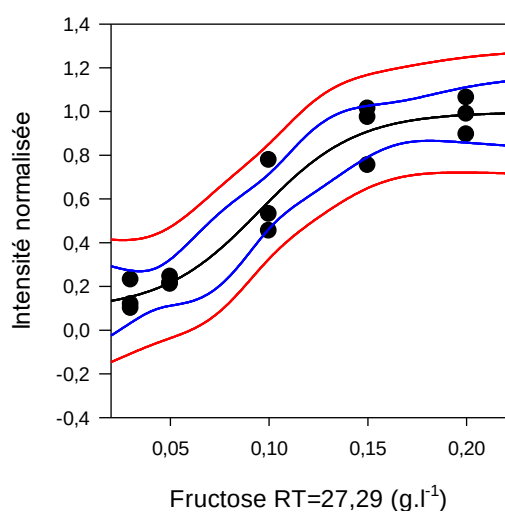
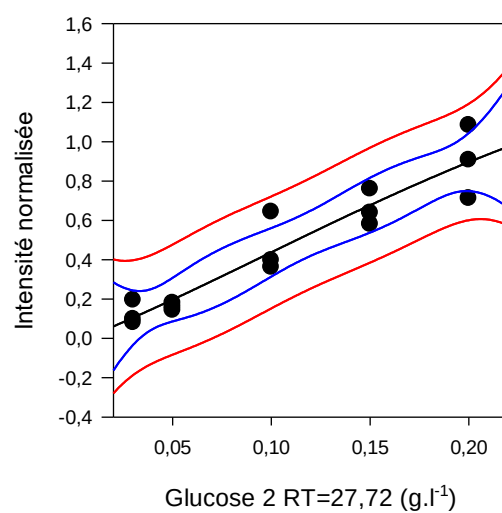
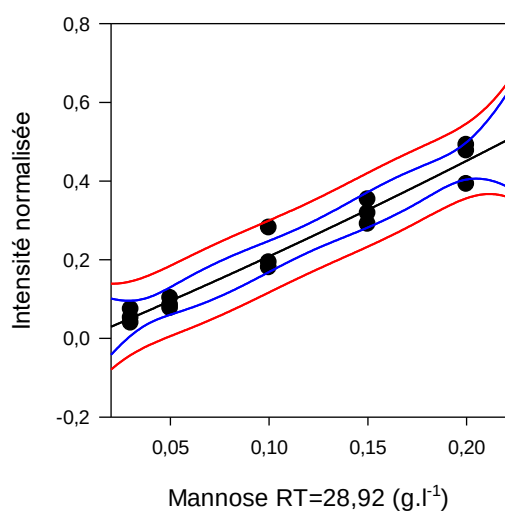
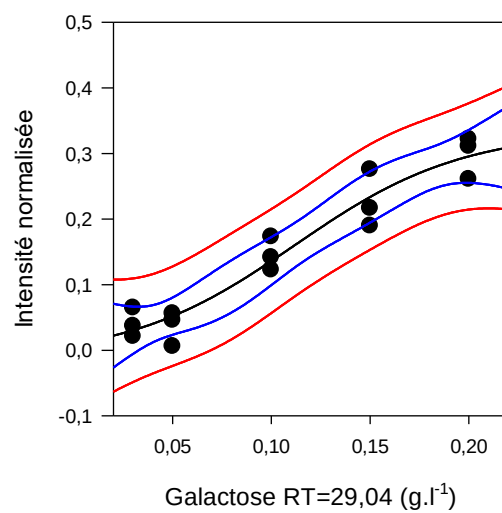
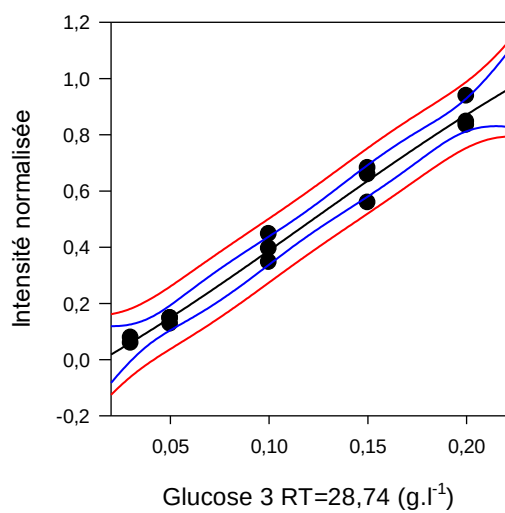
¹⁹ *Unité employée pour pouvoir agréger des données en poids concernant des œufs entiers et des produits à base d'œufs sous toutes leurs présentations : œufs entiers sans coquille, blancs seuls, jaunes seuls, séchés ou non, etc.. On applique au poids brut un coefficient propre à chaque forme du produit : 1 pour un œuf entier avec coquille par définition, 1,16 pour un œuf entier liquide sans coquille, 2,5 pour du jaune séché par exemple.

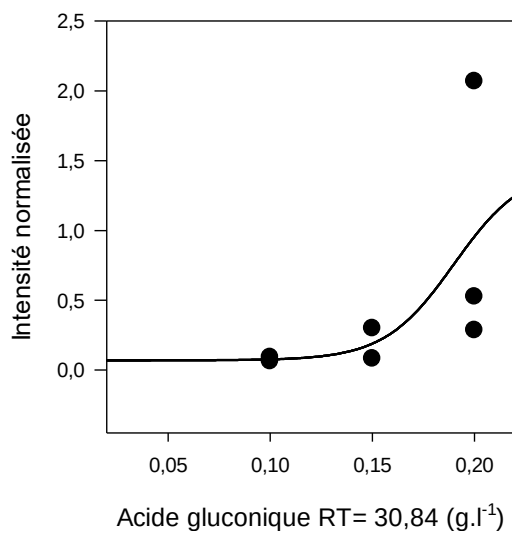
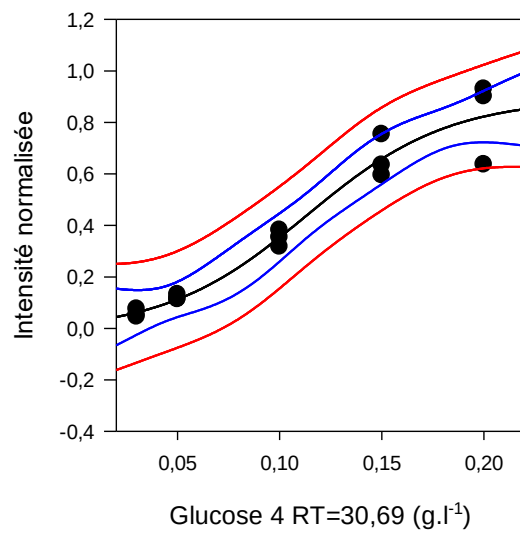
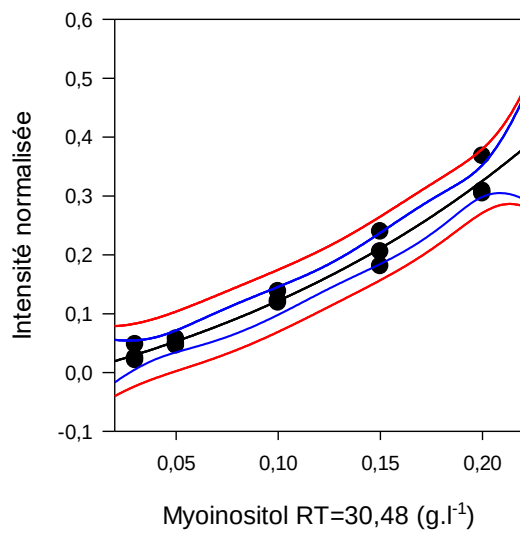
Liquides	2 000	1 321	557	-57,8
Entiers	17	0	1	650
Jaunes	1 982	1 319	555	-57,9
Albumines	0	2	2	-3,2
Séchés	3 119	3 438	3 373	-1,9
Entiers	2 515	2 630	2 089	-20,6
Jaunes	603	808	1 284	58,8
Albumines	0	0	0	-12,4
SOLDE	13 936	15 221	10 194	
Ovoproduits alimentaires liquides	-15 967	-15 789	-19 118	
Ovoproduits alimentaires séchés	16 273	17 153	17 768	
Ovoproduits non alimentaires	13 630	13 858	11 544	

Annexe B. Courbes de calibration pour les composés des différentes familles chimiques

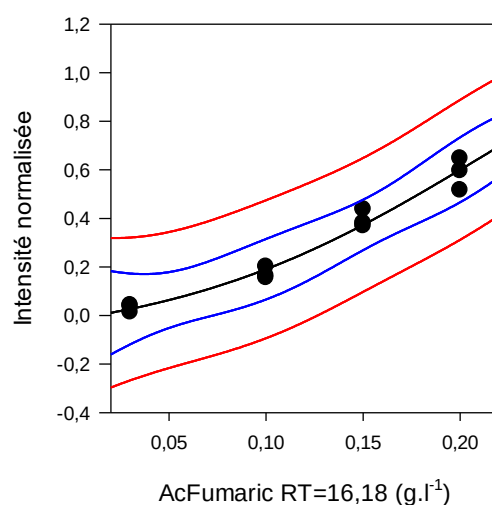
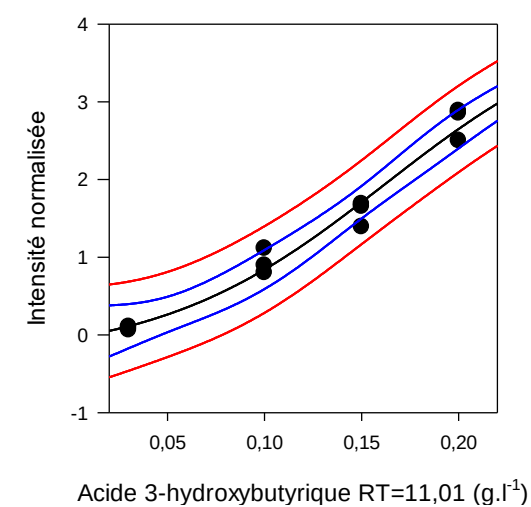
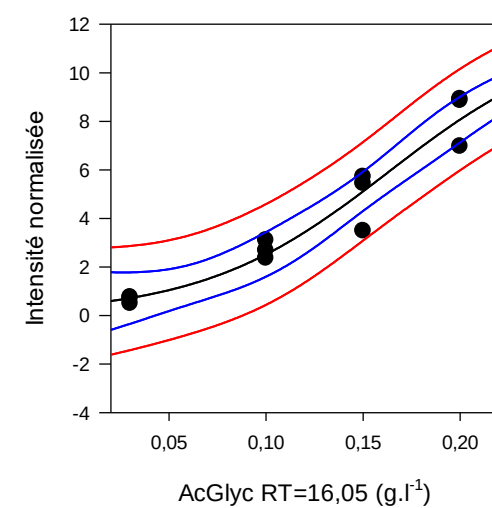
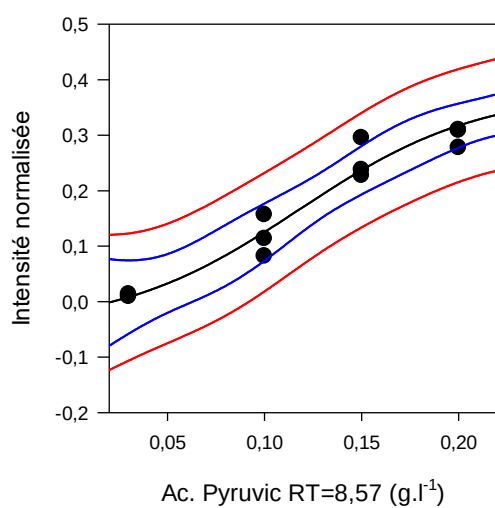
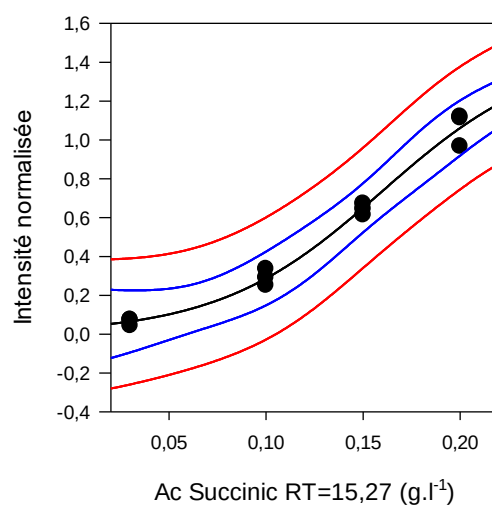
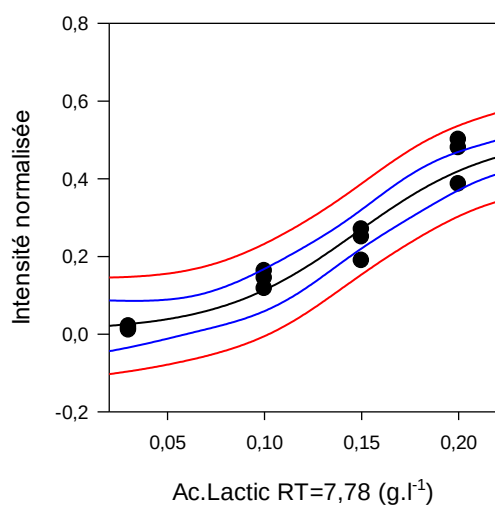
Oses :

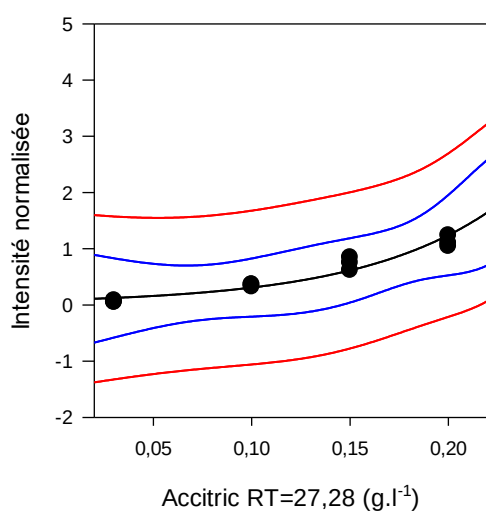
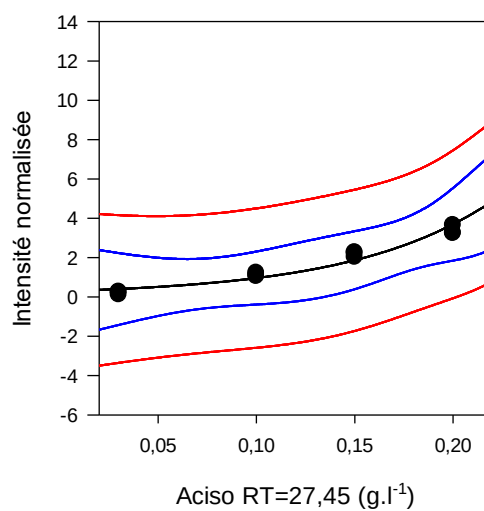
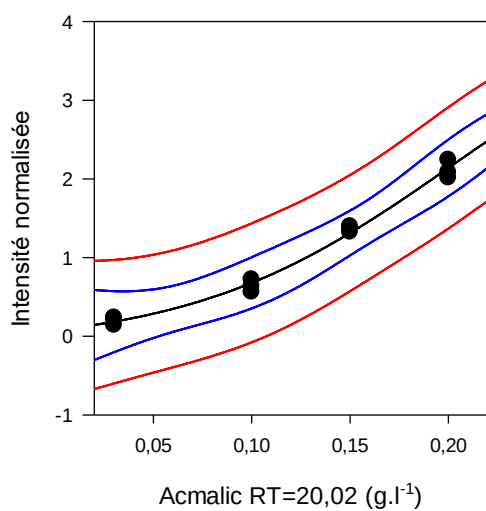
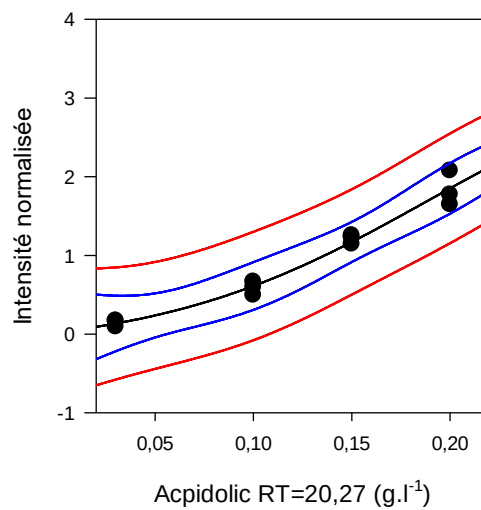
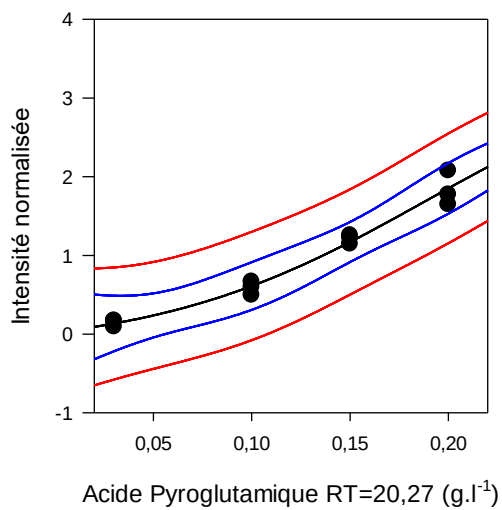




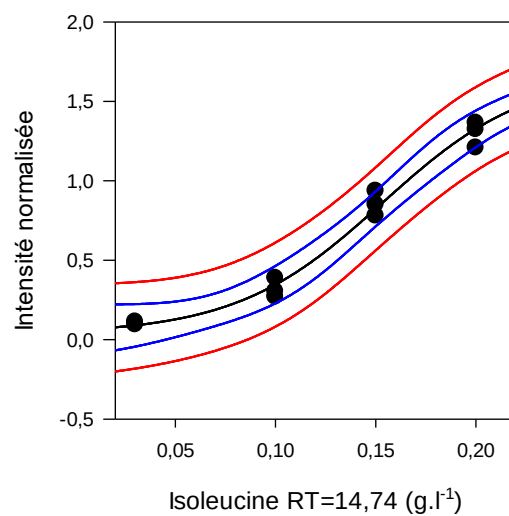
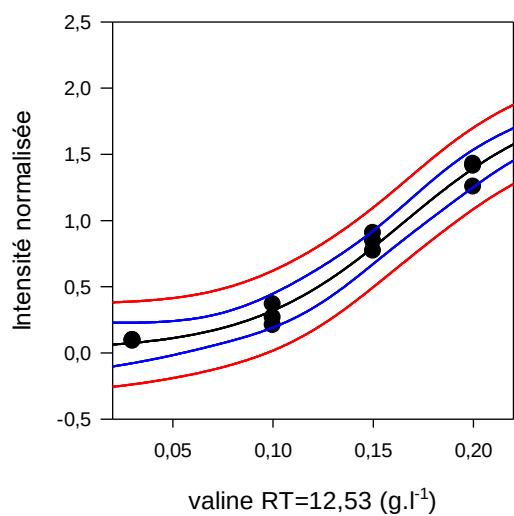
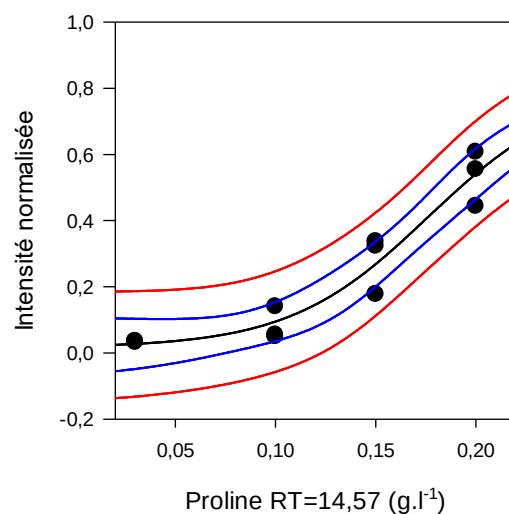
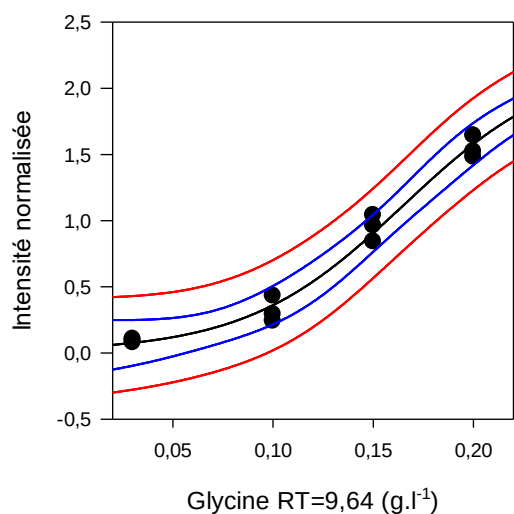
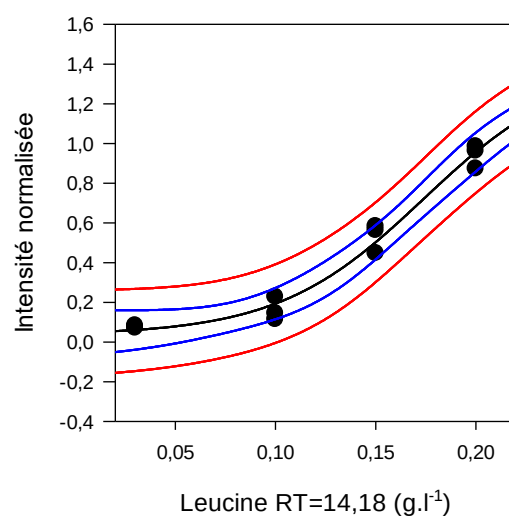
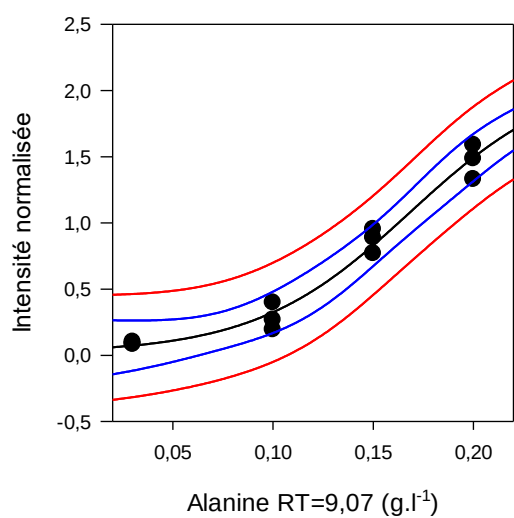


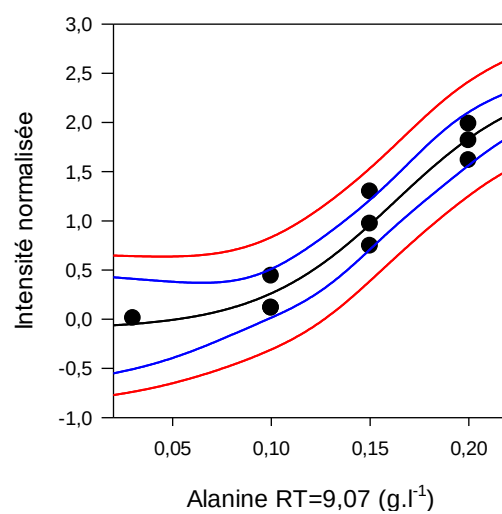
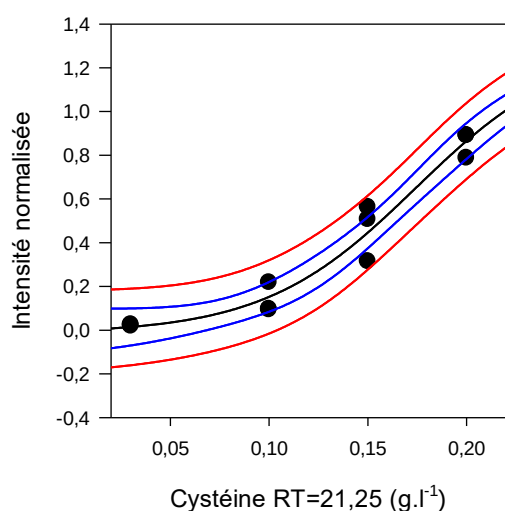
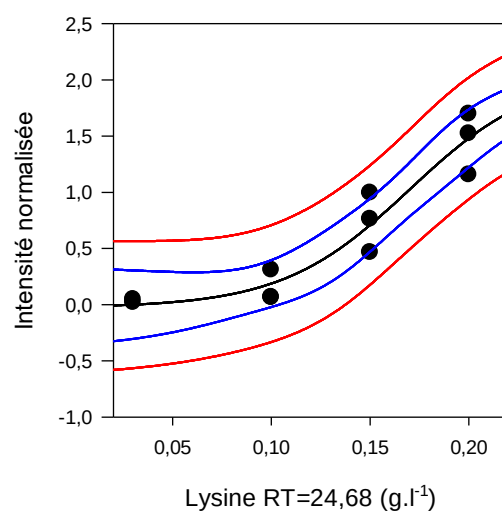
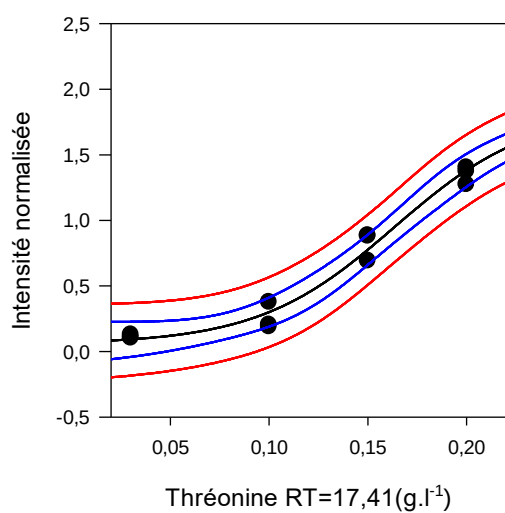
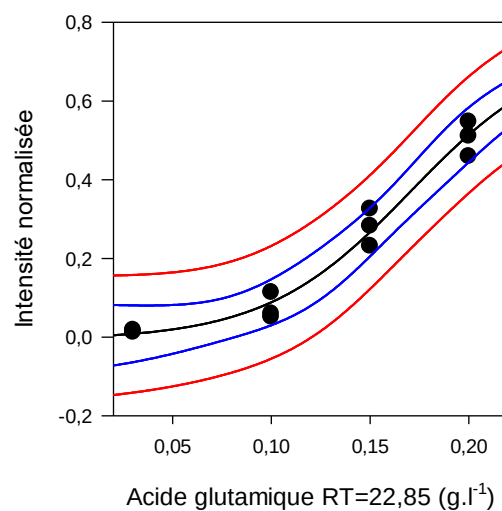
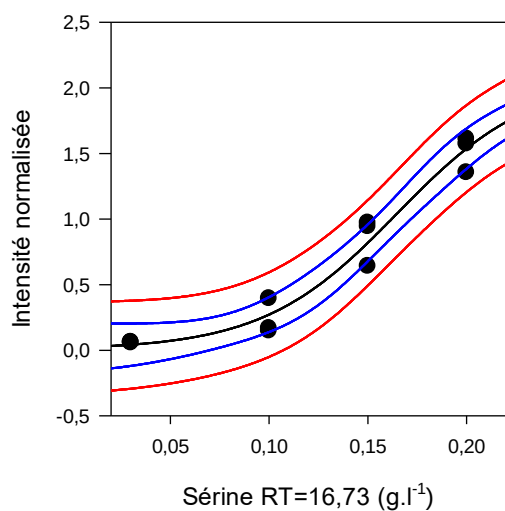
Acides organiques :

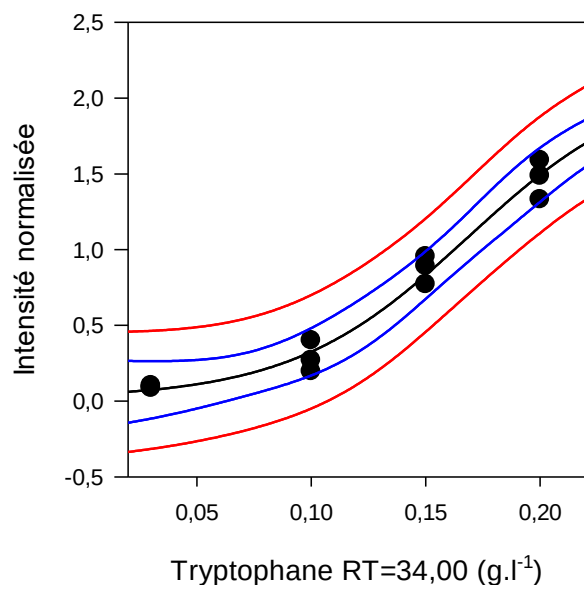




Acides aminés :







Annexe C. Analyse préliminaires de l'étape de déprotéination

L'EL est une matrice complexe constituée de nombreux petits composés et de molécules abondantes comme les protéines ou les lipides. La déprotéination des échantillons est une étape nécessaire pour la préparation des fractions métaboliques analysables par GC-MS ou par RMN. Bien que des protocoles de déprotéination en milieu acide aient été majoritairement trouvés dans la littérature, ils n'ont pas été retenus, afin d'éviter la dégradation de composés potentiellement labiles (Hanai 1991) et dans le but d'éviter l'étape de neutralisation (exothermique) nécessaire à la suite de l'analyse. Seuls les protocoles de déprotéination à froid et utilisant des solvants organiques (acétone et l'éthanol) ont été employés pour ces essais (voir Déprotéination des échantillons). Pour des raisons pratiques, l'optimisation de cette étape n'a été réalisée que sur un des deux solvants de déprotéination utilisés dans la suite de ces travaux pour le profilage. L'acétone a été choisie en raison de sa température d'ébullition, facilitant notamment les étapes de séchage ultérieures. Le développement méthodologique présenté ci-après a pour objectif d'optimiser les paramètres expérimentaux de la déprotéination (taux de solvant et temps de contact avec la matrice EL) et de valider les modalités testées pour ce dernier. Le paramètre sélectionné comme étant le plus influant au regard de la quantité de matière extraite et donc des informations métaboliques potentielles qu'il contient, sera retenu pour l'optimisation croisée déprotéination – extraction des métabolites par polarité, en exploitant un solvant ternaire d'extraction (Méthanol-Chloroforme-Eau ou MCW).

- Paramètres expérimentaux influençant la déprotéination

Les paramètres sélectionnés sont le ratio solvant de déprotéination / échantillon, appelé taux de solvant et la durée de mise en contact avec les échantillons, appelé temps de contact. Ces paramètres seront explorés en fonction de leur impact sur la précipitation des protéines et sur la quantité de matière récupérée dans le surnageant.

- Taux de solvant

Il est exprimé ici en ratio entre le volume de solvant de déprotéination et le volume d'EL ramené à sa matière sèche. Un ratio de x20 correspondra à une déprotéination menée sur 400 µL d'EL avec 1,6 mL de solvant (Ratio volumique solvant / EL = 4, Ratio volume de solvant / matière sèche dans l'EL = 16). Les ratios utilisés dans le cadre de ces essais sont de x16, x32, x40 et x56. Un test a été réalisé avec un ratio de x320, mais en raison du temps d'évaporation nécessaire cet essai n'a été mené que pour un temps de contact donné et non pour les quatre modalités de ce paramètre.

- Temps de contact

Le temps de contact correspond au temps d'incubation à -20°C après mise en contact de l'échantillon d'EL avec le solvant de déprotéination et agitation au vortex. Les temps de contacts retenus pour cette étude sont de trente min, une h, deux h et quatre h.

- *Mesure de l'efficacité de la déprotéination*

Les mesures de l'efficacité de la déprotéination ont été réalisées quantitativement par gravimétrie et qualitativement par des analyses IRTF.

o *Résultats obtenus par gravimétrie*

La gravimétrie permet de rendre compte de la quantité de matière obtenue après déprotéination, mais ne permet pas de conclure quant à la représentativité métabolique des extraits. Elle doit donc être traitée comme un indicateur global, qui une fois maximisée, améliorera la probabilité d'obtenir un chémotypage qui soit le plus exhaustif possible.

La Figure 96 présente les résultats obtenus en fonction du ratio de solvant et pour un temps de contact fixe choisi arbitrairement à 30 min.

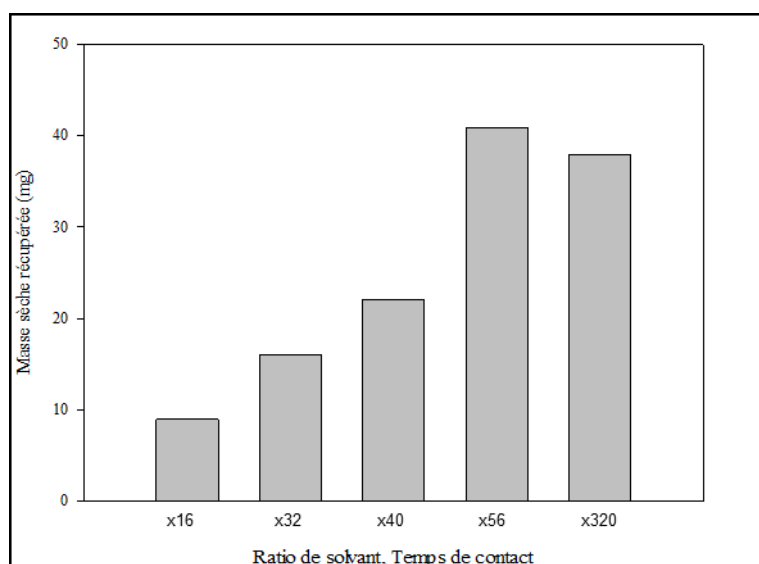


Figure 96. Matière sèche obtenue après déprotéination des échantillons d'EL en fonction du taux de solvant pour un temps de contact de 30 min.

La quantité de matière récupérée augmente de manière presque linéaire avec le taux de solvant utilisé pour les quatre premières modalités (x16, x32, x40 et x56). Le résultat obtenu pour l'échantillon traité avec un ratio de x320, proche de celui obtenu pour le ratio x56 suggère qu'un plateau soit atteint aux environs du ratio x56. Le ratio de solvant a un impact significatif puisque la quantité de matière récupérée augmente d'environ 300% entre le ratio x16 et le ratio x56.

La Figure 97 détaille les résultats obtenus cette fois-ci en fonction du ratio de solvant et du temps de contact.

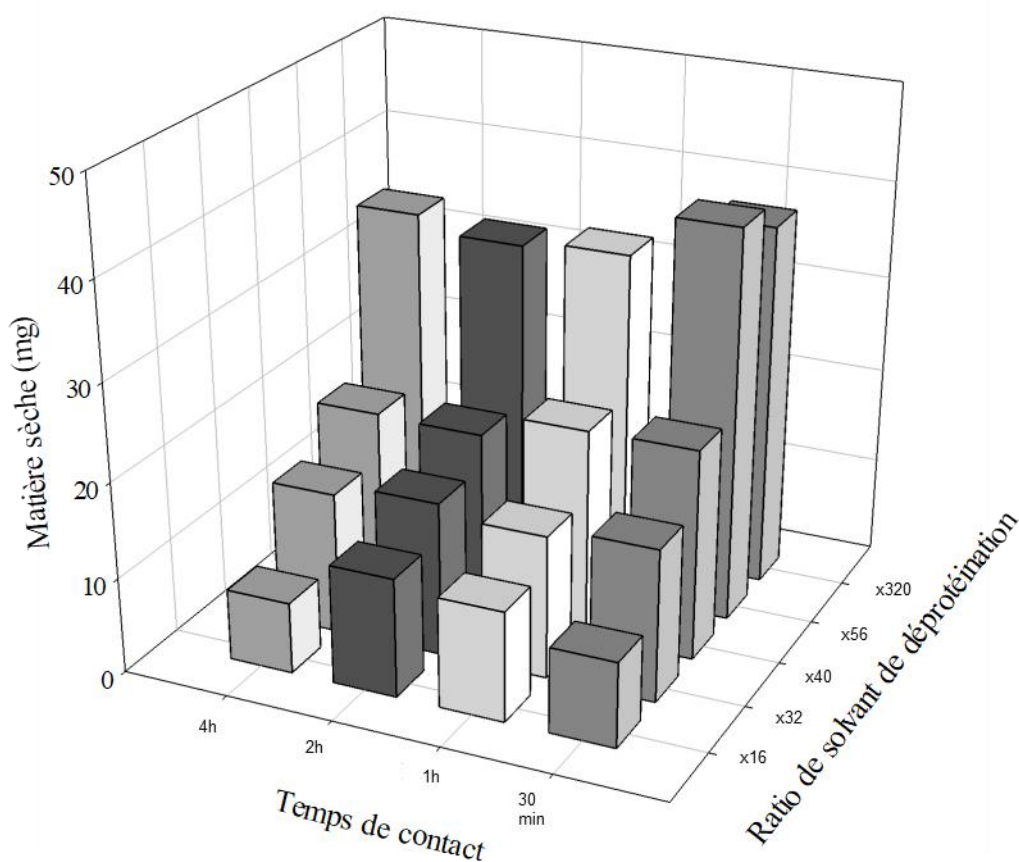


Figure 97. Matière sèche obtenue après déprotéination en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et du temps de contact.

L'augmentation du temps de contact présente un impact sur l'efficacité de la déprotéination avec un ratio de solvant de x16, puisque 8,92mg de matière sèche sont récupérés après 30 min et un maximum de 12,46 mg après de 2 h (soit 39,7% d'augmentation). Cet impact semble quasiment nul pour les échantillons déprotéinés avec un ratio de x32 avec une augmentation de 0,75% entre les quantités de matière récupérées pour un temps d'exposition de 30 min et une valeur maximum de matière sèche correspondant à 2h de temps d'exposition. Pour les ratios x40 et x56 un maximum de quantité de matière est récupérée pour un temps de contact de 30 min. Un temps de contact supérieur à 30 min semblerait même provoquer dans ce cas, une légère diminution de la quantité de matière récupérée (au maximum de 11,96% pour le taux de solvant x40 et de 12,76% pour le taux de solvant x56). Au regard de ces tendances, il est raisonnable de suggérer qu'à temps de contact variable, cela serait le taux de solvant qui impacterait plus significativement la quantité de matière récupérée après déprotéination. Le temps de contact étant un paramètre clé pour limiter la durée du protocole de préparation et son impact étant apparu comme relativement faible dans nos essais comparativement au taux de solvant, la modalité de 30 min a été retenue pour la suite des essais.

Les analyses par IRTF ont été réalisées afin de vérifier qualitativement l'efficacité de la déprotéination, et notamment pour détecter l'absence de protéines dans les surnageants. Ces analyses ont été effectuées par réflectance (voir ATR). Les spectres issus de ces analyses IRTF sont présentés dans la Figure 98.

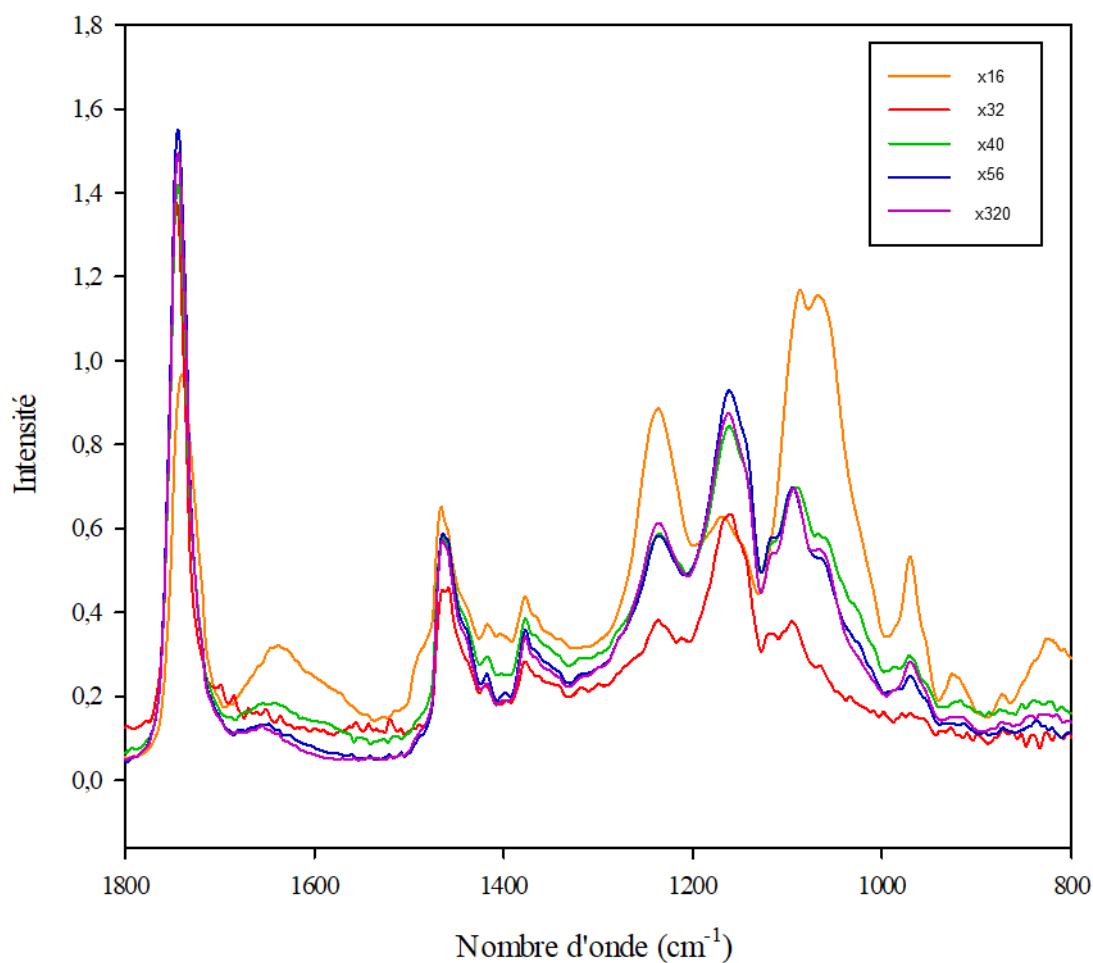


Figure 98. Spectres IRTF enregistrés sur les surnageants de déprotéination d'échantillons d'EL en fonction du taux solvant de déprotéination / échantillon pour un temps de contact de 30 min. Seule la zone spectrale de la signature biochimique de l'échantillon (800-1800cm⁻¹) est représentée.

Les spectres des échantillons correspondant aux ratios x16 et x32 présentent tous deux des pics peu résolus et d'une qualité spectrale globalement moyenne. L'échantillon x16 présente des intensités anormalement élevées et un signal résiduel attribué à l'eau est nettement visible autour de 1650 cm⁻¹. L'échantillon x32 présente quant à lui des variations de ligne de base importantes. Ces différences n'apparaissant que sur les ratios de solvant les plus faibles, laissent suggérer que la

présence d'eau résiduelle en proportion plus importante aurait pu interférer avec le séchage des échantillons sur la platine ATR. La formation d'un dépôt non homogène et la présence d'eau liée pouvant avoir ce type d'effet sur les spectres obtenus en IRTF (Coat *et al.* 2014). Les spectres correspondant aux autres échantillons (ratios de x40, x56, x320) présentent des profils très proches en dehors de quelques variations résiduelles de ligne de base. Les informations spectrales enregistrées indiquent clairement que le signal des protéines à 1540 cm^{-1} (Amide II) est absent de l'ensemble des échantillons. Cela confirme l'efficacité de la déprotéination et ce indépendamment du taux de solvant employé. Les variations d'intensité de la région Amide I (1650 cm^{-1}) ne sont pas pertinentes pour cette interprétation, car cette zone est impactée par le signal résiduel de l'eau (voir La spectroscopie Moyen InfraRouge (MIR)). La zone spectrale située entre 1500 et 1000 cm^{-1} apparaît identique en tout point sauf pour les spectres x16 et x32. Pour les autres signatures, les données sont suffisamment voisines, laissant supposer une chimiodiversité similaire. Cette observation qualitative est confirmée par des calculs de similarité entre les spectres, via l'estimation des coefficients de corrélation de Pearson. Les calculs ont été effectués sur ces échantillons par paire (après vérification de la normalité des données). Les résultats de ces analyses de corrélation sont présentées dans le Tableau 78, la p-value de ces tests est proche de 0 et donc statistiquement significative ($<0,05$). Les résultats confirment les tendances observées sur les spectres. Les profils IRTF des échantillons correspondant aux ratios x16 et x32 présentent des variations significatives par rapport aux trois autres échantillons (x40, x56, x320), en outre la proximité entre ces trois derniers échantillons est très importante comme le montrent les scores de corrélation ($>0,994$).

Tableau 78. Coefficients de corrélations de Pearson obtenus en comparant les échantillons par paires.

Coefficient de corrélation de Pearson	X32	X40	X56	X320
X16	0,56	0,806	0,758	0,779
X32		0,921	0,943	0,934
X40			0,995	0,994
X56				0,997

- Conclusion

Les analyses gravimétriques ayant clairement montré l'impact prépondérant du taux de solvant sur le temps de contact, ce paramètre a été retenu comme variable d'optimisation pour la suite des développements méthodologiques : optimisation croisée déprotéination / séparation en fractions métaboliques de polarité complémentaires. Les taux de solvant x16 et x32 ont été retenus pour l'analyse croisée (plan d'expériences à deux facteurs) et la gamme testée ajustée à x56 et x80 afin de mieux recouvrir la plage de valeurs étudiées. Le temps de contact a été fixé à 30 min pour la suite des

essais, permettant d'assurer une déprotéination efficace (avec des quantités de matière optimales au regard des valeurs mesurées avec des temps de contact plus longs) et une chimiodiversité comparable comme suggéré par les résultats de profilage IRTF.

Annexe D. Détails de l'analyse combinée déprotéination / séparation en fractions métaboliques

- Résultats des analyses par gravimétrie

La distribution des matières sèches obtenues dans les surnageants de déprotéination en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon avec un temps de contact de 30 min est présentée dans la Figure 99.

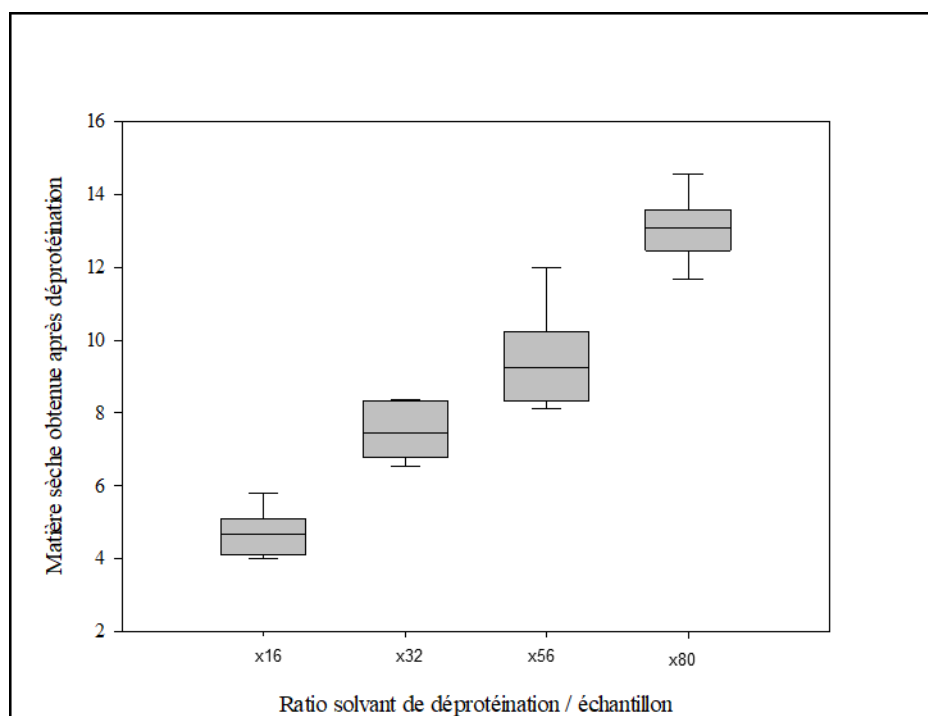


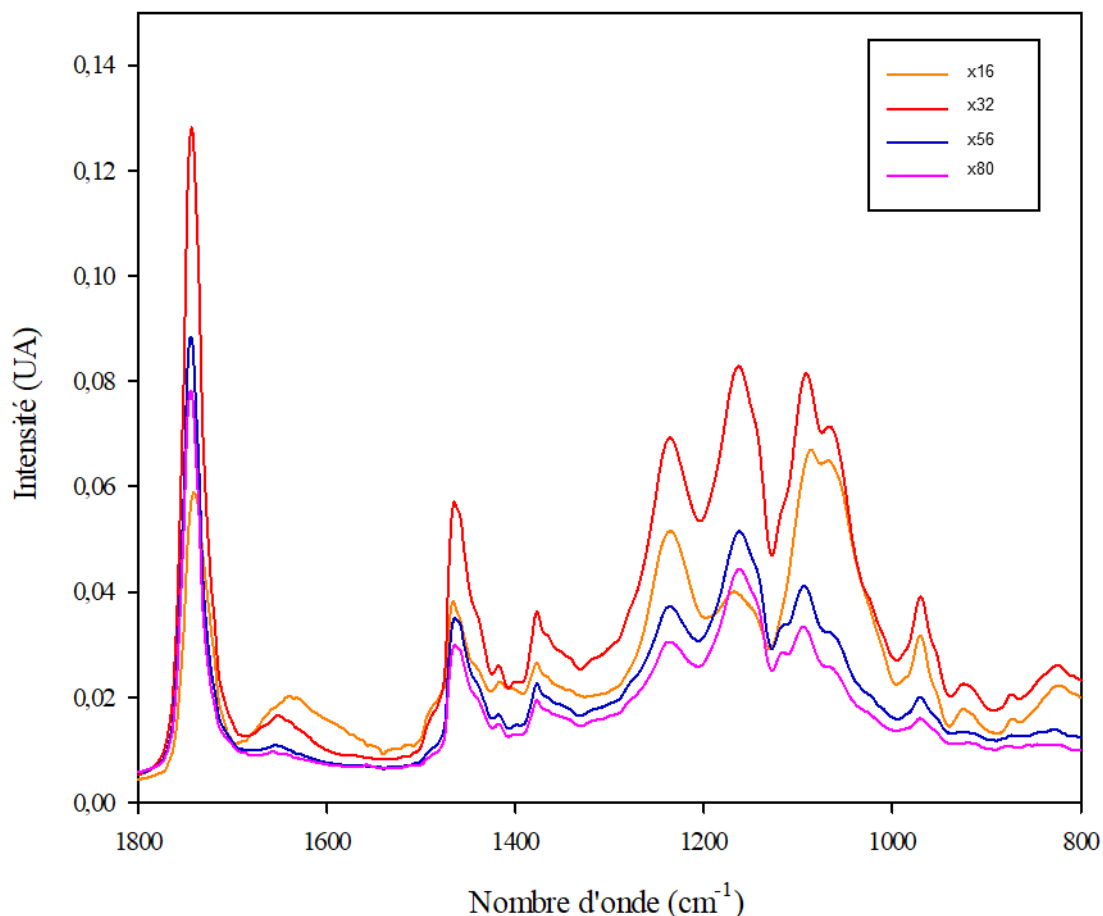
Figure 99. Matière sèche obtenue dans les surnageants de déprotéination en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon.

La quantité de matière sèche récupérée dans les surnageants de déprotéination évolue de manière presque linéaire avec le ratio de solvant, les valeurs moyennes des ratios x16, x32, x56 et x80 étant respectivement de 4,69, 7,53, 9,43 et 13,06 mg. Les coefficients de variation calculés pour ces mêmes ratios sont tous inférieurs à 15 % (respectivement de 13,80%, 10,52%, 14,73% et 7,08%), rendant compte d'une répétabilité acceptable de la méthode de déprotéination. Ils seront utilisés à terme pour conclure sur l'impact significatif du ratio de solvant de déprotéination sur la quantité de matière sèche obtenue.

- Contrôle rapide de la chimiodiversité par IRTF

Des profilages par IRTF ont été réalisés afin de vérifier l'efficacité de la déprotéination et pour obtenir une information rapide sur la chimiodiversité ainsi accessible. Ces analyses ont été effectuées selon le protocole d'analyse IRTF par réflexion totale atténuée (voir ATR). La

Figure 100 présente les spectres moyens des surnageants de déprotéination séchés en fonction



du ratio de solvant utilisé, ces spectres ont été moyennés sur 5 répliques.

Figure 100. Spectres FTIR de surnageants de déprotéination d'échantillons d'EL en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon pour un temps de contact de 30 min. Seule la zone spectrale de la signature biochimique de l'échantillon est représentée (800 – 1800cm⁻¹).

Qualitativement, les spectres correspondant aux ratios x16 et x32 semblent moins bien résolus que ceux correspondant aux ratios x56 et x80. Ils présentent une intensité plus importante sur la majorité des bandes et une contribution visible et plus marquée du signal résiduel de l'eau à environ 1650 cm⁻¹. Cette observation est cohérente avec les observations réalisées lors des essais préliminaires

. En dehors de ces différences, probablement dues à une efficacité de séchage moindre, augmentant les teneurs d'eau résiduelle dans les échantillons (plus abondante dans les surnageants de déprotéination pour lesquels des taux de solvants plus faibles ont été employés), les spectres demeurent très similaires et ne présentent que de faibles variations de ligne de base. Ces analyses confirment de plus l'efficacité de la déprotéination puisque l'intensité de la bande mesurée dans la région Amide II (1540 cm^{-1}) est négligeable pour l'ensemble des spectres confirmant que la totalité des protéines a été précipitée lors de l'étape de déprotéination.

Afin d'estimer quantitativement la similitude des signatures chimiques IRTF, des coefficients de corrélation de Pearson ont été calculés sur ces échantillons par paires (après vérification de la normalité des données). Les résultats de ces analyses de corrélation sont présentés dans le Tableau 79, la p-value de ces tests, proche de 0 ($<0,05$) indique qu'ils sont statistiquement significatifs.

Tableau 79. Coefficients de corrélations de Pearson obtenus par comparaison des échantillons par paires.

Coefficient de corrélation de Pearson	X32	X56	X80
X16	0,914	0,813	0,769
X32		0,972	0,945
X56			0,994

Les calculs des coefficients de corrélation permettent de confirmer les observations qualitatives réalisées sur les spectres. Le profil IRTF des échantillons correspondant au ratio x16 apparaît peu similaire aux signatures des échantillons x56 et x80, probablement à cause des variations importantes d'intensité enregistrées dans certaines zones du spectre. Celui correspondant au ratio x32 est quant à lui très proche des profils des échantillons x56 et x80, car associé à des scores de corrélation supérieurs à 0,94. Le fait qu'il ne présente que des variations d'intensité globale par rapport aux autres échantillons (x56 et x80) pourrait expliquer ce résultat. Les différences observées pour le spectre correspondant aux échantillons déprotéinés avec un ratio de solvant de x16 pourraient comme précédemment être expliquées par l'impact d'une plus grande quantité d'eau résiduelle lors du séchage avant enregistrement des signaux IRTF.

A ce stade des investigations, les signatures IRTF confirment clairement l'efficacité de la déprotéination, et ce quel que soit le ratio utilisé. Cependant, il apparaît qu'un ratio x16 présente une signature spectrale significativement différente de celles obtenues avec des ratios supérieurs. L'eau résiduelle pourrait expliquer les différences observées. De même, il semblerait inutile d'accroître les ratios de solvant de déprotéination au-delà de x32, puisque les signatures IRTF n'évoluent plus au-delà de cette valeur. Une approche plus quantitative, reliant la chimiodiversité accessible à ces différentes approches de déprotéination (considérées comme efficaces), en fonction des systèmes de

fractionnement envisagés est cependant nécessaire pour le développement d'un protocole maximisant les chances de découverte de biomarqueurs de l'altération.

- *Analyse de la chimiodiversité par prise d'empreintes métaboliques par GC-MS*

Des analyses de chimiodiversité sans a priori ou « prise d'empreintes métaboliques », ont été réalisées par GC-MS afin d'affiner l'estimation de la chimiodiversité en fonction des approches de déprotéination / fractionnement métabolique testées. L'objectif était dans un premier temps de maximiser l'intensité des signaux détectés par la prise d'empreinte tout en minimisant la variabilité analytique. Les analyses ont été réalisées selon le protocole d'analyse des extraits d'EL par GC-MS (voir Paramètres d'analyse) et tous les signaux extraits et traités selon le protocole de traitement des chromatogrammes obtenus en GC-MS (voir Traitement des chromatogrammes obtenus par GC-MS). En résumé, les résultats ont été soumis à un filtre avant d'être considérés comme informatifs. Les signaux devaient être présents dans 10% des échantillons d'une classe pour être considérés comme pertinents, les autres étaient éliminés. Les classes d'échantillons, MCW_A, MCW_B et MCW_C étant chacune composées de 16 échantillons, les signaux devaient être présents dans 2 spectres sur les 16 pour être considérés comme pertinents. Les résultats sont présentés indépendamment pour les fractions polaires et apolaires. Dans un deuxième temps, les signaux correspondant à chaque fraction ont été comparés aux spectres de la base de données « Golm Metabolome Database » ou GMD dans le but d'effectuer une première annotation. Les signaux ont été annotés de manière automatique à l'aide de la plateforme W4M et d'un script d'annotation Python développé dans le cadre de ces travaux. L'annotation se fait sur la base des indices de rétention des composés et de la valeur d'au moins un paramètre de corrélation classiquement employé pour la comparaison de spectres de masse (distance euclidienne, produit scalaire, distance de Jaccard). Le détail du processus d'annotation est présenté dans la partie 3.4.3. La présence des composés ainsi annotée dans les fractions polaires et apolaires en fonction des paramètres employés a ensuite été explorée.

o *Distribution des intensités des signaux associées aux
chénotypes enregistrés par GC-MS*

La distribution des intensités associées aux pseudo-composés détectés a été analysée afin de déterminer les paramètres de déprotéination et de fragmentation permettant l'obtention de signaux plus intenses de façon répétable. Les analyses présentées dans cette partie ont été effectuées sur tous les signaux à l'exception de trois pics majoritaires. Les signaux des composés correspondants (glucose et cholestérol) ont été soustraits de l'analyse afin de mieux refléter l'impact des pics d'intérêt. La

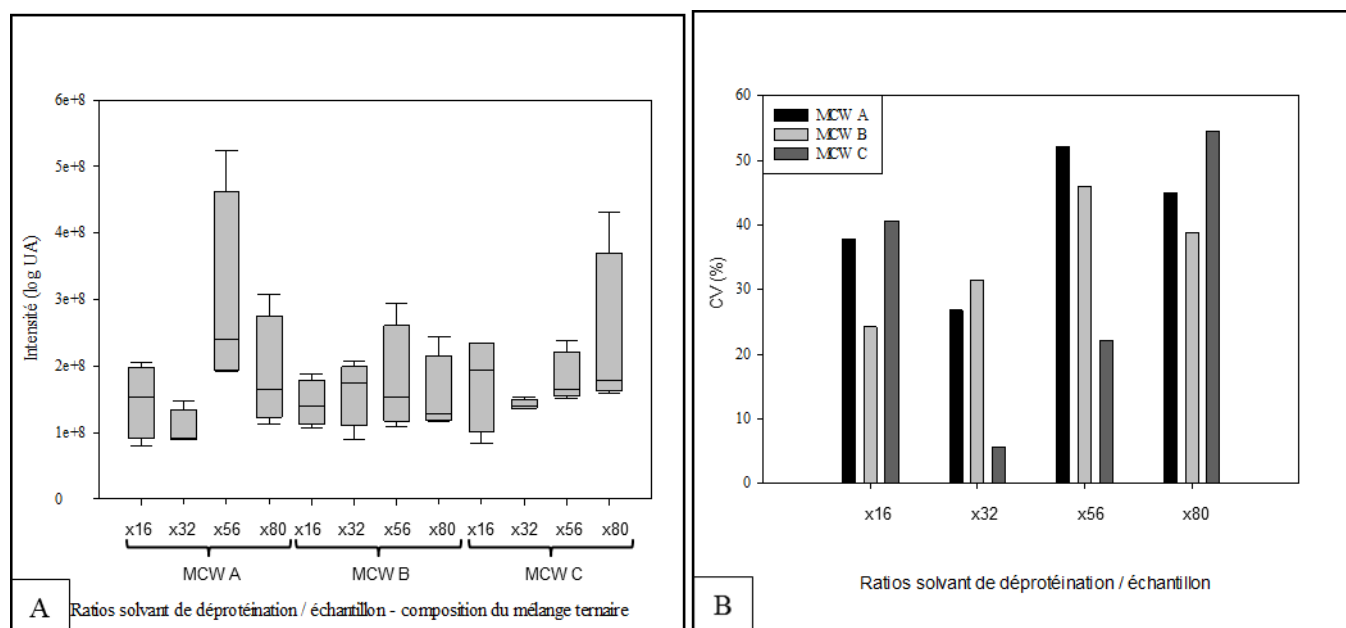


Figure 101 présente les distributions des sommes des aires obtenues pour la fraction polaire en fonction des ratios de solvant et de la composition du mélange ternaire utilisé.

Figure 101. Distribution des sommes des aires des signaux détectés dans la fraction polaire en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et de la composition du mélange ternaire utilisé (A). Coefficients de variation associés à la distribution des sommes des aires des signaux détectés dans la fraction polaire en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et de la composition du mélange ternaire utilisé (B).

La première observation est que le taux de solvant de déprotéination ne n'a qu'un impact limité sur les valeurs médianes des aires cumulées pour la fraction polaire. Les valeurs moyennes d'intensité varient entre $1,05 \cdot 10^8$ pour le MCW A utilisé avec un ratio de x32 et $2,95 \cdot 10^8$ pour le MCW A utilisé avec un ratio de x56 (meilleur résultat). L'intensité moyenne des aires cumulées pour l'ensemble des échantillons est de $1,76 \cdot 10^8$. En raison de l'étendue des distributions, les médianes moins impactées par les valeurs extrêmes, sont plus informatives que les moyennes et seront

exploitées dans ce qui suit pour les interprétations. Les valeurs d'intensité médianes varient entre $9,21.10^7$ pour le MCW A avec un ratio x32 et $2,39.10^8$ pour le MCW A avec un ratio de x56 (meilleurs résultats). La moyenne des intensités médianes des aires cumulées pour l'ensemble des échantillons est de $1,6.10^8$. Les coefficients de variation obtenus sur ces mesures s'étendent entre 5,54% pour le MCW C avec un ratio de x32 (meilleurs résultats) et 54,54% pour le MCW C avec un ratio de x80 (plus mauvais résultats). Le coefficient de variation moyen de l'ensemble des analyses étant de 35,42%. La variabilité ne semble ici que peu corrélée avec un des facteurs explorés (taux de solvant ou composition du mélange MCW). Malgré tout, les meilleurs compromis seraient obtenus avec le MCW B pour les ratios x16 et x80 avec 24,21% et 38,87% et avec le MCW C pour les ratios x32 et x56 avec 5,54% et 22,15%.

La même démarche a été suivie avec les données enregistrées sur la fraction apolaire. Le nombre de signaux ou de pseudo-composés détectés en fonction des ratios de solvant de déprotéination et de la composition du mélange ternaire utilisé sont présentés dans la

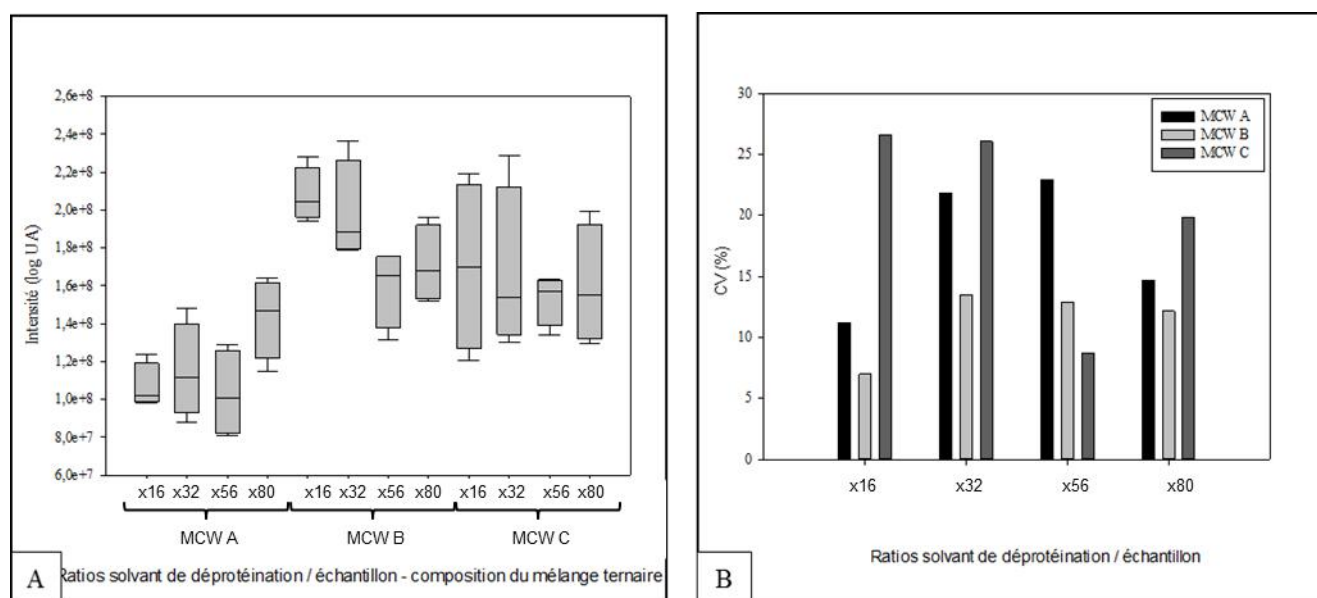


Figure 102. Distribution des sommes des aires des signaux détectés dans la fraction apolaire en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et de la composition du mélange ternaire utilisé (A). Coefficients de variation associés à la distribution des sommes des aires des signaux détectés dans la fraction apolaire en fonction du ratio solvant de déprotéination / échantillon et de la composition du mélange ternaire utilisé (B).

Tout comme pour la fraction polaire, en première observation le taux de solvant n'a qu'un impact limité sur les valeurs médianes des signaux cumulés enregistrés. Les valeurs médianes des intensités varient entre $1,02.10^8$ pour le MCW A avec un ratio de x16 et $2,04.10^8$ pour le MCW B avec un ratio de x16 (meilleurs résultats). La moyenne des intensités médianes des aires cumulées

pour l'ensemble des échantillons est de $1,52.10^8$. Les coefficients de variation obtenus sur ces mesures s'étendent entre 6,99% pour le MCW B avec un ratio de x16 (meilleur résultat) et 26,61% pour le MCW C avec un ratio de x16. Le coefficient de variation moyen de l'ensemble des analyses est de 16,45%. Là aussi, l'intensité de la variabilité ne semble que peu corrélée avec l'un des facteurs exploré (taux de solvant ou composition du mélange MCW). Les meilleurs résultats sont obtenus avec le MCW B pour les ratios de x16, x32 et x80 et avec le MCW C pour le ratio x56.

En conclusion intermédiaire, il apparaît que le taux de solvant n'a que peu d'impact sur les valeurs médianes des aires cumulées. Cela permet de rejeter l'hypothèse selon laquelle l'extraction des composés serait réalisée préférentiellement en fonction du taux de solvant. En effet, une augmentation significative de la quantité de composés détectables injectée aurait très probablement impliqué une augmentation de la valeur de la somme des aires cumulées. Or, les moyennes des médianes de ces aires obtenues pour l'ensemble des mélanges MCW utilisés avec des ratios de solvant de déprotéination de x16, x32, x56 et x80 sont quasi constantes (respectivement de $1,63.10^8$, $1,33.10^8$, $1,85.10^8$ et $1,57.10^8$ pour les fractions polaires, et de $1,59.10^8$, $1,51.10^8$, $1,41.10^8$ et $1,56.10^8$ pour les fractions apolaires). Cette évolution ne serait donc pas corrélée avec l'augmentation presque linéaire constatée sur les quantités de matière obtenues après déprotéination en fonction du taux de solvant employé (voir partie -).

o *Résultats de variabilité pour l'ensemble des fractions*

Dans le but d'évaluer la variabilité correspondante à chaque couple de paramètres lors des étapes de déprotéination et de séparation des fractions métaboliques, les CV moyens ont été calculés pour chacune des fractions étudiées. Les CV calculés sur de petites distributions (4 réplicats par conditions) étant très sensibles aux valeurs extrêmes, l'analyse de cet indicateur n'est réalisée que pour les composés détectés dans tous les réplicats d'une analyse. En effet l'absence de certains composés dans un des réplicats (due par exemple à une intensité inférieure au seuil de coupure lors de la filtration du bruit de fond) engendrerait une hausse importante du coefficient de variation moyen pouvant nuire à l'analyse de cet indicateur.

Les CV moyens et médians pour les fractions métaboliques correspondant à chaque couple de paramètres étudiés sont présentés dans le Tableau 80.

Tableau 80. Coefficients de variation moyens, médians et nombre de composés analysés pour le calcul pour chacune des fractions métaboliques étudiées.

Pour les composés détectés dans tous les réplicas uniquement												
Mélange MCW	MCW A				MCW B				MCW C			
Ratio solvant de déprotéination / échantillon	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80	x16	x32	x56	x80
Fractions polaires												
CV Moyen	46,58	44,67	45,12	50,20	34,68	45,87	36,02	26,79	44,09	28,51	25,07	43,81
CV Médian	44,83	46,81	46,72	50,51	37,28	46,71	33,65	22,66	40,26	27,45	23,05	43,08
Nb composés	23	23	24	23	27	29	25	22	24	31	26	22
Fractions apolaires												
CV Moyen	21,64	26,81	24,18	17,99	18,90	25,83	17,96	17,37	28,21	24,74	17,16	14,31
CV Médian	16,80	24,74	20,52	15,13	13,88	21,30	16,87	16,69	20,23	19,21	12,65	14,19
Nb composés	17	25	23	27	28	28	30	29	25	31	30	30

Le coefficient de variation moyen mesuré pour l'ensemble des fractions polaires est de 39,28% contre 21,26% pour les fractions apolaires. Les coefficients de variation moyens varient entre 25,07 (x56 MCW C) et 50,20 (x80 MCW A) pour les fractions polaires et entre 14,31 (x80 MCW C) et 28,21 (x16 MCW C) pour les fractions apolaires.

La moyenne des coefficients de variation médians mesurés pour l'ensemble des fractions polaires est de 38,58 contre 17,68 pour les fractions apolaires. La différence relativement faible entre les valeurs moyennes et médianes pour l'ensemble des échantillons (0,70 pour les fractions polaires, 3,57 pour les fractions apolaires) montre une certaine homogénéité des distributions des coefficients de variation, ces distributions semblent néanmoins plus étendues pour les fractions apolaires. Les coefficients de variation médians varient entre 22,66 (x80 MCW B) et 46,81 (x32 MCW A) pour les fractions polaires et entre 12,65 (x56 MCW C) et 24,74 (x32 MCW A).

Le nombre de composés détectés dans chaque réplicat des échantillons étudiés varie entre 22 (x80 MCW C) et 31 (x32 MCW C) pour les fractions polaires et entre 17 (x16 MCW A) et 30 (x56 MCW B) pour les fractions apolaires. Le nombre moyen de composés détectés étant de 25 pour les fractions polaires et de 27 pour les fractions apolaires.

Les résultats de variabilité ne semblent encore une fois pas corrélés avec l'un ou l'autre des facteurs étudiés (taux de solvant de déprotéination et composition du mélange MCW). En conclusion intermédiaire, on peut noter que différents couples de paramètres semblent présenter une faible variabilité des signaux. Les ratios x16 avec le MCW B et x32 et x56 avec le MCW C présentent ici des coefficients de variation moyens et médians inférieurs à 40 % pour les fractions polaires et apolaires (x16 MCW B, x32 MCW C et x56 MCW C).

Annexe E. Résultats détaillés de l'analyse de la variabilité interne des échantillons par profilage GC-MS

Les résultats présentés ci-après correspondent aux analyses après filtration selon le paramètre MCF 0.5 et normalisation sur l'intensité du standard interne (Ribitol) pour l'ensemble des fractions métaboliques analysées (apolaire éthanol, apolaire Acétone, polaire acétone et polaire éthanol). Une estimation de la corrélation entre les profils correspondant aux différents réplicats d'une même fraction métabolique a tout d'abord été réalisée à travers le calcul des coefficients de Spearman sur les réplicats par paires. La

Figure 103 présente la distribution des coefficients de corrélation de Spearman calculés sur les données spectrales déconvoluées, filtrées et normalisées pour ces différentes fractions métaboliques.

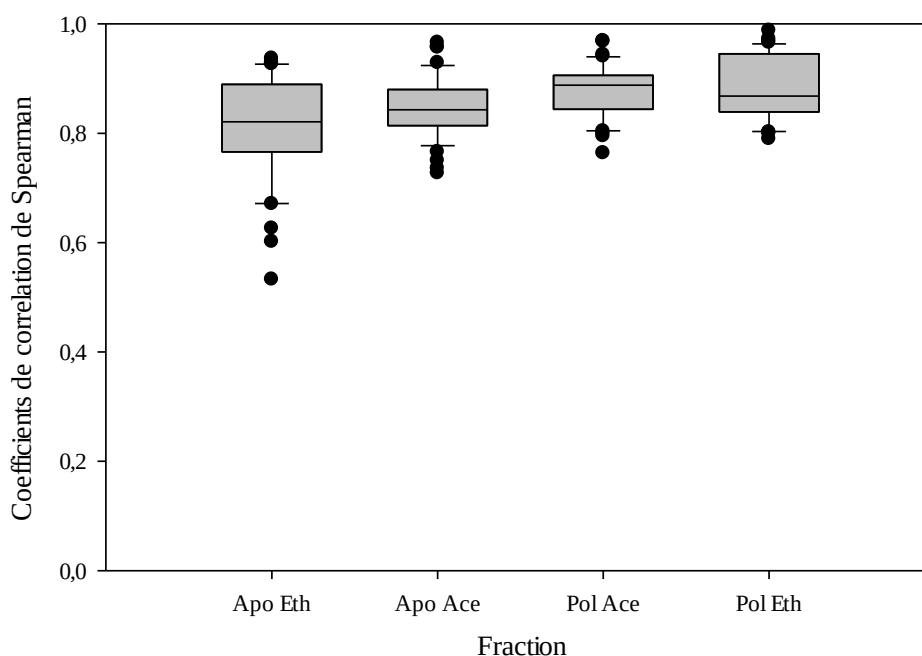


Figure 103. Distribution des coefficients de corrélation de Spearman calculés sur les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire éthanol (Apo Eth), apolaire acétone (Apo Ace), polaire acétone (Pol Ace) et polaire éthanol (Pol Eth) obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les échantillons ont été analysés par paire après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 et de normalisation sur l'intensité du standard interne.

Le calcul de ces coefficients permet ici de mesurer, à travers la corrélation de ces données, la répétabilité des analyses pour chacune des fractions métaboliques explorées. Les scores de corrélation médians et moyens des fractions explorées présentent tous des valeurs supérieures à 0,8, suggérant une similitude élevée entre les réplicats. Les scores moyens et médians de chaque fraction sont très proches (0,813 et 0,821 pour la fraction Apo Eth, 0,845 et 0,843 pour la fraction Apo Ace, 0,878 et 0,888 pour la fraction Pol Ace et enfin 0,881 et 0,868 pour la fraction Pol Eth) indiquant une distribution homogène des résultats. Le score de corrélation moyen le plus élevé est obtenu pour la fraction Polaire Ethanol (0,881), le plus faible est quant à lui associé à la fraction Apo Eth (0,813). Ce score moyen est

impacté par des scores faibles visibles sur la distribution de cette fraction. La répétabilité des prises d'empreintes métaboliques pour ces différentes fractions est globalement stable. Les scores de corrélation ne permettant pas l'analyse quantitative de la variabilité, les coefficients de variation ont été calculés pour chaque pseudo-composé. La distribution des CV obtenue pour l'ensemble de ces pseudo-composés est représentée pour chaque fraction sur la Figure 104.

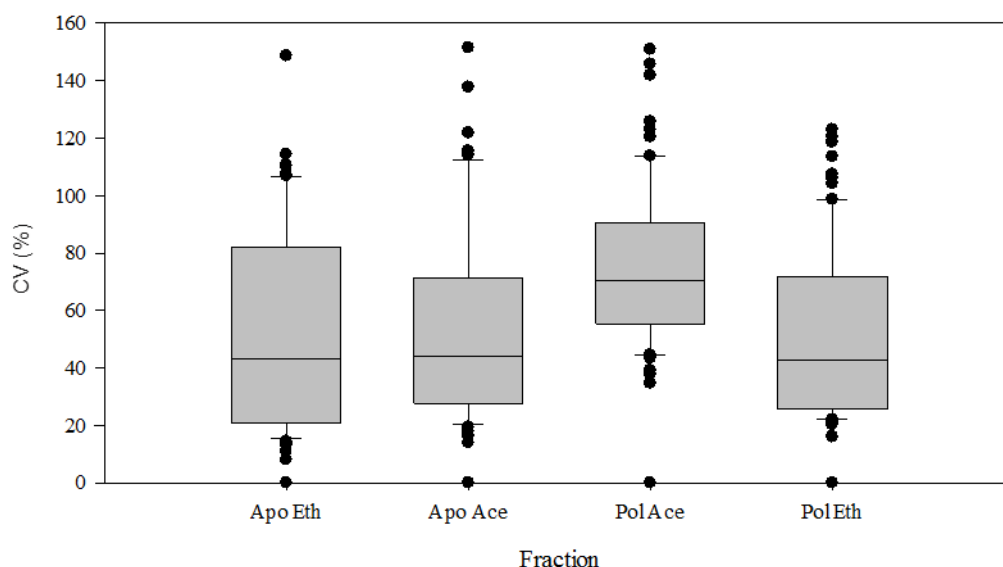


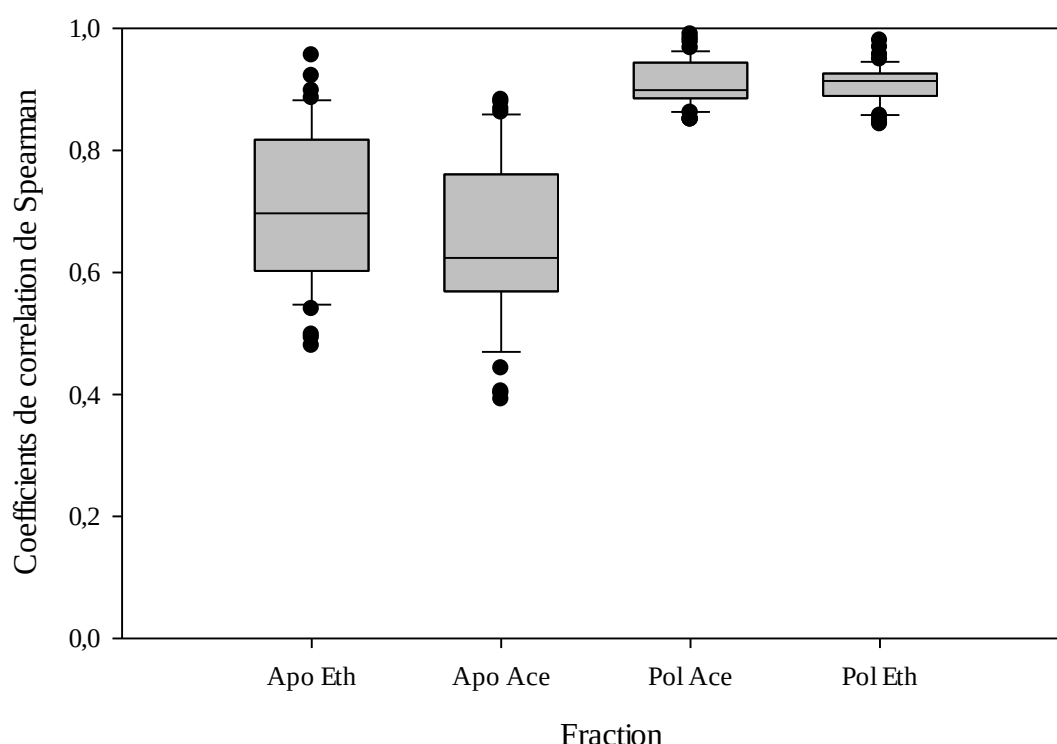
Figure 104. Distribution des coefficients de variations calculés par pseudo composés pour les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire éthanol (Apo Eth), apolaire acétone (Apo Ace), polaire acétone (Pol Ace) et polaire éthanol (Pol Eth) obtenues sur un échantillon frais d'EL. Les données ont été analysées après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 et de normalisation sur l'intensité du standard interne.

Malgré la présence de signaux présentant une forte variabilité (supérieure à 100%), les CV médians de la majorité des fractions métaboliques analysées restent sous un seuil acceptable en métabolomique, situé autour de 40% pour des analyses par prise d'empreinte (Courant *et al.* 2013). En effet le CV médian des fractions apolaire éthanol, apolaire acétone et polaire éthanol sont très proches (respectivement 43,13%, 43,94%, 42,90%). Seul le CV médian de la fraction polaire acétone est plus élevé (70,41%).

Annexe F. Résultats détaillés de l'analyse de l'impact de la congélation sur la variabilité interne des échantillons par profilage GC-MS

Les données présentées correspondent aux analyses après filtration selon le paramètre MCF 0.5 et normalisation sur l'intensité du standard interne.

La Figure 105 présente la distribution des coefficients de corrélation de Spearman calculés sur les données spectrales déconvoluées issues des différentes fractions analysées pour les échantillons



congelés.

Figure 105. Distribution des coefficients de corrélation de Spearman calculés sur les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire éthanol (Apo Eth), apolaire acétone (Apo Ace), polaire acétone (Pol Ace) et polaire éthanol (Pol Eth) obtenues sur un échantillon congelé d'EL. Les données ont été analysées par paire après une étape de filtration des signaux selon le paramètre MCF 0.5 et une étape de normalisation sur l'intensité du standard interne.

Comme pour les échantillons frais, les scores moyens et médians de chaque fraction sont similaires (0,707 et 0,697 pour la fraction apolaire éthanol, 0,653 et 0,624 pour la fraction apolaire acétone, 0,913 et 0,899 pour la fraction polaire acétone et enfin 0,907 et 0,914 pour la fraction polaire éthanol) suggérant une distribution homogène des résultats. Les scores de corrélation médians et moyens des fractions polaires (polaire acétone et polaire éthanol) sont toujours supérieurs à 0,8 suggérant une importante similitude entre les différents réplicas de ces fractions. Deux des fractions

apolaires ont vu leurs scores significativement modulés par rapport aux analyses sur échantillons frais. En effet, les scores moyens de corrélation des fractions apolaire éthanol et apolaire acétone diminuent de 0,813 et 0,845 à 0,707 et 0,653, tandis qu'au contraire les scores des fractions polaire acétone et polaire éthanol augmentent de 0,878 et 0,881 à 0,913 et 0,907. La congélation affecte donc négativement la similitude des données métaboliques obtenues sur fractions apolaires et n'avoir qu'un impact limité, voir positif, sur les données issues des fractions polaires.

Pour estimer l'impact de la congélation sur la variabilité des données métaboliques, les coefficients de variation ont également été calculés sur les informations extraites des échantillons congelés pour chaque pseudo-composé. La distribution des CV de l'ensemble de ces pseudo-composés pour chaque fraction est présentée sur la Figure 106.

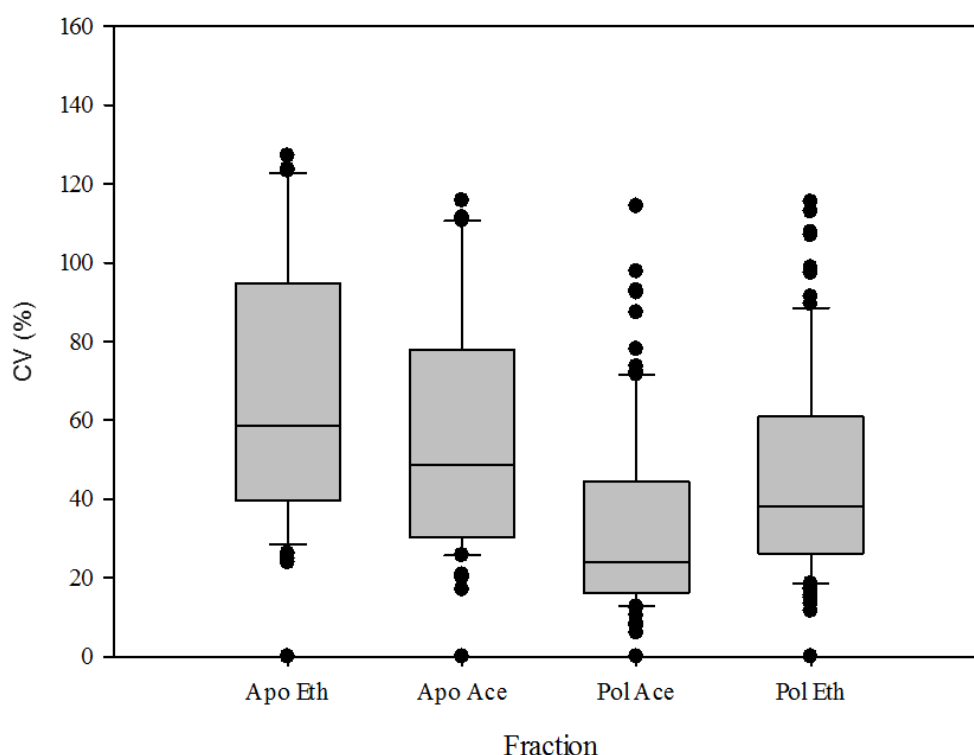


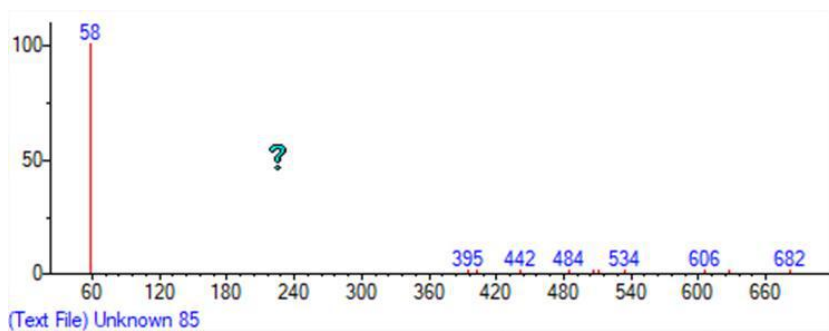
Figure 106. Distribution des coefficients de variations calculés pour les données spectrales déconvoluées (via l'outil Run.gc de la plateforme W4M) issues des TIC des fractions apolaire éthanol (Apo Eth), apolaire acétone (Apo Ace), polaire acétone (Pol Ace) et polaire éthanol (Pol Eth) obtenues sur un échantillon congelé d'EL. Les données ont été analysées après une étape de filtration selon le paramètre MCF 0.5 et une étape de normalisation sur l'intensité du standard interne.

Les CV médians suivent logiquement une évolution inverse à celle des coefficients de corrélation de Spearman. En effet, le CV médian de la fraction apolaire éthanol varie de 43,13% à 58,75%, celui de la fraction apolaire acétone de 43,94% à 48,64%, celui de la fraction polaire éthanol diminue de 42,90% à 38,00% et celui de la fraction polaire acétone de 70,41% à 24,13%. La congélation présente donc ici un impact négatif sur la variabilité des mesures pour les fractions apolaires, et un impact positif sur la variabilité des mesures pour les fractions polaires. La fraction

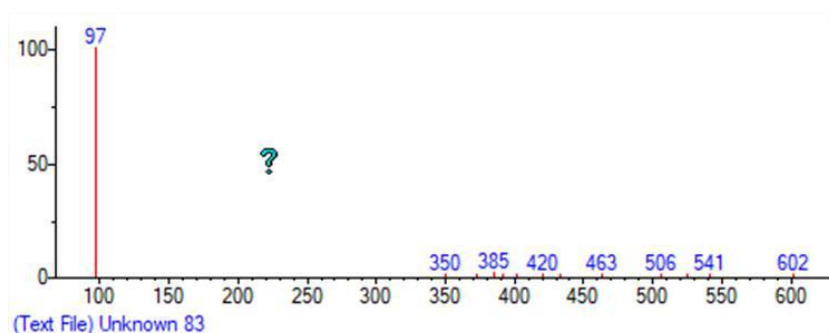
polaire acétone, qui présente la plus grande variabilité moyenne pour les échantillons frais, présente la variabilité la moins importante pour les échantillons congelés.

La variabilité médiane de l'ensemble des signaux, toutes fractions confondues, est nettement améliorée lors d'une conservation des échantillons à -20°C. En effet, elle évolue de 50% pour les échantillons frais à 42% pour les données enregistrées sur les échantillons congelés, avec un maximum pour la fraction polaire acétone qui diminue de 71% pour le frais à 25% pour le congelé. Les résultats indiquent qu'avec un protocole de préservation des échantillons d'EL même dégradé (à -20°C plutôt qu'à -80°C ou -196°C), il est malgré tout possible d'envisager de détecter des biomarqueurs, puisque la congélation à -20°C permet d'abaisser la variabilité interne médiane de la matrice de presque 8%, toutes fractions métaboliques confondues et de presque 46 % pour la fraction polaire acétone. Il est important de noter que l'analyse des fractions polaires est impactée de manière légèrement négative par cette étape de congélation, tandis que les fractions apolaires présentent un comportement inverse. Ce protocole dégradé de conservation, est finalement intéressant à exploiter en métabolomique, car il permettra de sélectionner principalement les composés thermostables et dont la cinétique de modulation est suffisamment lente au regard d'une utilisation comme marqueur d'alerte de l'altération, exploitable sur une chaîne de production. Avec un protocole de conservation à -196°C, une liste beaucoup plus exhaustive de candidats aurait été proposée, incluant des métabolites très labiles et à la cinétique de dégradation très rapide. L'exploitation de ces derniers candidats comme marqueur de l'altération des EL aurait été *de facto* beaucoup plus difficile à mettre en place sur une chaîne de production en raison de leur fugacité.

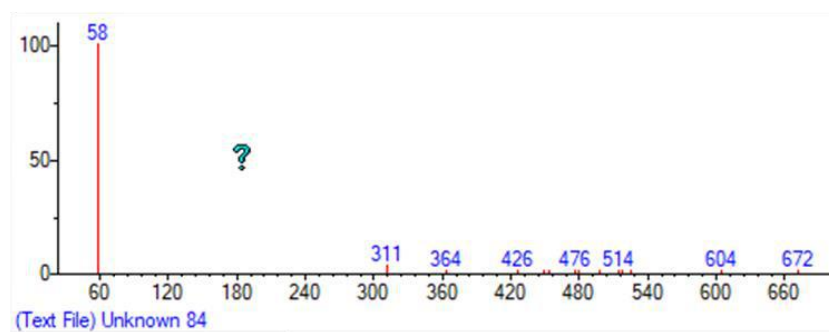
Annexe G. Exemples de spectres de masse de signaux éliminés lors de l'étape de filtration des signaux avec un paramètre MCF 0.5



Identification NIST08:
Diazene, dimethyl-
RI : 396
RT : 51,847



Identification NIST08:
1-Butyne, 3-ethoxy-3-methyl-
RI : 390
RT : 51,11



Identification NIST08:
Diazene, dimethyl-
RI : 396
RT : 55,001

Annexe H. Résultats de colorimétrie pour l'analyse des échantillons industriels

La Figure 107 présente les résultats de colorimétrie obtenus par la société ADRIA et par le laboratoire GEPEA. Ces mesures ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment (voir Chapitre 2 - Colorimétrie CIE $L^*a^*b^*$).

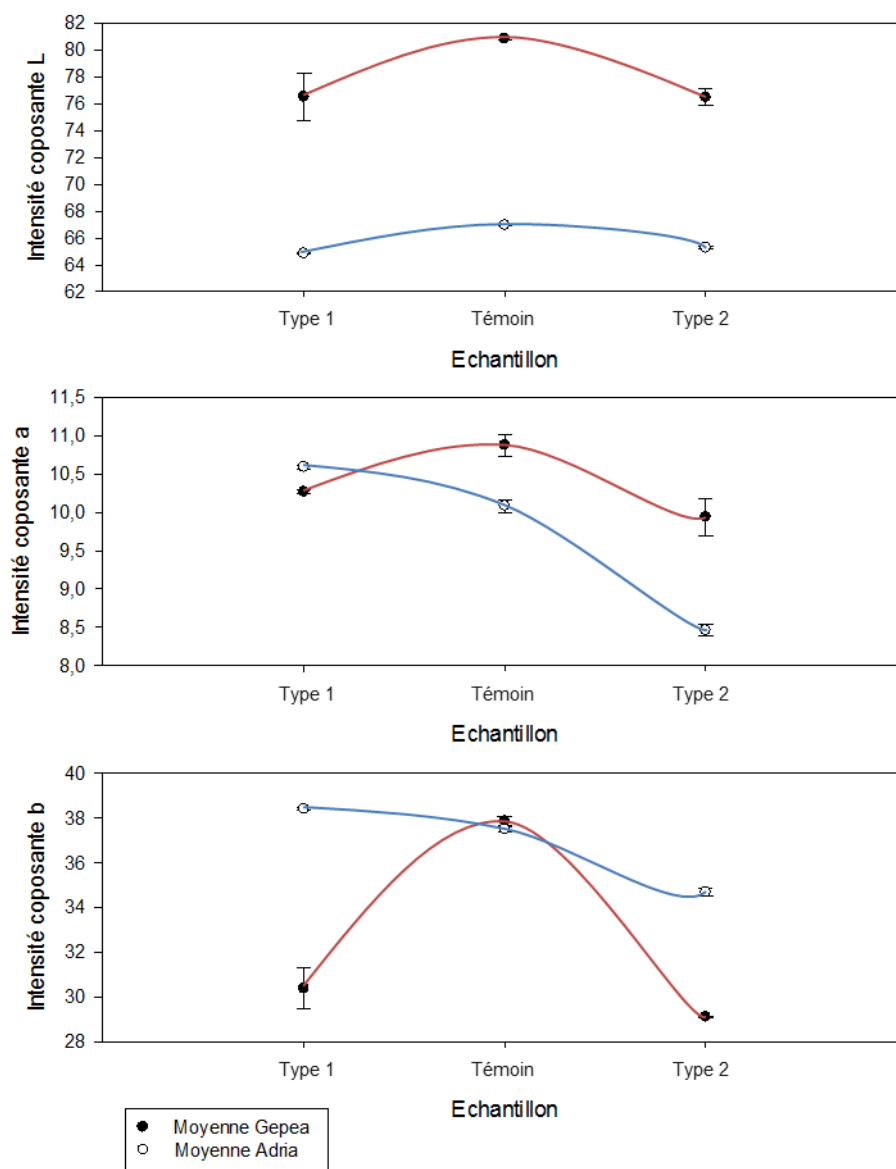


Figure 107. Mesures de colorimétrie en référentiel CIE Lab effectuées sur les échantillons industriels contrastés (témoin, type 1 et type 2). Les mesures ont été effectuées sur deux répliques prélevés séparément dans le pot d'origine après homogénéisation.

Les résultats des mesures colorimétriques présentent des différences significatives. La composante a présente le plus faible écart entre les mesures effectuées par les deux équipes avec des écarts moyen de 0,33, 0,8 et 1 pour les échantillons type 1, témoin et type 2. Des écarts plus importants sont mesurés pour la composante b avec des écarts moyens de 8, 0,4 et 5,5 pour ces mêmes échantillons. La composante L présente quant à elle les écarts moyens les plus importants (7,6, 14 et 11,2 pour les échantillons type 1, témoin et type 2). Ces observations sont cohérentes avec les données

recueillies lors de l'analyse de la variabilité des mesures colorimétriques réalisées dans le cadre des développements méthodologiques de ces travaux où les écarts types les plus importants avaient été enregistrés pour la composante L et les plus faibles pour la composante b.

En dehors de ces écarts, on peut constater que les profils enregistrés (augmentation ou diminution) en fonction du type d'altération ne sont pas les mêmes pour les composantes a et b. En effet, les scores pour ces composantes, telles que mesurées par la société ADRIA, seraient plus élevés pour l'échantillon type 1 que pour l'échantillon sain. Une tendance inverse serait observée pour les mesures effectuées par le GEPEA. Ces observations sont contradictoires avec les données recueillies lors de l'analyse de l'impact de la congélation sur les mesures colorimétriques qui avaient permis de conclure sur un faible impact de l'étape de congélation sur les mesures effectuées en colorimétrie. Il est possible, comme pour les mesures de pH, que la durée de la congélation ou qu'un volume de mesure plus important des échantillons aient induit un biais lors de cette étape. Il est également possible que les instruments de mesures utilisés dans les deux laboratoires soient calibrés de manière différente. Une simple correction d'ordonnée à l'origine n'étant pas possible en raison de la modification des profils observée, aucune comparaison ne sera effectuée sur les résultats de colorimétrie pour ces composantes. Concernant les indications mesurées sur la composante L, les variations relatives seraient les mêmes quel que soit le laboratoire menant ces mesures. Une altération provoquerait une diminution significative de la valeur de cette composante, et ce quel que soit le type d'altération, 1 ou 2. Cette baisse d'intensité de la composante L étant détectable avec une amplitude similaire pour les échantillons type 1 et type 2, il est difficile de le relier directement au blanchiment de l'échantillon constaté uniquement sur l'échantillon type 2.

Annexe I. Analyse de la répartition des marqueurs potentiels dans les différentes fractions étudiées pour les échantillons industriels

L'analyse de la répartition des marqueurs dans les fractions est représentée à l'aide de diagrammes de Venn (Figure 108). Cela a été conduit de façon indépendante pour les échantillons représentatifs des altérations de type 1 et 2 et pour l'ensemble des échantillons par fraction.

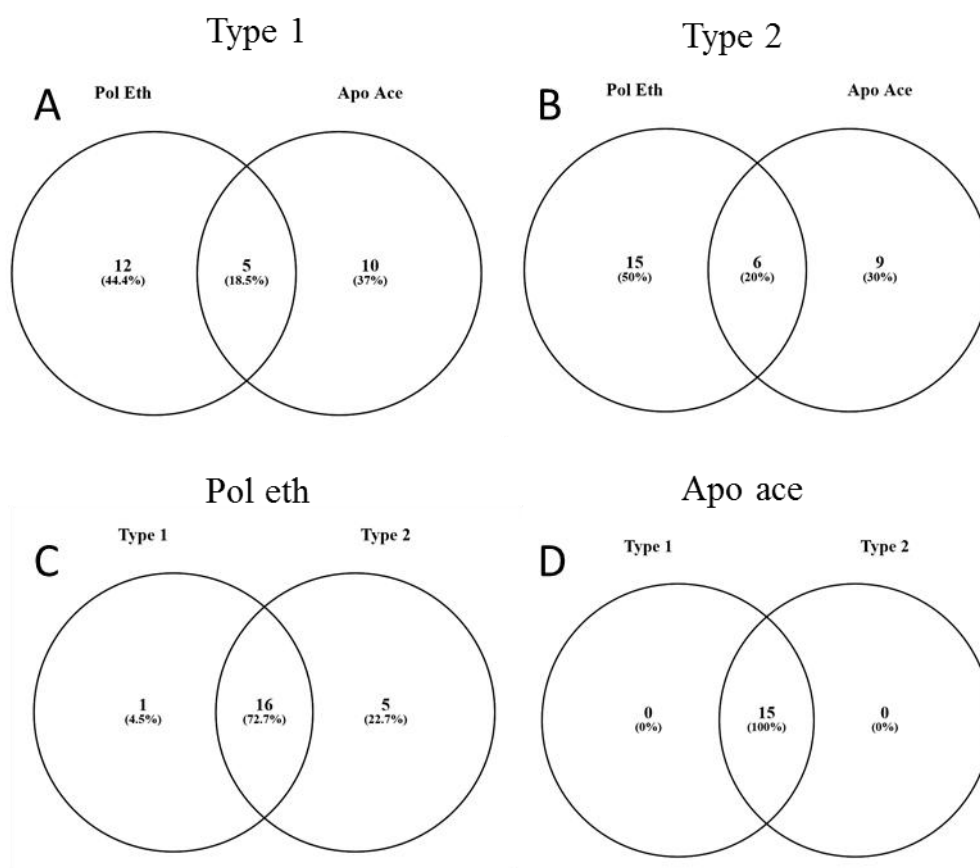


Figure 108. Diagramme de Venn présentant les composés d'intérêt identifiés dans les fractions polaire éthanol et apolaire acétone pour les altérations de type 1 (A) et 2 (B) et pour les altérations de type 1 et 2 dans les fractions polaire éthanol (C) et apolaire acétone (D).

La Figure 108 A permet de mettre en évidence la complémentarité entre les deux fractions analysées pour l'altération de type 1. Sur les 27 composés retenus, 12 sont présents uniquement dans la fraction polaire éthanol, 10 dans la fraction apolaire acétone et seul l'acide lactique, l'isoleucine, l'acide succinique, l'érythritol et le glucose sont présents à la fois dans les deux fractions. La Figure 108 B met en évidence cette même complémentarité pour l'altération de type 2. Sur les 30 composés retenus, 15 sont présents uniquement dans la fraction polaire éthanol, 9 uniquement dans la fraction apolaire acétone et seul l'acide lactique, l'isoleucine, le glycérol, l'acide succinique, l'érythritol et le glucose sont présents à la fois dans les deux fractions.

La Figure 108 C permet de visualiser le nombre de composés dont la variation est représentative des altérations de type 1, de type 2 ou des deux à la fois dans la fraction polaire éthanol.

La variation de 16 composés (Acide lactique, Leucine, Valine, Isoleucine, Alanine, Phénylalanine, Acide glutamique, Thréonine, Tyrosine, Acide succinique, Erythritol, Uracile, Tryptophane, Glucose, Sérine et Méthionine) est à la fois représentative des deux types d'altérations, l'urée est le seul composé à n'être représentatif que du type 1, le glycérol, la glycine, la cadavérine, l'acide benzoïque et le 3-phényl-lactique sont les seuls composés dont la variation n'est représentative que du type 2. La Figure 108 D permet d'effectuer la même analyse pour la fraction apolaire acétone pour laquelle tous les composés retenus (Glycérol, Norleucine, Erythritol, Acide succinique, Acide palmitique, Acide linoléique, Myo-inositol, Glucose, Cholestérol, Ergost-5-en-3-ol, Acide stéarique, Acide lactique, Isoleucine, Acide oléique, Acide palmitélaïdique) sont à la fois représentatifs des types 1 et 2.

Annexe J. Résultats du profilage métabolique pour les échantillons industriels

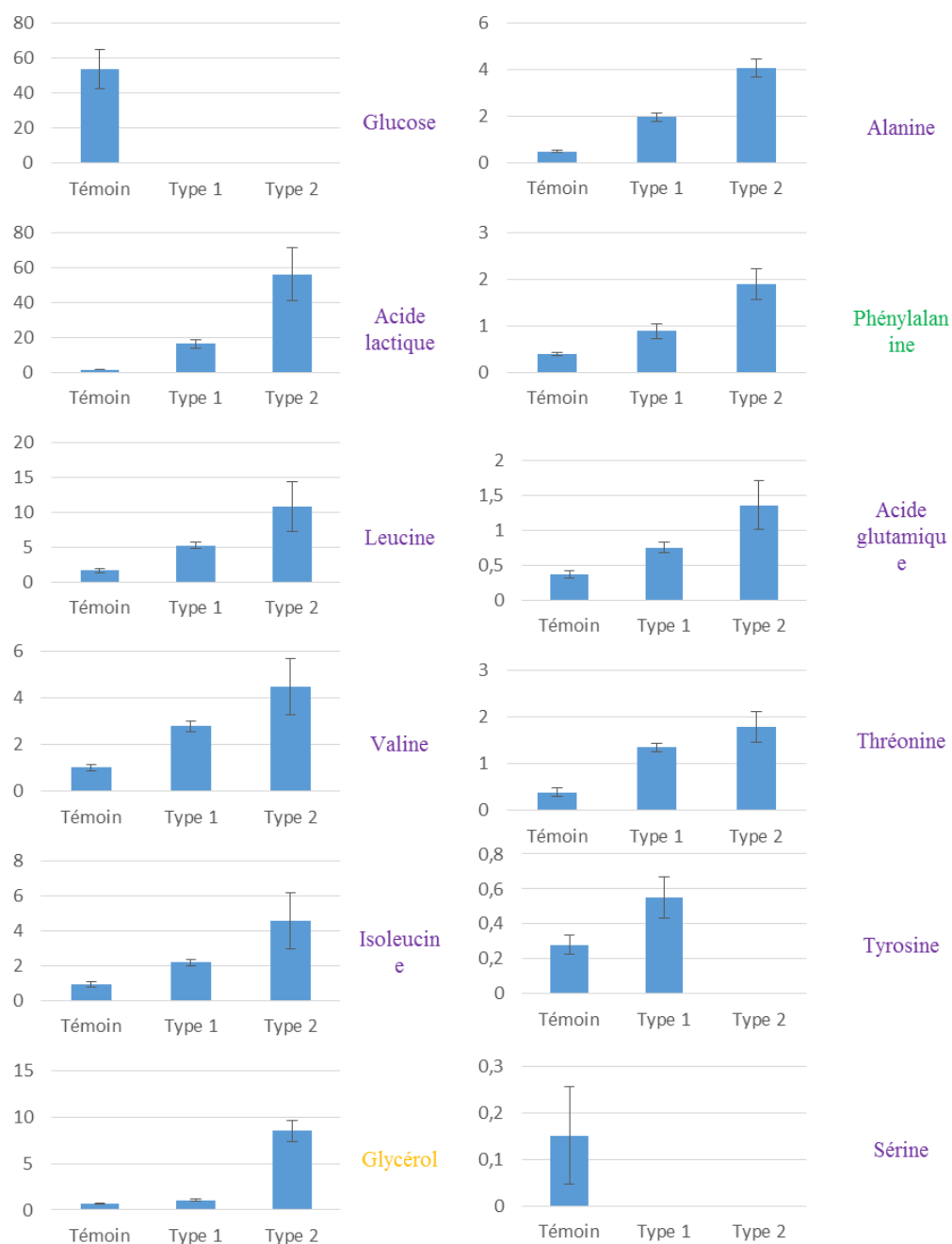
Tableau 81. Concentration moyenne de chaque marqueur en fonction du type d'échantillon pour l'étude des échantillons industriels par GC-MS.

Composés (concentration en g.l ⁻¹)	Témoin		Type 1		Type 2	
Polaire éthanol						
Glucose 4	Hors gamme		0,02 +/- 0,01		0,00	
Acide lactique	0,11	+/- 0,01	Hors gamme		Hors gamme	
Leucine	0,35		Hors gamme		Hors gamme	
Valine	0,24	+/- 0,01	Hors gamme		Hors gamme	
Isoleucine	0,23	+/- 0,02	Hors gamme		Hors gamme	
Alanine	0,17	+/- 0,01	0,35	+/- 0,03	Hors gamme	
Acide glutamique	0,24	+/- 0,01	0,43	+/- 0,06	Hors gamme	
Thréonine	0,16	+/- 0,02	0,28	+/- 0,01	0,31	+/- 0,04
Tyrosine	0,19	+/- 0,01	0,25	+/- 0,02	0,00	0,00
Sérine	0,09	+/- 0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
Apolaire acétone						
Glucose 4	Hors gamme		0,00	0,00	0,00	0,00
Acide lactique	0,05	+/- 0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
Isoleucine	0,17	+/- 0,09	0,00	0,00	0,00	0,00

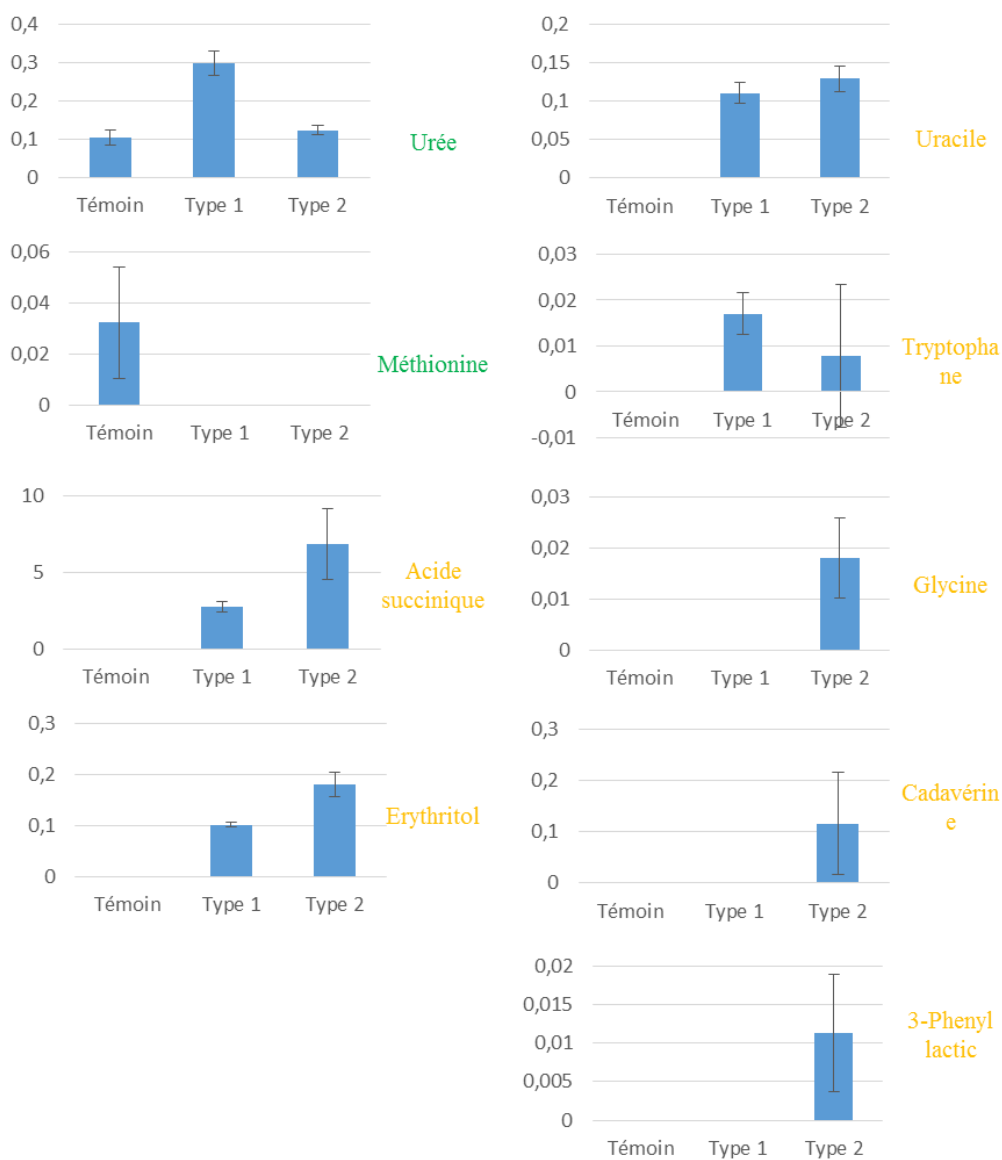
Certains composés présentant des concentrations trop élevées n'ont pu être quantifiés. Ces composés sont présentés comme « Hors gamme ». Pour les autres, on confirme les modulations observées avec les résultats des prises d'empreinte. Ces informations seront analysées plus finement lors de la discussion sur les marqueurs identifiés en fin de manuscrit.

Annexe L. Histogramme représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux identifiés et non identifiés pour l'étude des échantillons industriels contrastés par GC-MS

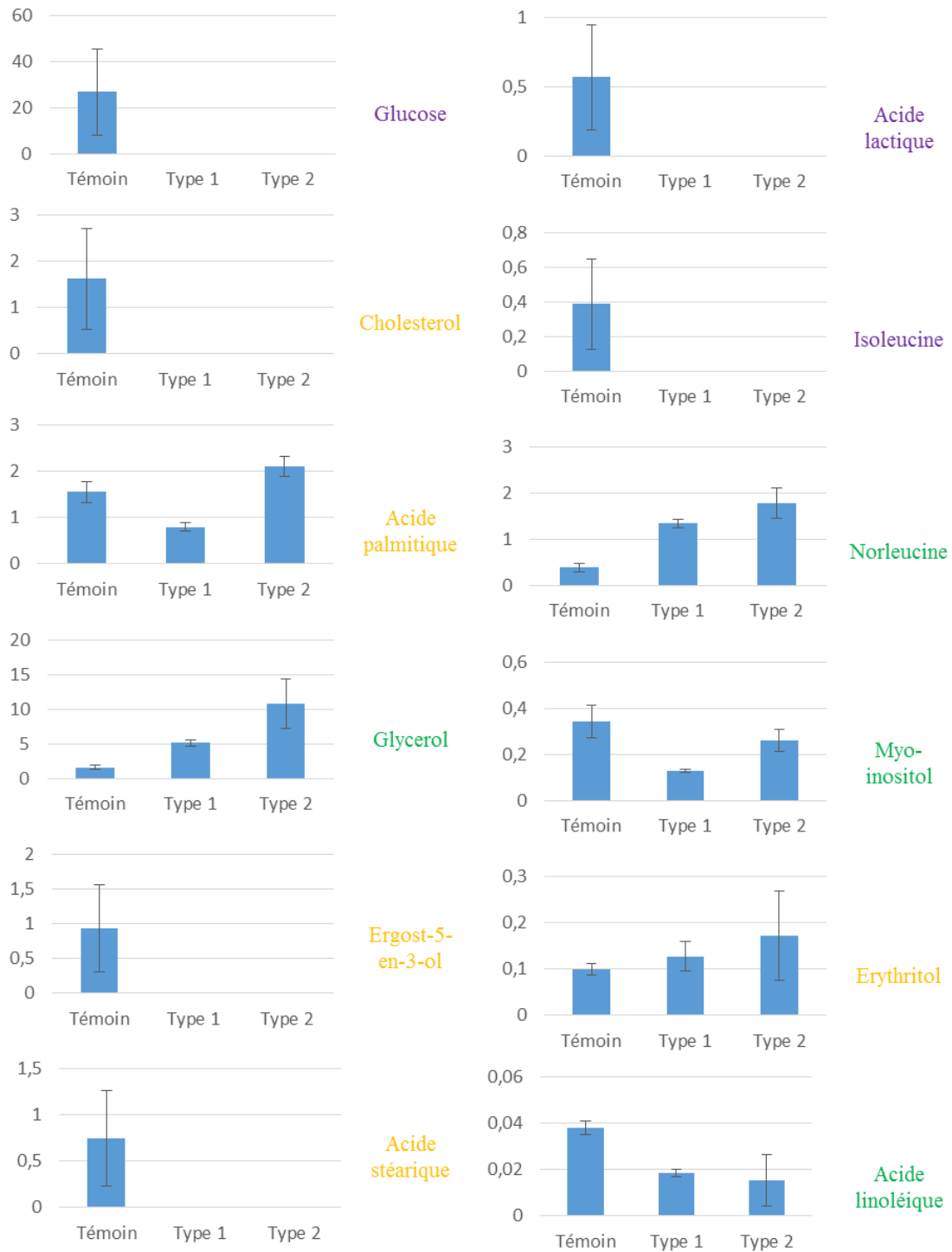
Polaire éthanol



Polaire éthanol



Apolaire acétone



Apolaire acétone

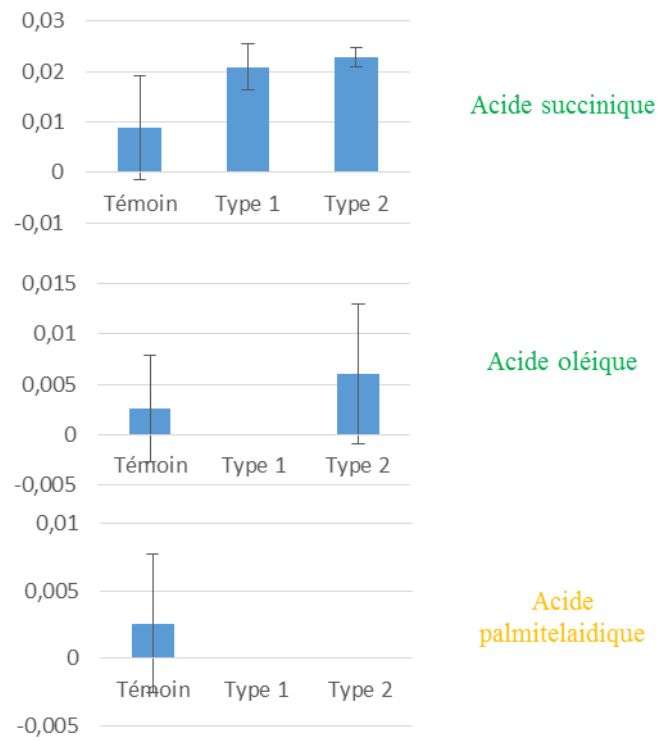
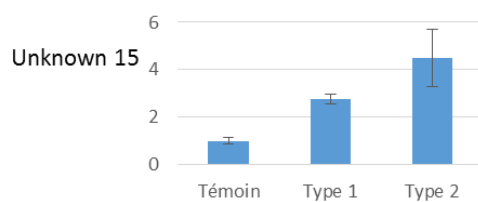
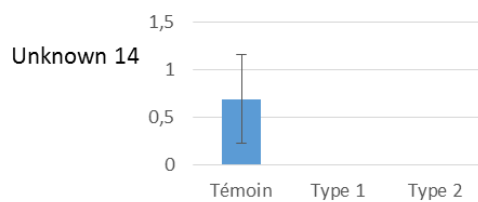
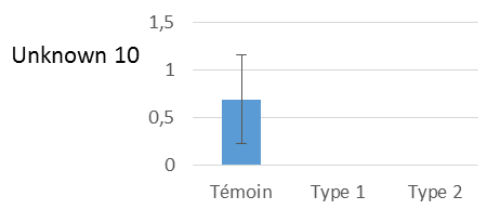
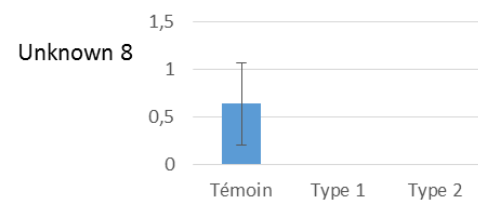
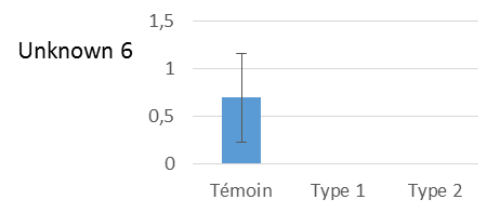
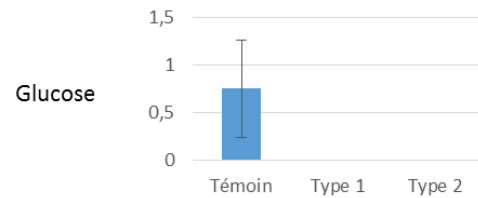
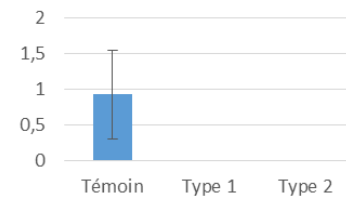
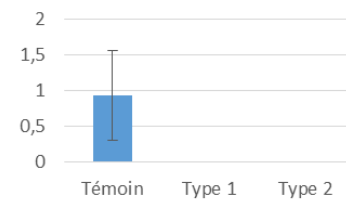
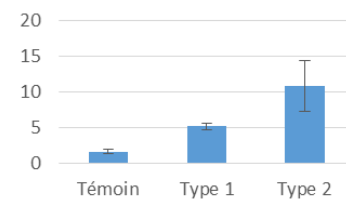
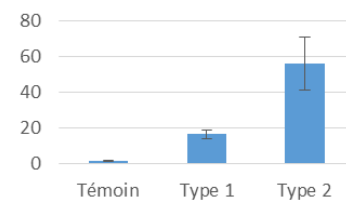
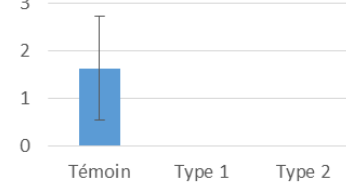
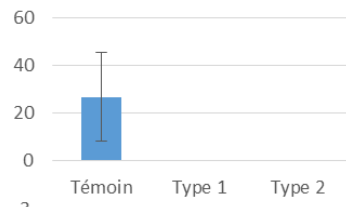


Figure 109. Histogrammes représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux identifiés et retenus pour les fractions polaire éthanol et apolaire acétone.

Polaire éthanol



Unknown 16

Unknown 18

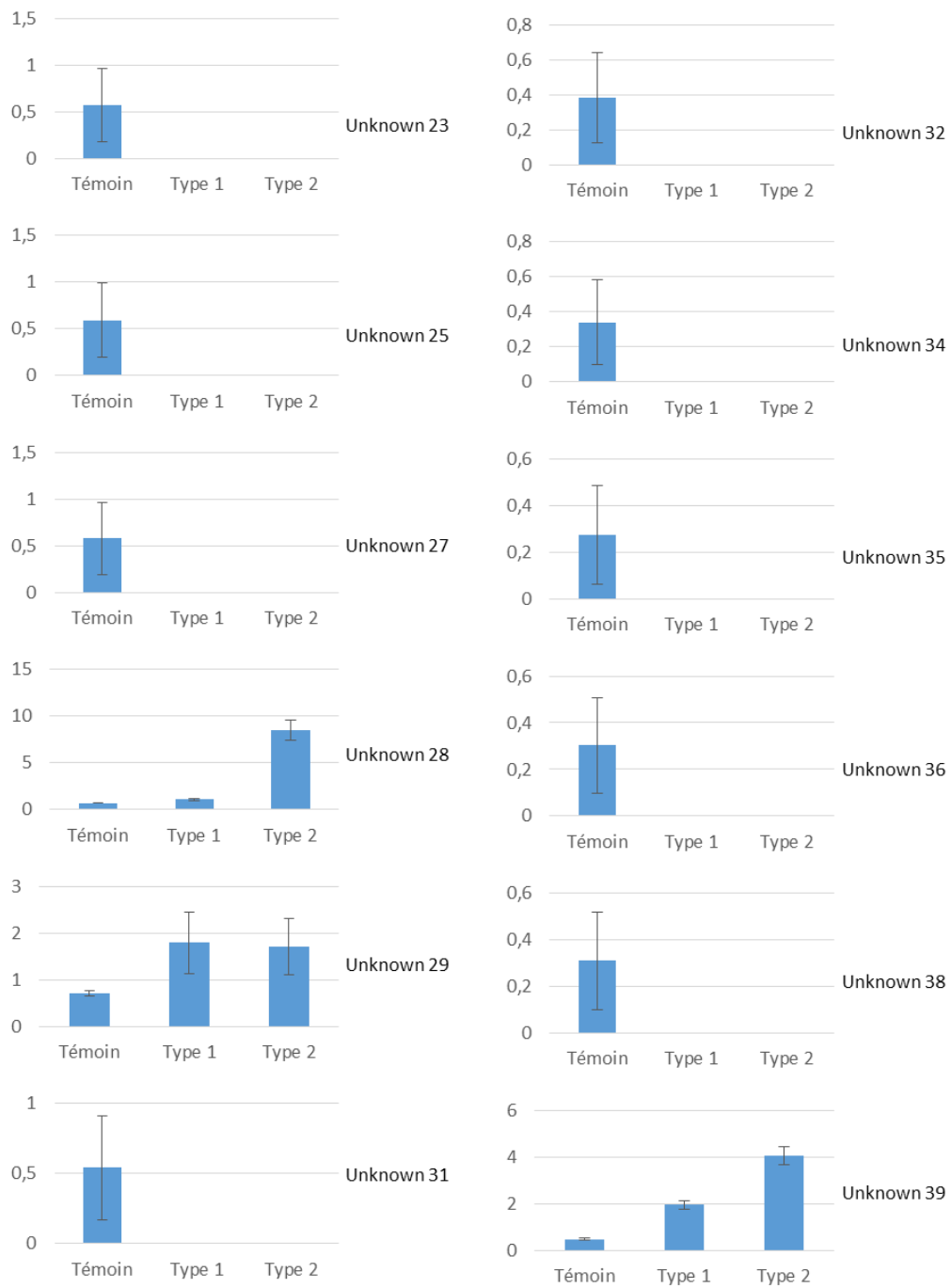
Unknown 19

Unknown 20

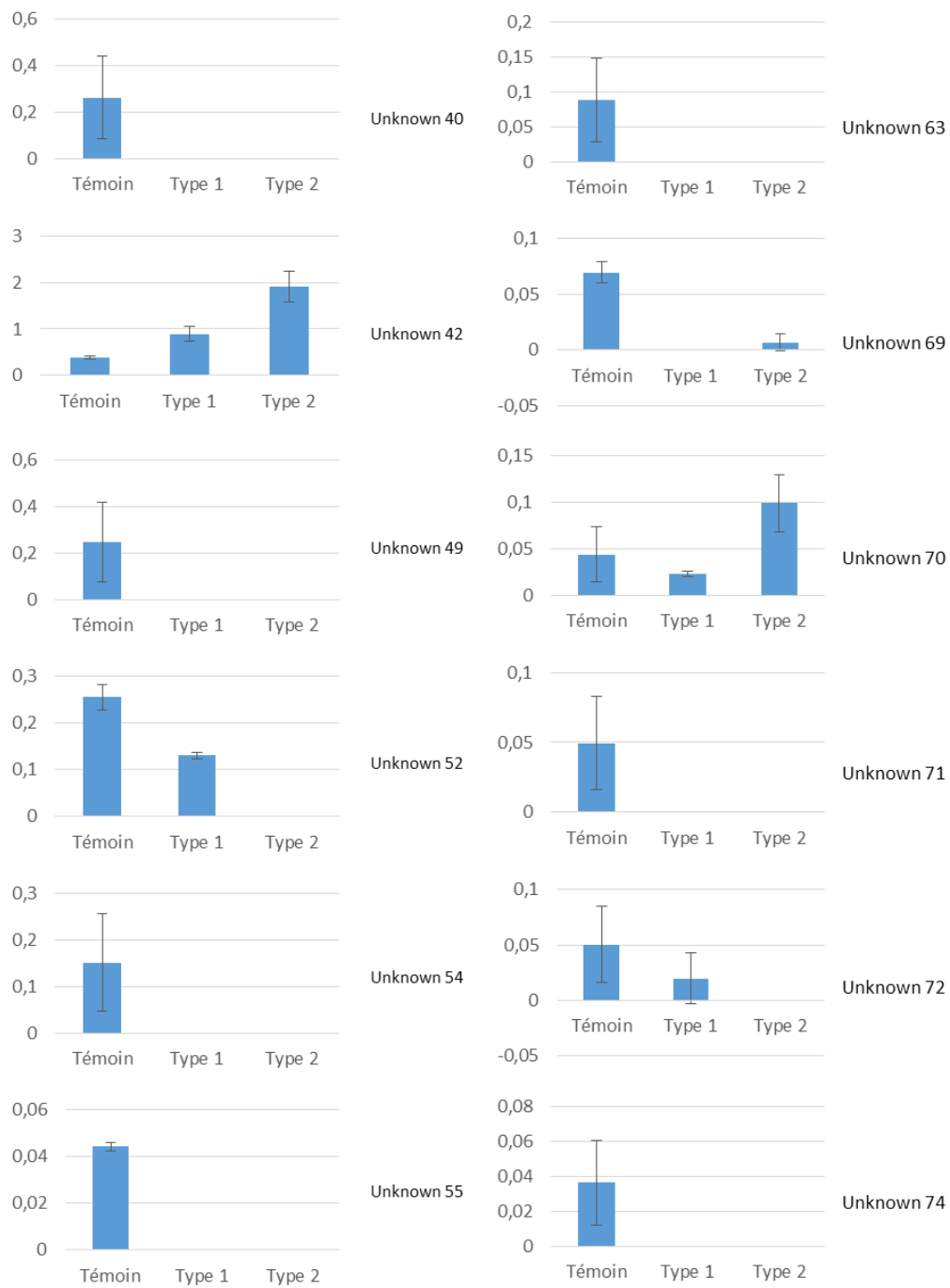
Unknown 21

Unknown 22

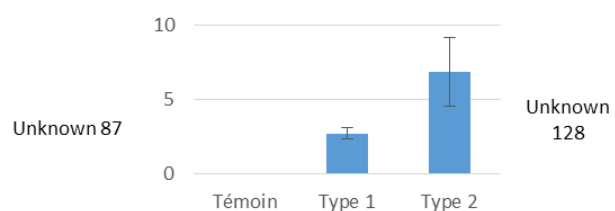
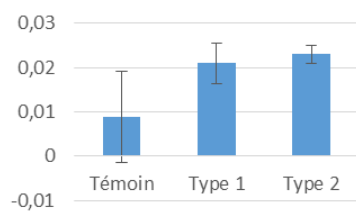
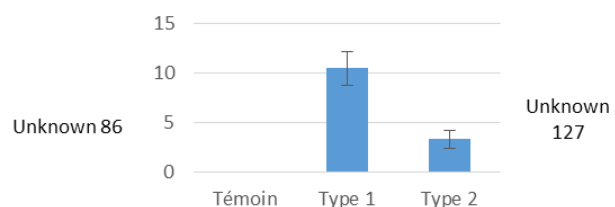
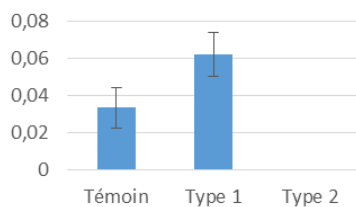
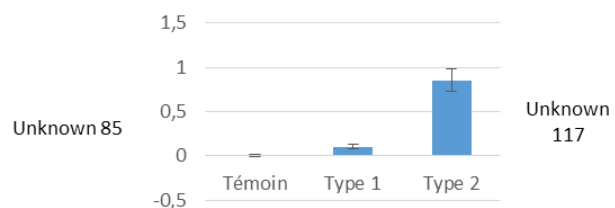
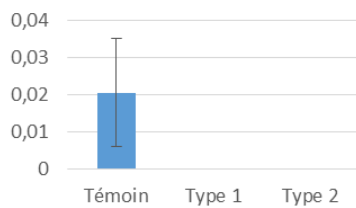
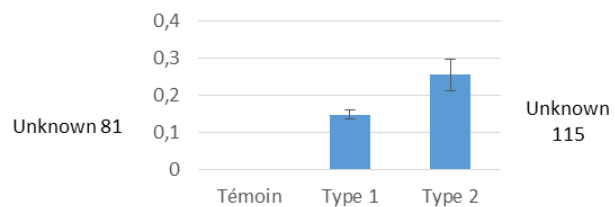
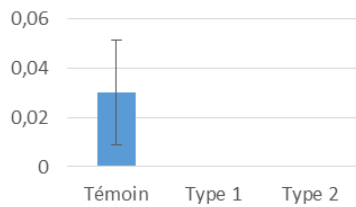
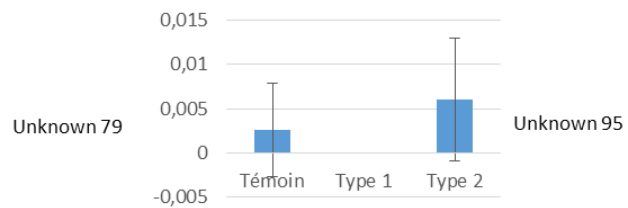
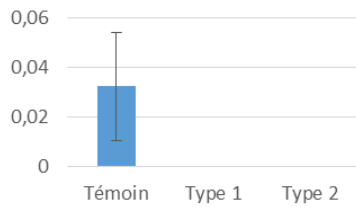
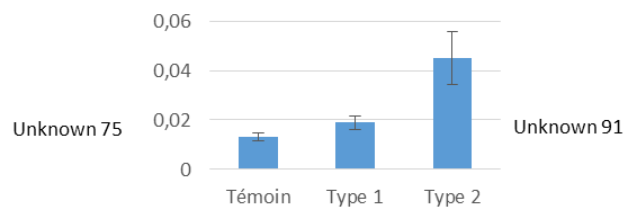
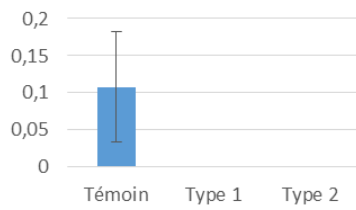
Polaire éthanol



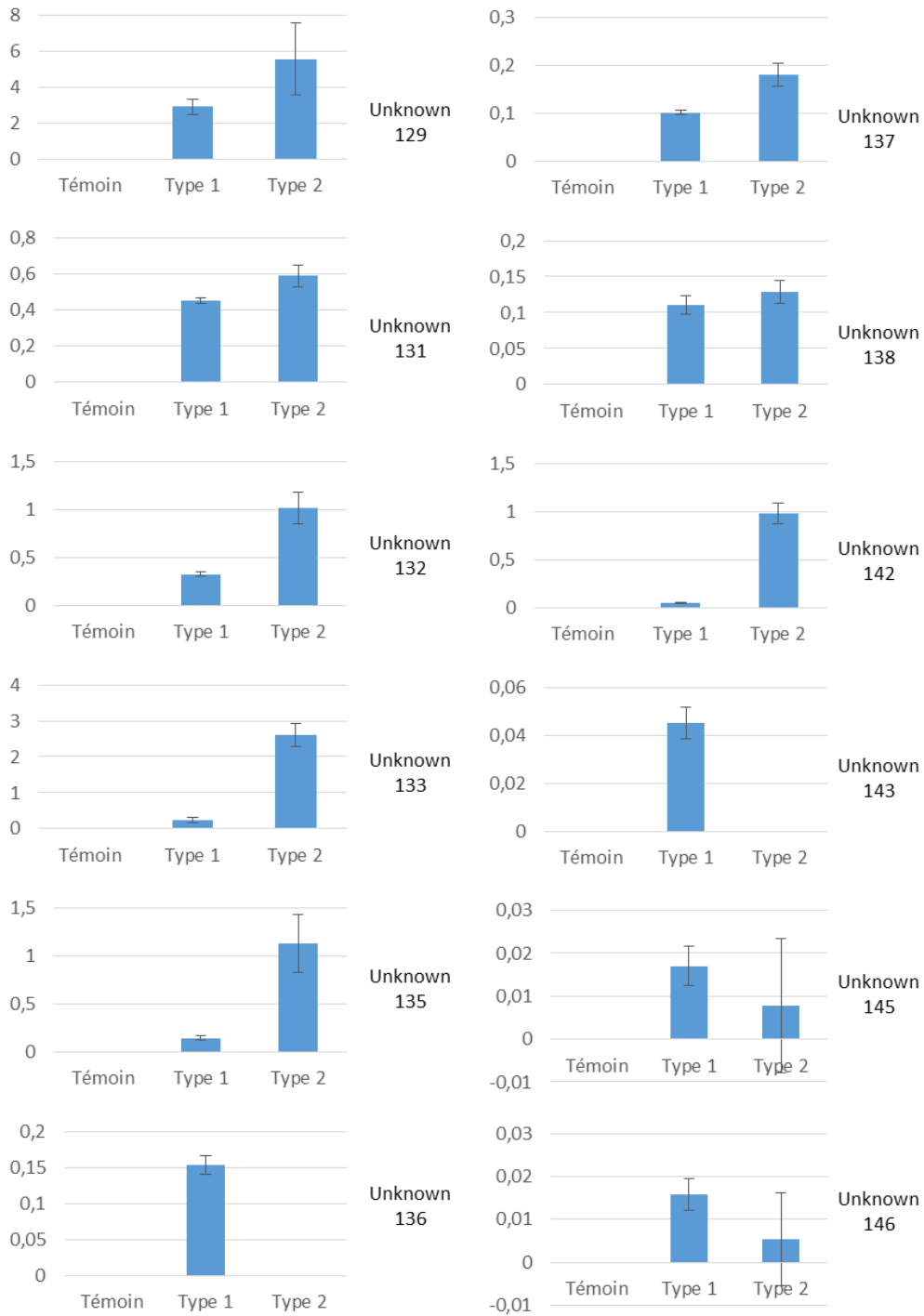
Polaire éthanol



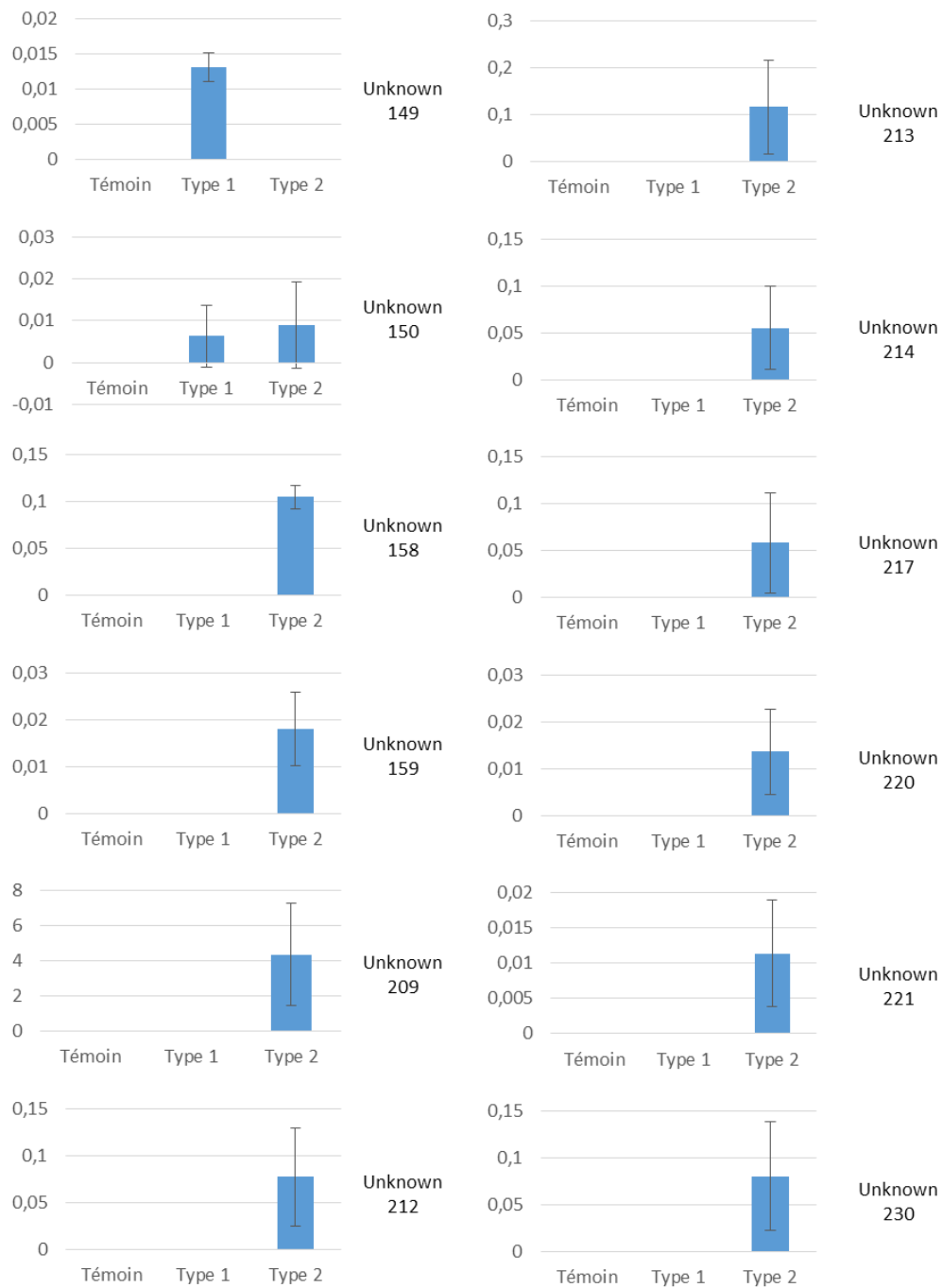
Polaire éthanol



Polaire éthanol



Polaire éthanol



Apolaire acétone



Apolaire acétone

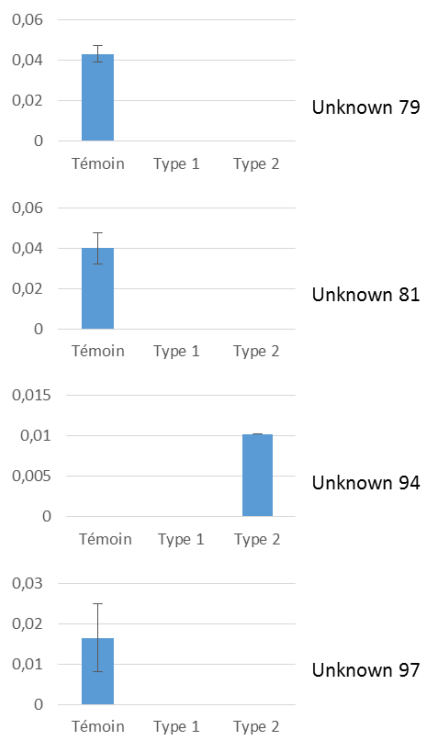
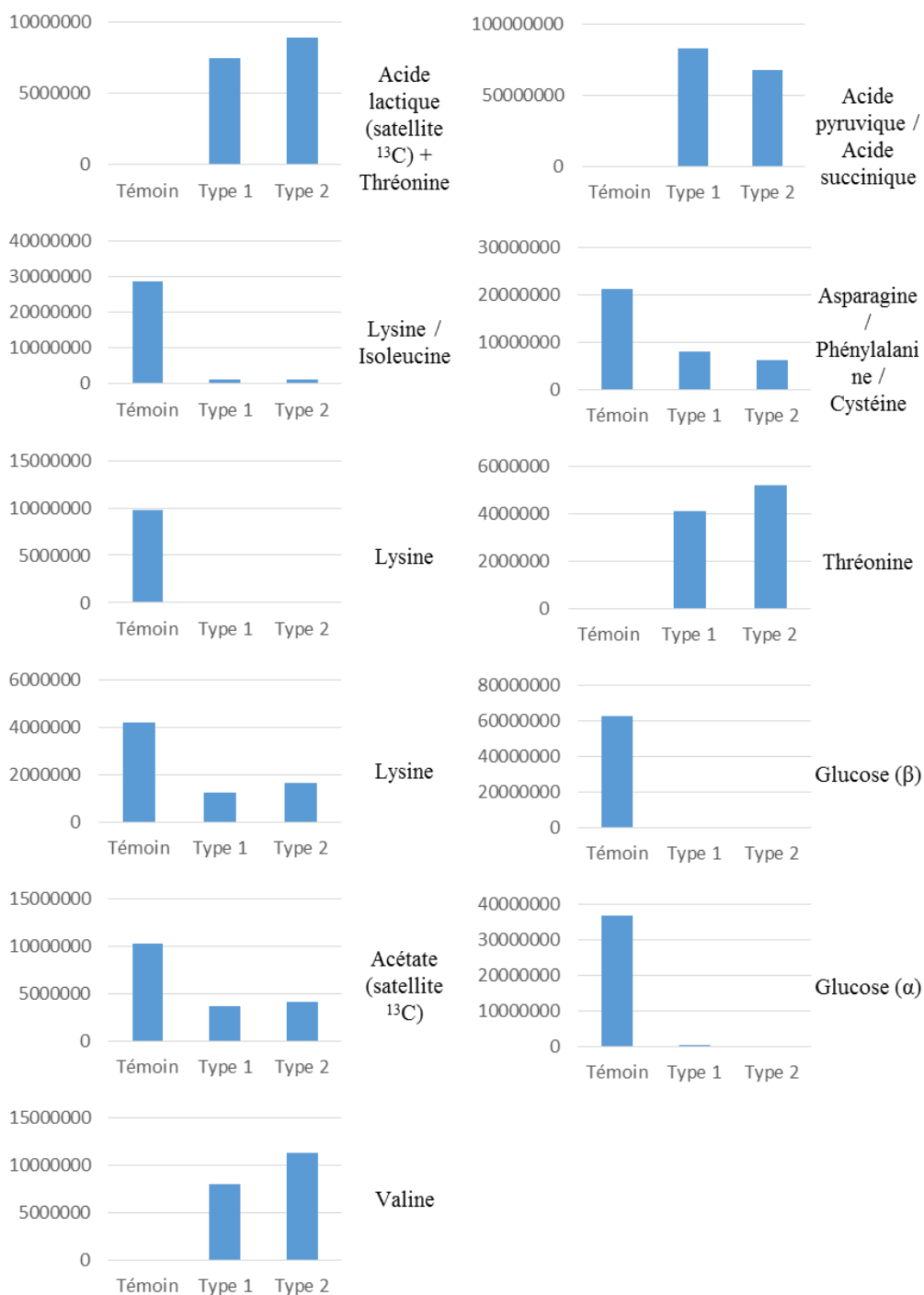
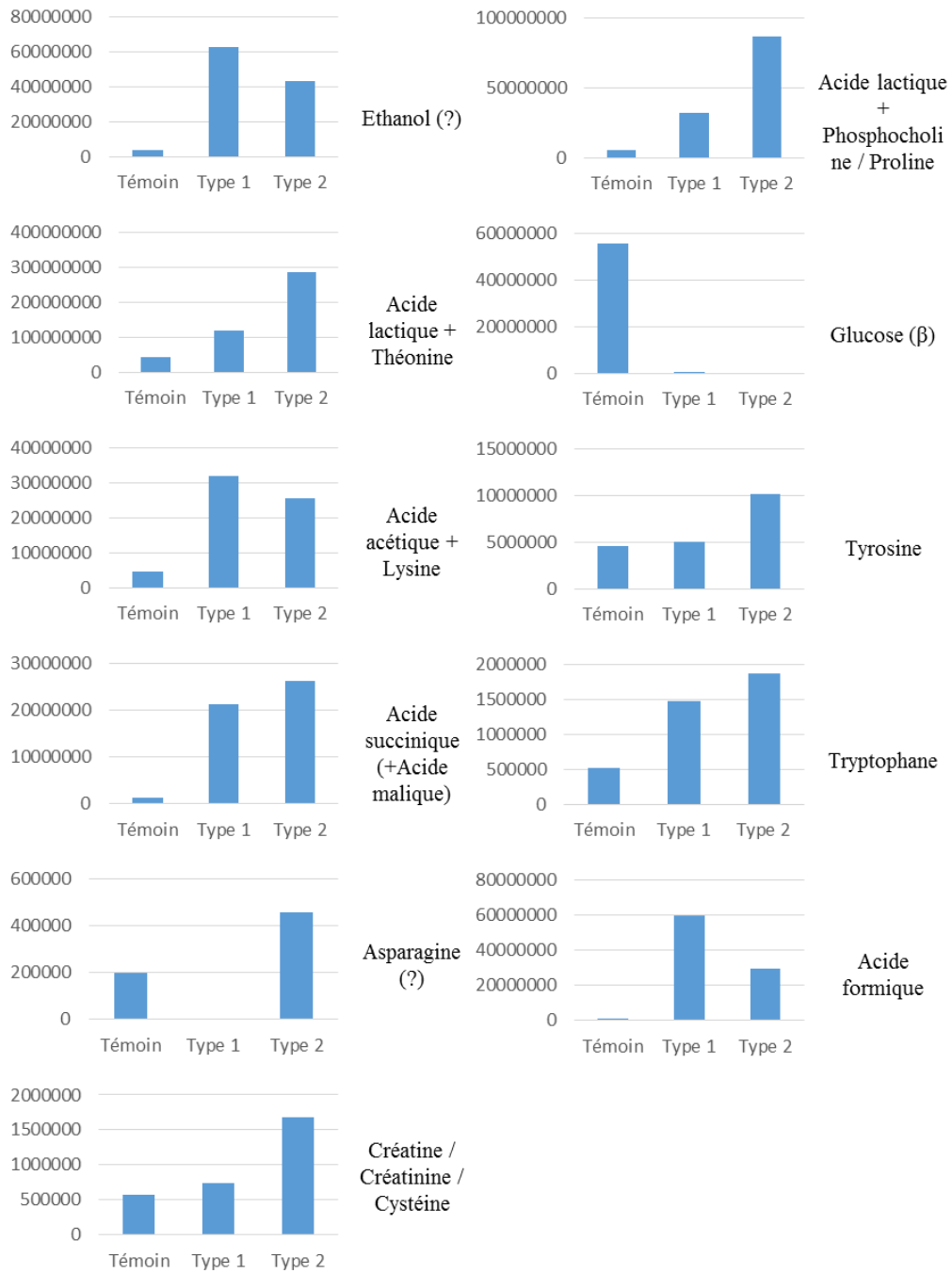


Figure 110. Histogrammes représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux non identifiés / non retenus pour les fractions polaire éthanol et apolaire acétone.

Polaire éthanol



Polaire acétone



Apolaire acétone

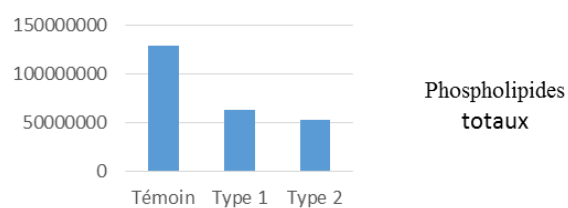
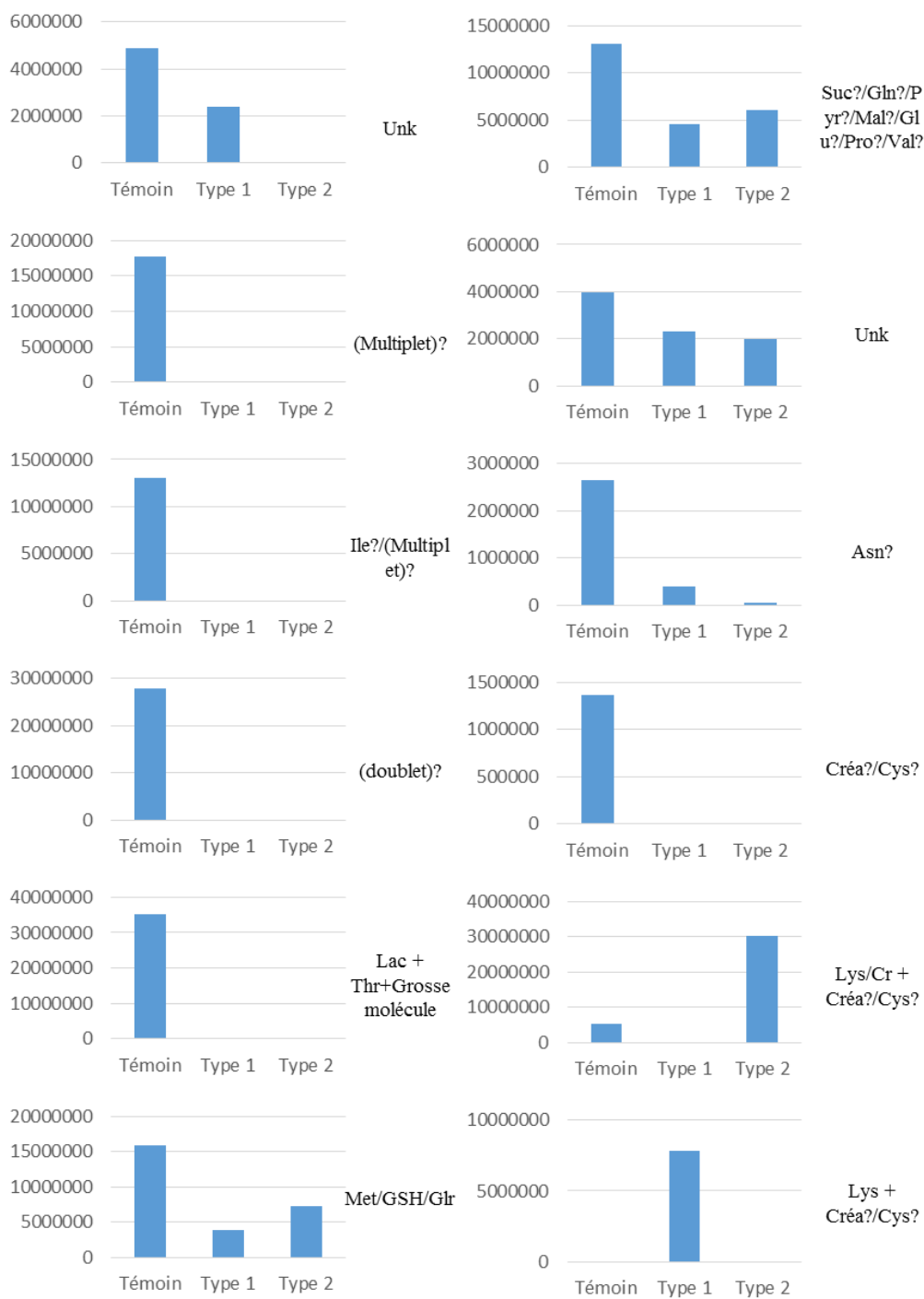
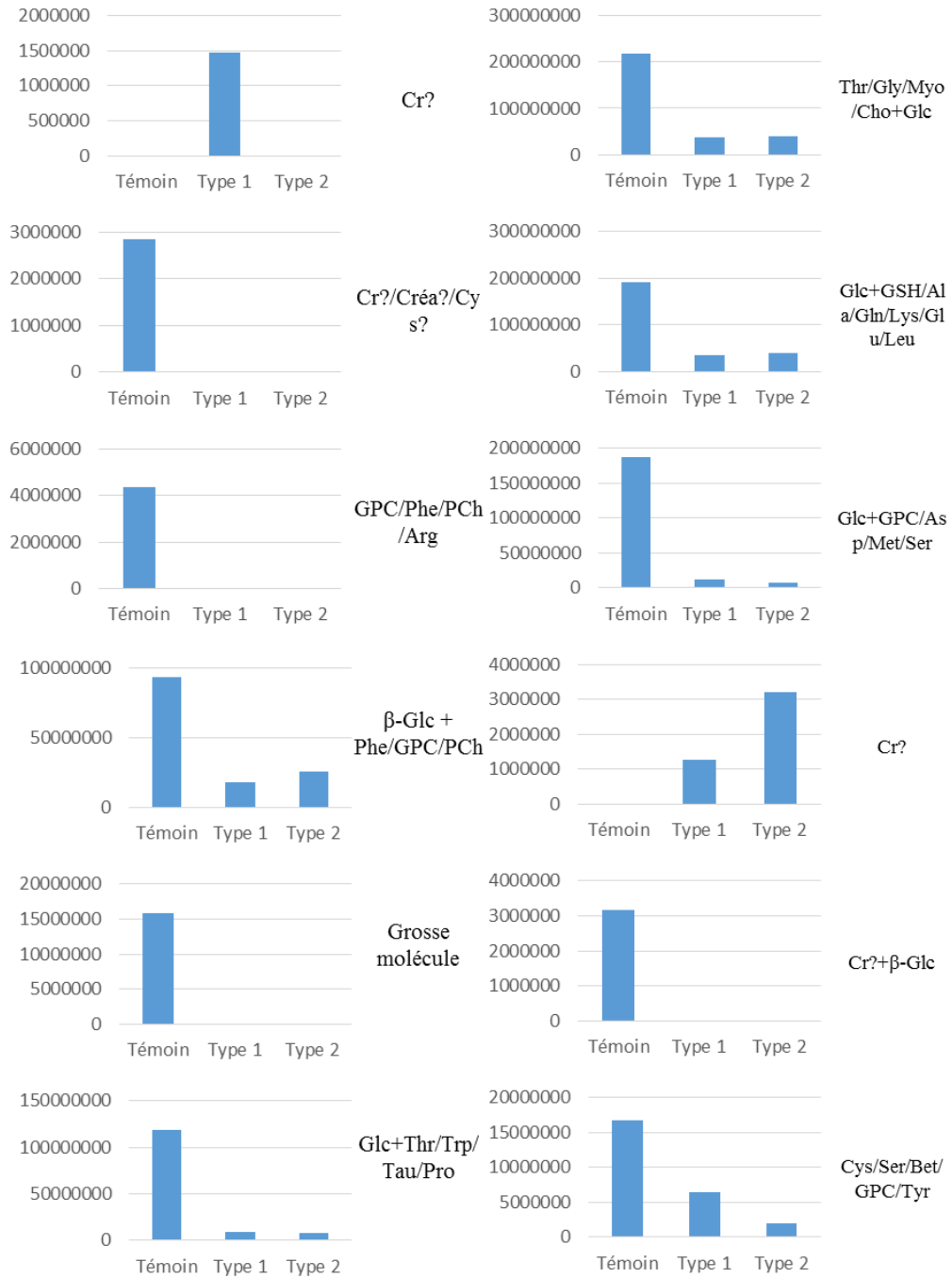


Figure 111. Histogrammes représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux identifiés pour les fractions polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone.

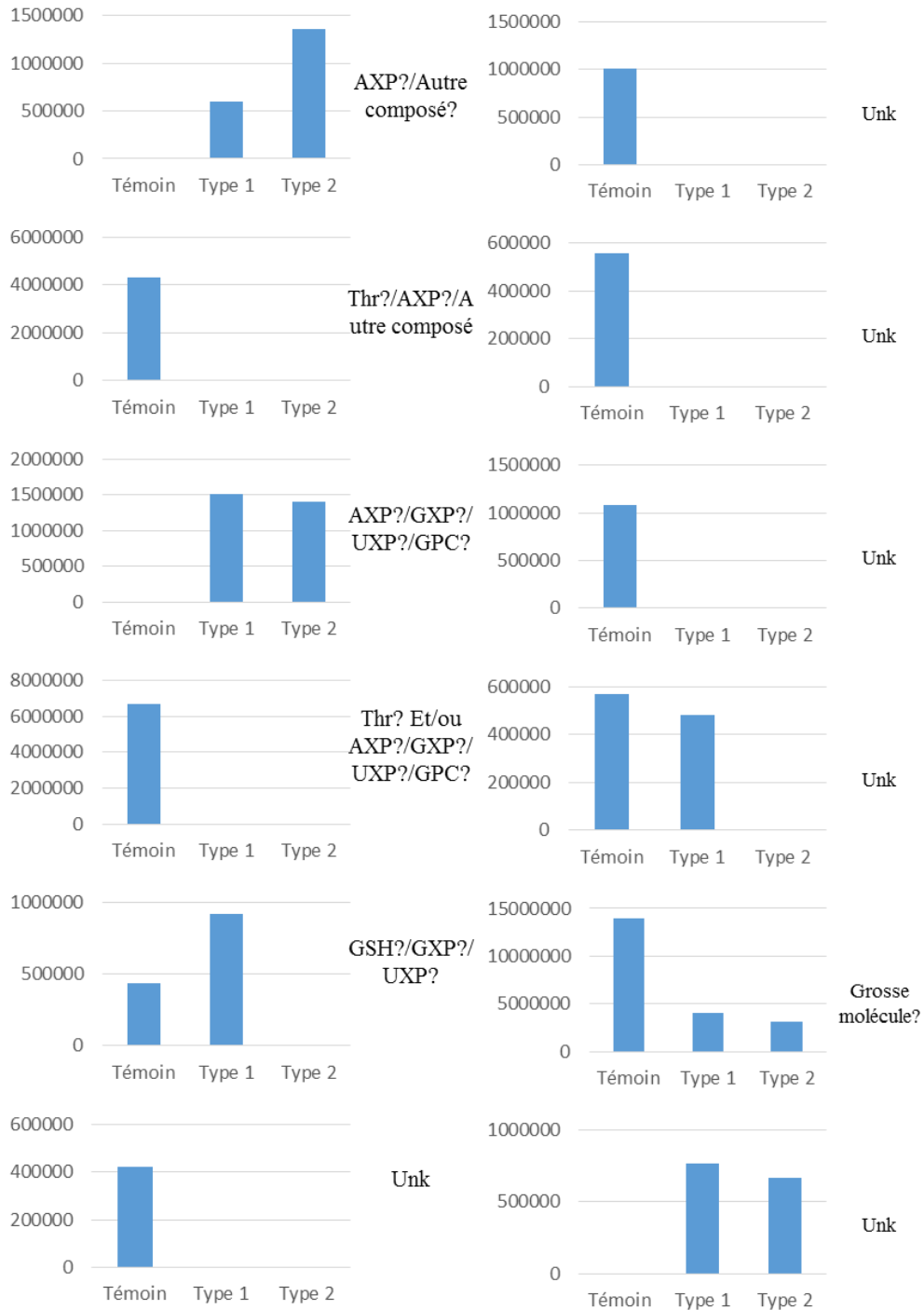
Polaire éthanol



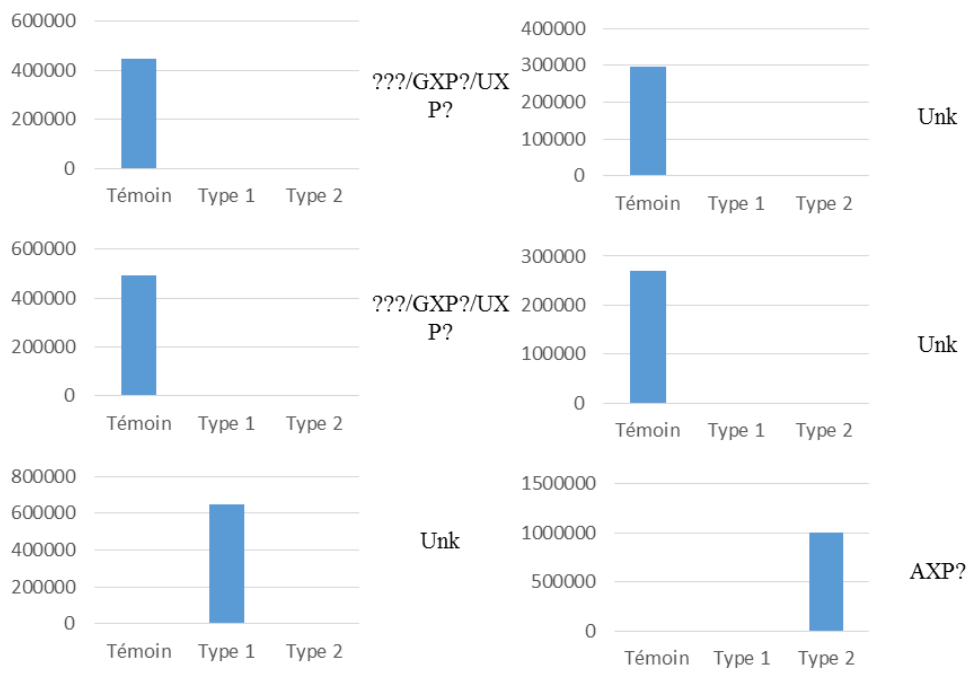
Polaire éthanol



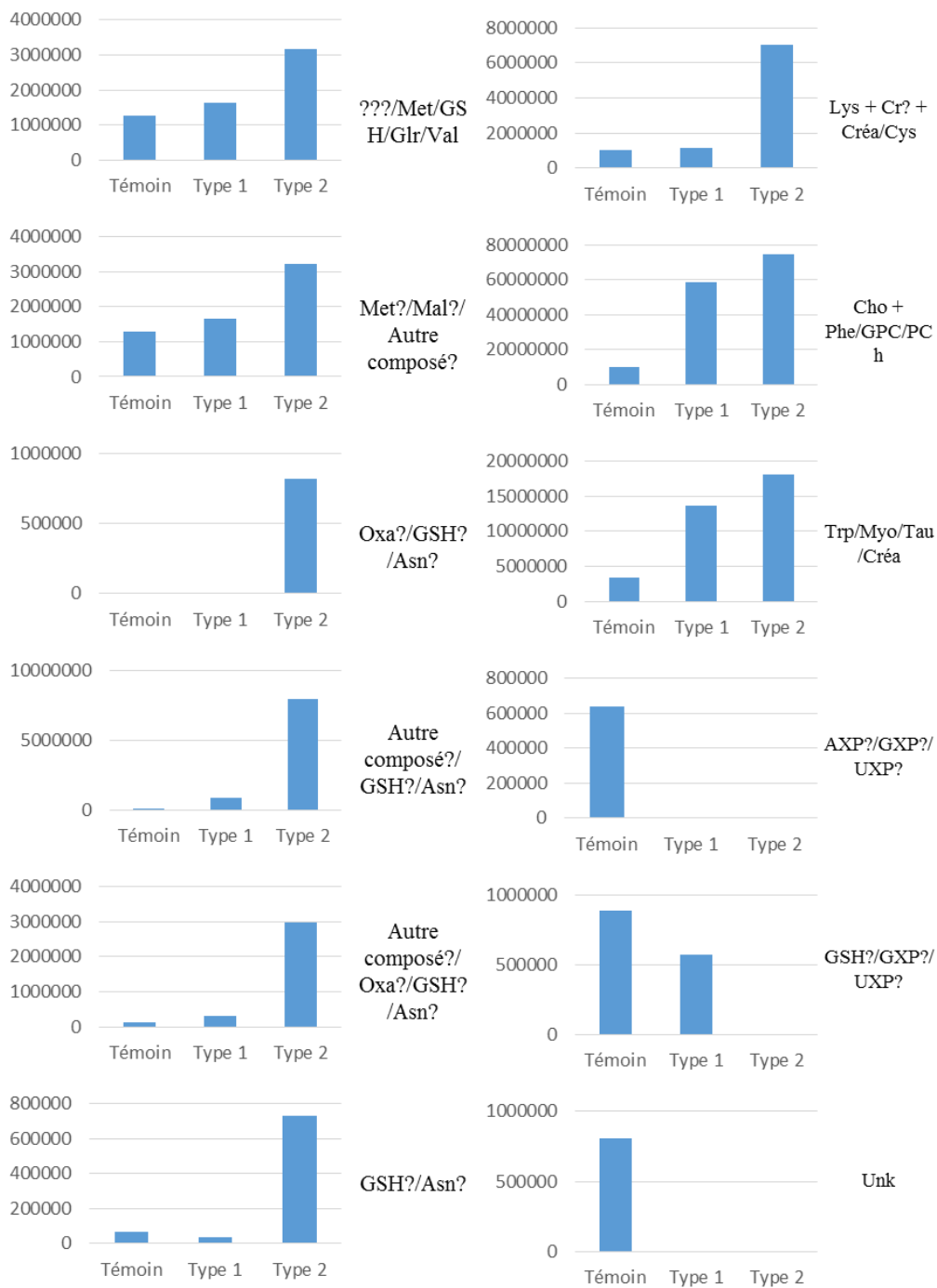
Polaire éthanol



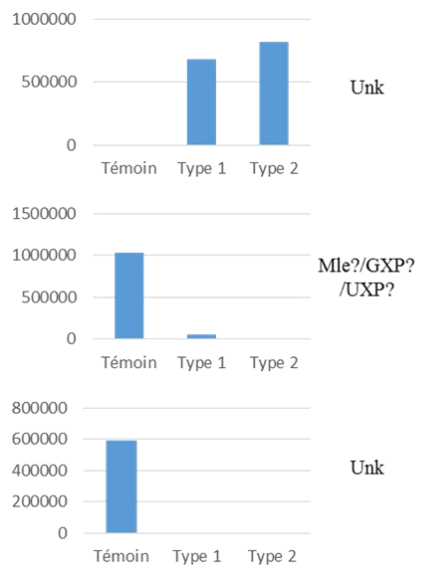
Polaire éthanol



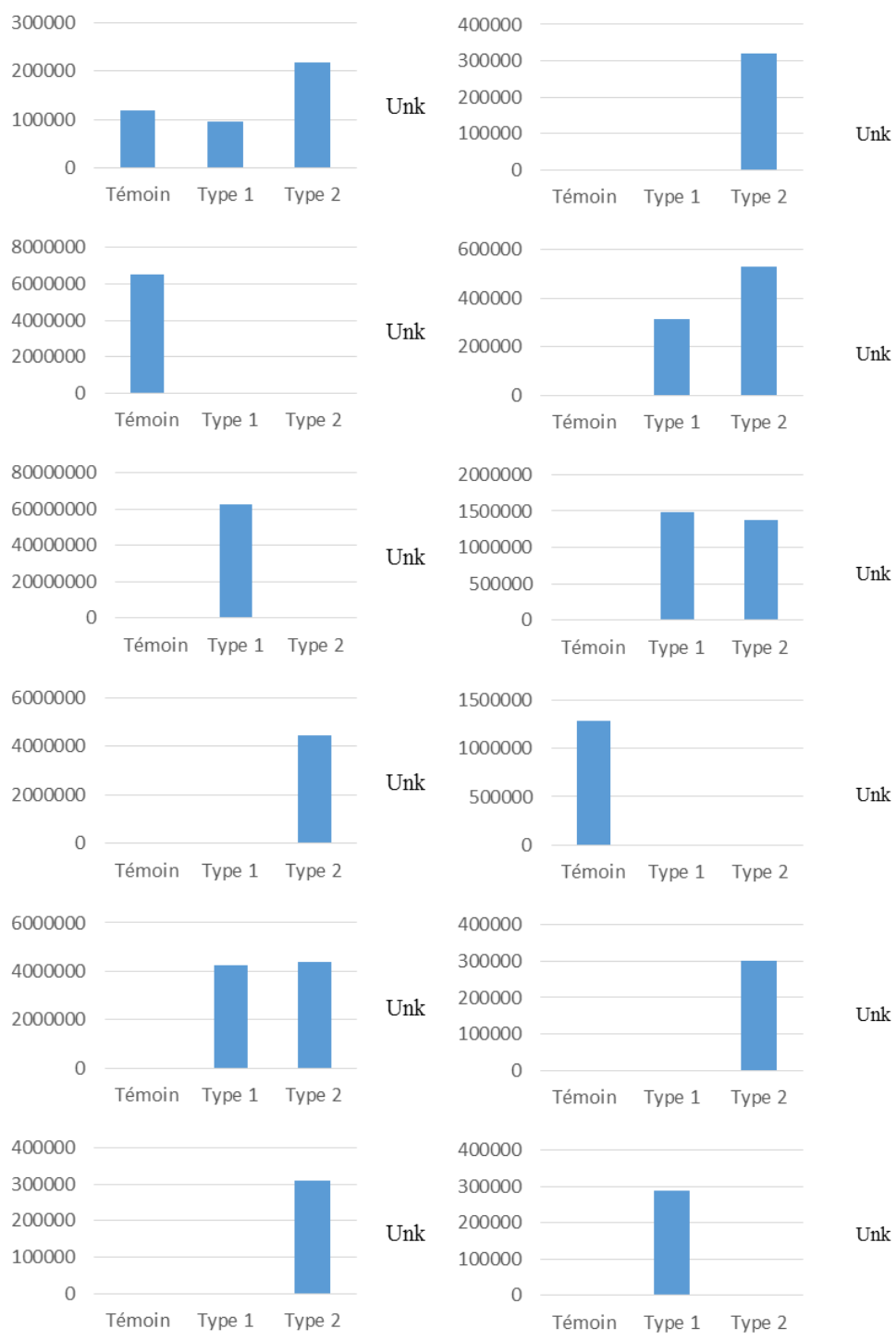
Polaire acétone



Polaire acétone



Apolaire éthanol



Apolaire acétone

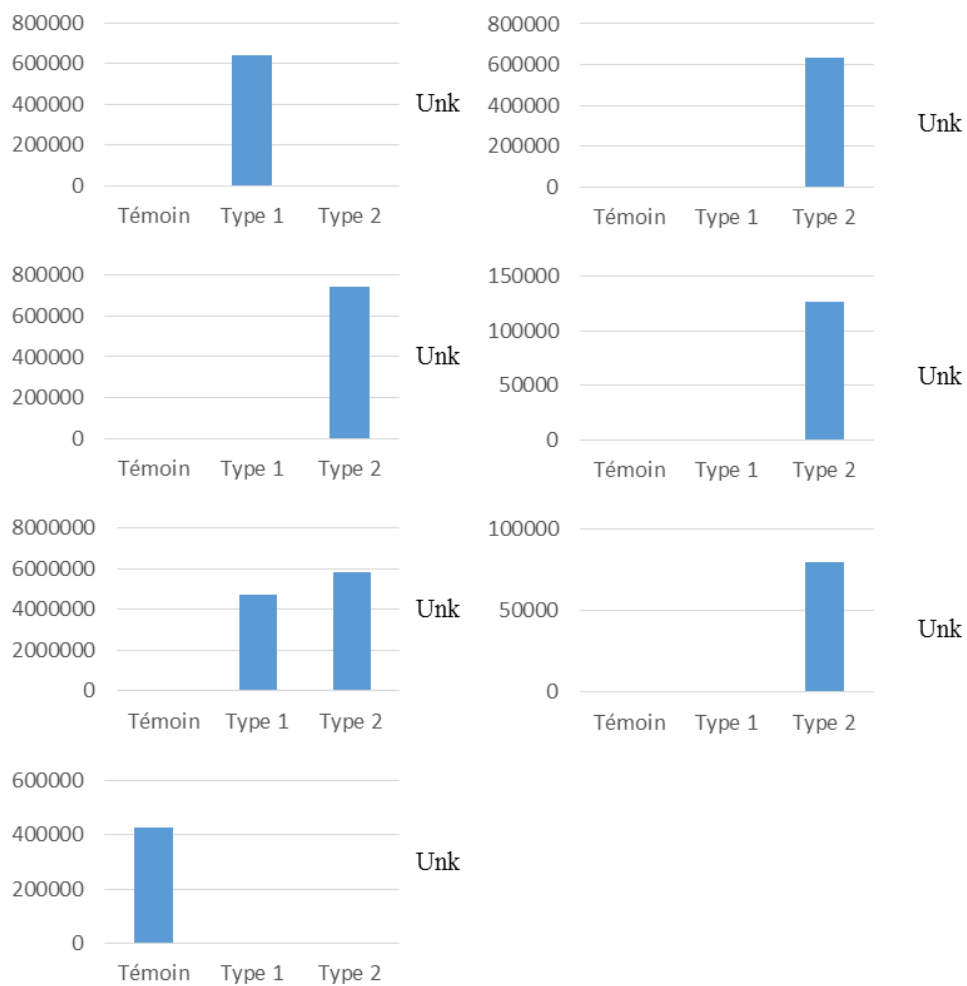


Figure 112. Histogrammes représentant l'évolution de l'intensité relative des signaux non identifiés/ non retenus ou trop complexes pour être identifiés pour les fractions polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone.

Annexe N. *Planning de lancement et journée type d'analyse pour l'étude de l'altération avec la souche B.weihenstephanensis*

- *Planning de lancement*

Le lancement d'une étude cinétique de l'altération suit le planning présenté dans la Figure 113.

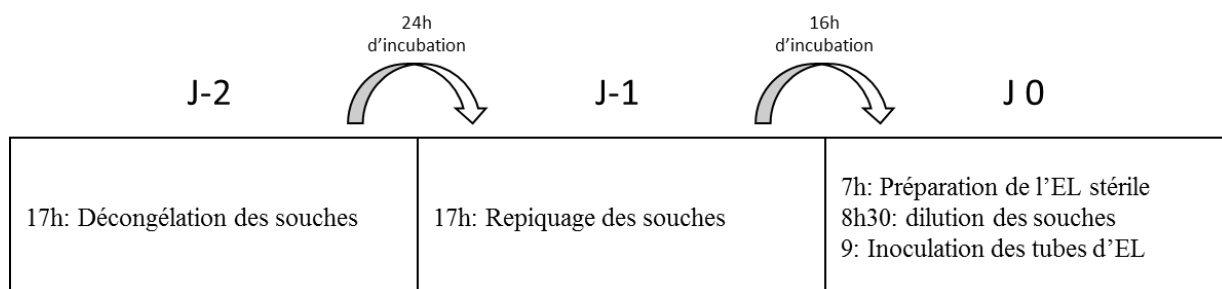


Figure 113. Planning de lancement d'une étude cinétique de l'altération des EL

- *Planning de prélèvement*

Les prélèvements sont effectués de manière quotidienne à 9h. Un échantillon ensemencé (échantillon) et un échantillon non ensemencé (témoin) sont prélevés. Les échantillons sont ensuite homogénéisés au vortex pour la suite de l'analyse. Un schéma récapitulatif d'une journée d'analyse type est présenté dans la Figure 114.

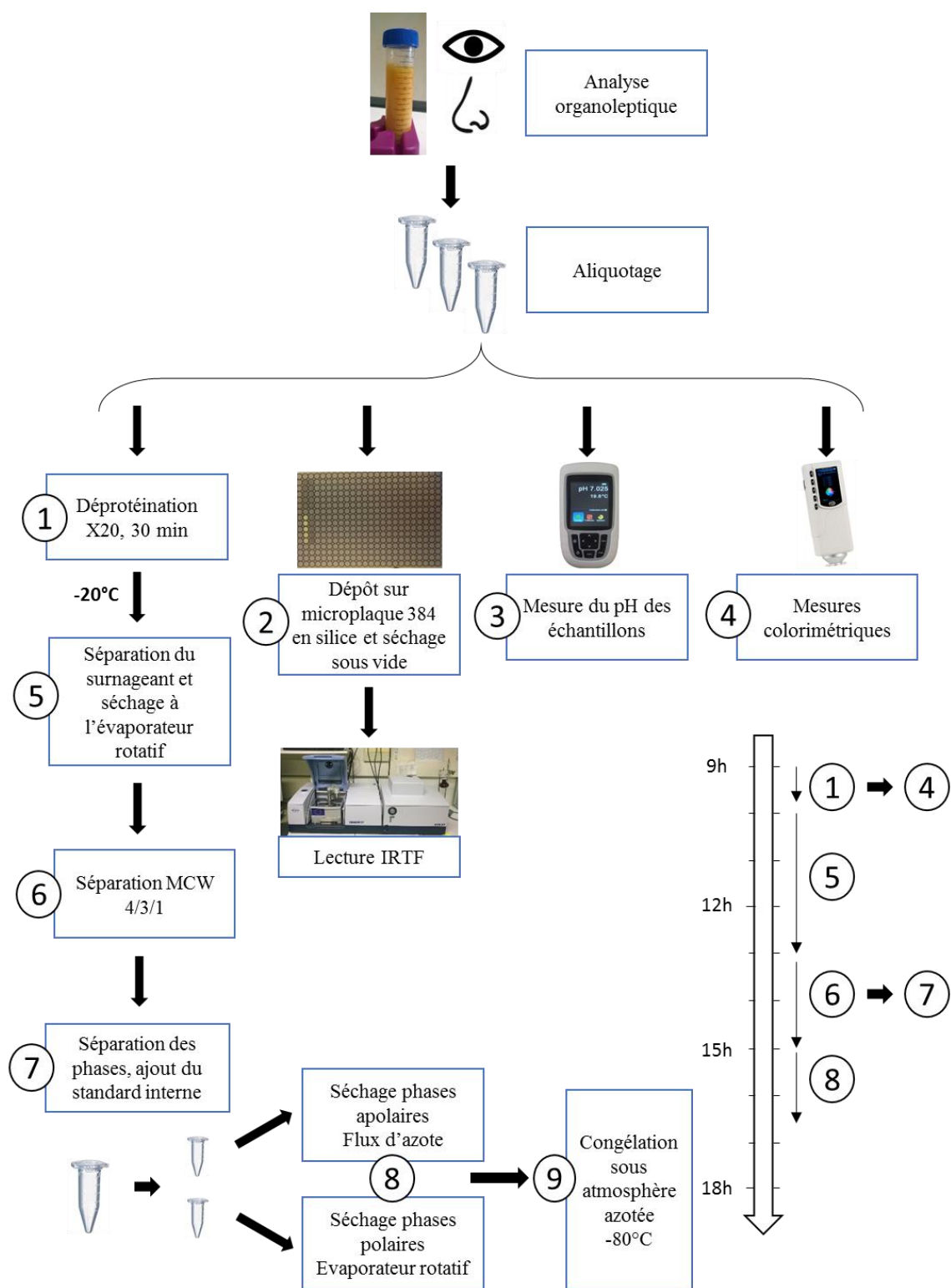


Figure 114. Schéma d'une journée type d'analyse pour l'étude de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*

Annexe O. Résultats de l'analyse par colorimétrie pour l'étude de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis*

Les données présentent, comme pour les mesures de pH, des variations d'ordonnée à l'origine potentiellement dues à une différence de la matière première ou à une différence de calibration des instruments et des procédures de mesure. Les données ont donc été normalisées par rapport à celles du témoin à $t = 48\text{h}$ (premier point en commun entre les partenaires). La correction appliquée a été reproduite pour l'ensemble des temps d'analyse. Les valeurs de correction appliquées à chacune des distributions sont présentées dans le Tableau 82.

Tableau 82. Valeur de correction appliquée aux mesures de colorimétrie pour chaque distribution pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*

		Moy T-STLO	Moyenne STLO	Moyenne ADRIA	Moy T-GEPEA	Moyenne GEPEA
L	Valeur à $t = 48\text{h}$	57,33	57,87	64,83	67,91	66,41
	Différence à soustraire	-10,59	-10,04	-3,08	0,00	-1,50
a	Valeur à $t = 48\text{h}$	0,67	0,48	11,49	16,30	15,77
	Différence à soustraire	-15,63	-15,82	-4,81	0,00	-0,53
b	Valeur à $t = 48\text{h}$	31,81	31,62	29,07	41,35	40,02
	Différence à soustraire	-9,53	-9,72	-12,27	0,00	-1,33

La Figure 115 présente les résultats normalisés pour les mesures de colorimétrie par composantes obtenues à chaque temps d'analyse par les différents partenaires.

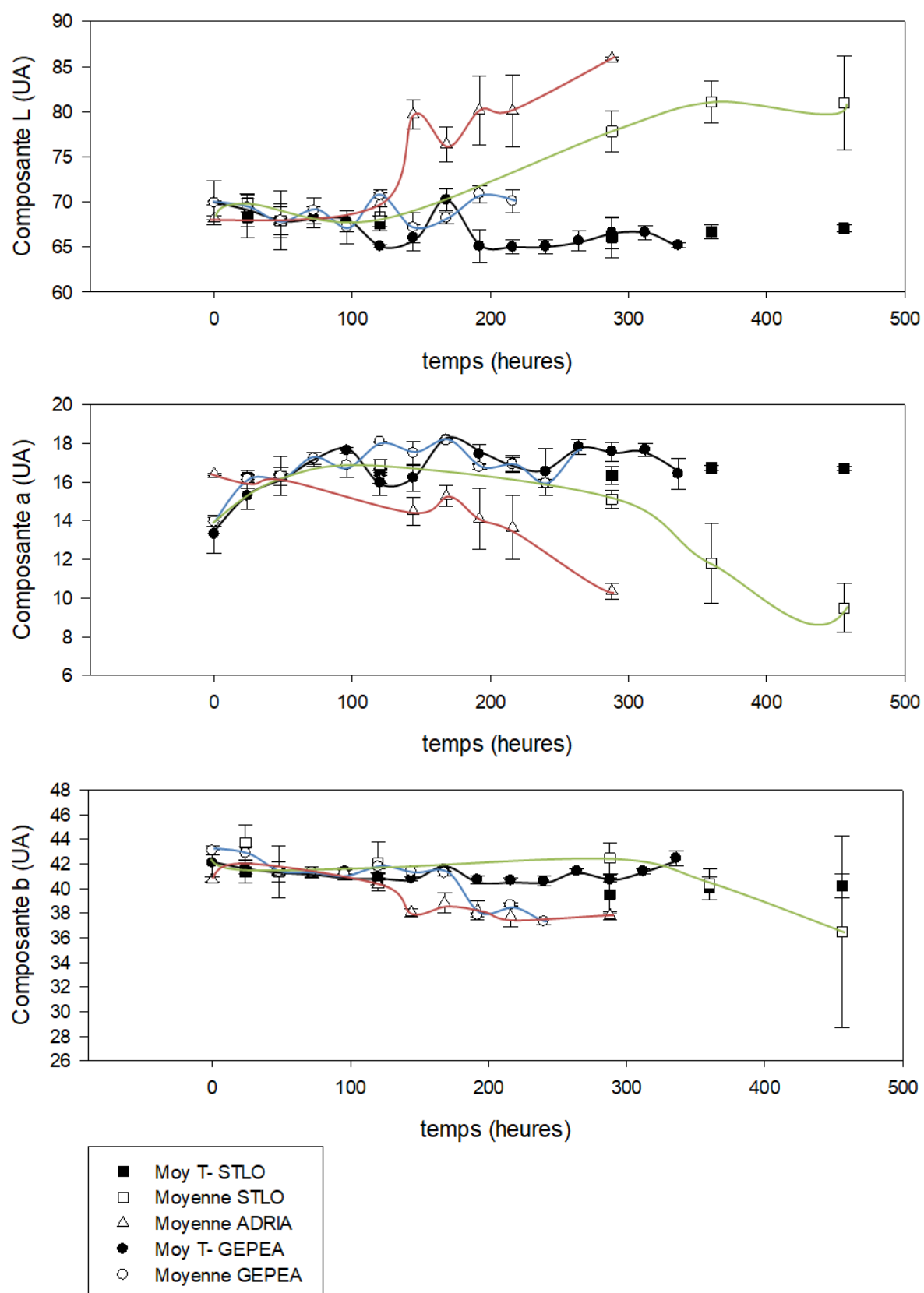


Figure 115. Résultats de colorimétrie (normalisés) par composante L, a et b à chaque temps d'analyse pour les différents partenaires pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*.

La composante L présente une tendance à l'augmentation pour l'ensemble des partenaires, une différence significative étant détectée à partir du temps 144h pour la société ADRIA et du temps 188h pour les laboratoires GEPEA et STLO. Une fois cette augmentation passée, les profils sont relativement stables jusqu'à la fin de la cinétique. Les témoins ne présentent pas de variation significative au cours de la cinétique d'altération. La composante a présente, pour les échantillons et les témoins, une augmentation sur les quatre premiers temps d'analyses (24h à 96h) pour les laboratoires GEPEA et STLO. Une différence significative est observable entre les échantillons et les témoins au temps 144h pour la société ADRIA, et au temps 288h pour le laboratoire STLO. Aucune variation significative n'est observable entre les résultats des échantillons ou des témoins pour le laboratoire GEPEA. La composante b présente une tendance à la diminution pour l'ensemble des partenaires. Les échantillons et les témoins présentent une différence significative à partir des temps d'analyses 168h pour la société ADRIA, 220h pour le laboratoire GEPEA et 460h pour le laboratoire STLO.

Pour les analyses effectuées au laboratoire GEPEA, les variations d'intensité des composantes L, a et b enregistrées entre les échantillons et les témoins sont toutes inférieures au seuil de significativité fixé au cours des développements méthodologiques (équivalent à deux fois la variabilité interne moyenne mesurée (voir chapitre 3 - 2.4). En effet aucune variation n'est enregistrée au-dessus des seuils de 12%, 10% et 20% fixés pour les composantes L, a et b.

Pour conclure, on observe, comme pour les mesures de pH, des différences de valeurs absolues mais des cinétiques d'évolution comparables. Les résultats obtenus au laboratoire GEPEA ne sont pas significatifs mais sont en adéquation avec les tendances observées chez les autres partenaires du projet pour les composantes L et b. Cette observation tend à confirmer la conclusion de la partie précédente (analyse du pH), à savoir que le phénomène d'altération est relativement bien reproduit entre les différentes équipes du projet. La colorimétrie semble ici être, au moins dans les conditions utilisées au laboratoire GEPEA, un outil moins robuste que la mesure du pH pour le suivi macroscopique de l'altération des EL.

- Comparaison des signatures d'échantillons contrastés

Les résultats ont été analysés après une étape de correction de ligne de base réalisée directement dans le logiciel OPUS 7 utilisé pour l'enregistrement des données. Les données des différents temps d'analyse présentant un faible contraste, une comparaison des signaux moyens enregistrés en début et en fin de cinétique a été effectuée pour confirmer le potentiel de discrimination des échantillons de cette technique.

- Visualisation des spectres

La Figure 116 présente le résultat de cette comparaison. La p-value d'un test de Wilcoxon est également présentée pour chacun des points d'analyse (nombres d'onde).

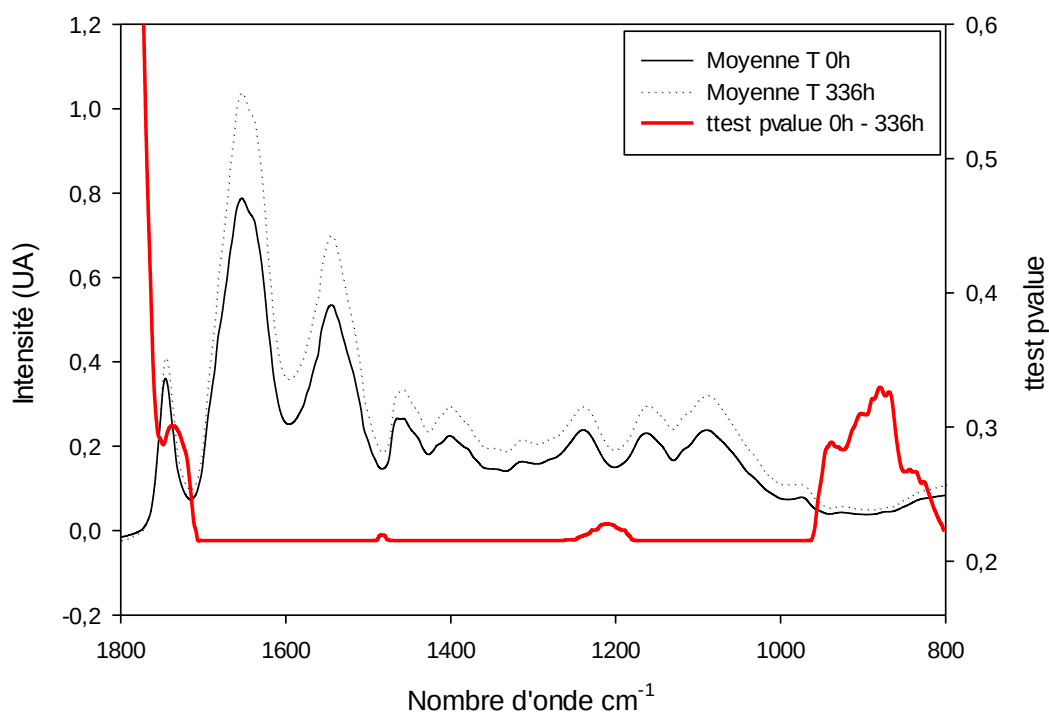


Figure 116. Spectres IRTF moyennés sur 10 répliques correspondant à des échantillons issus de l'étude cinétique de l'altération des EL avec la souche *B. weihenstephanensis*, la ligne continue correspond au premier jour d'analyse (0h d'incubation) et la ligne discontinue au dernier jour d'analyse (336h d'incubation) (axe de gauche). La ligne rouge correspond à la valeur de p-value d'un test de Wilcoxon (t-test pour distribution non normale) réalisé sur les valeurs de chaque vibrateur (axe de droite). Seule la zone d'intérêt (800-1800cm⁻¹) est représentée.

Les scores de p-value d'un test de Wilcoxon (équivalent à un t-test pour une distribution non normale) permettent de visualiser les zones spectrales où des différences significatives existent. Une

diminution de la p-value correspondra à une différence plus importante entre les deux spectres moyennés. Aucune de ces valeurs ne passant sous le seuil des 0,05, la différence entre les deux spectres est jugée non significative.

- Analyse des coefficients de corrélation

Un test de corrélation de Spearman a également été réalisé sur les données. Les résultats de ce test pour chaque point d'analyse (nombres d'ondes) sont présentés sous forme de boîtes à moustaches dans la Figure 117.

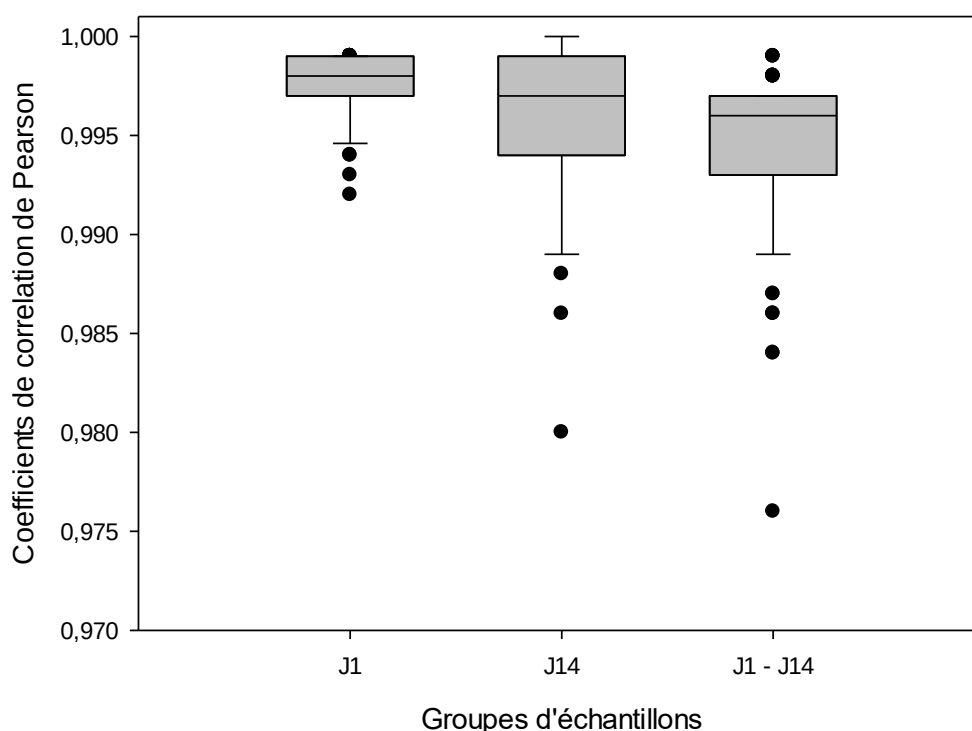


Figure 117. Distribution des scores de corrélation calculés sur les données spectrales correspondant à l'analyse par IRTEF d'échantillons issus de l'étude cinétique de l'altération des EL avec la souche *B. weihenstephanensis*, le premier groupe correspond au premier jour d'analyse (0h d'incubation), le deuxième groupe au dernier jour d'analyse (336h d'incubation), le dernier groupe (J1-J14) correspond à l'ensemble des échantillons contenus dans les deux premiers groupes.

Les scores de corrélation de Pearson enregistrés sont très élevés (supérieurs à 0,975, avec une médiane à 0,995). Ces valeurs, proches des valeurs enregistrées lors de l'étude la variabilité interne de la matrice (score médian de 0,998) montrent la similarité des spectres FTIR des différents échantillons.

- Conclusion

Il apparaît clairement qu'aucune différence significative n'est détectable entre les échantillons de début et de fin d'altération dans les résultats d'analyses par FTIR et ce, quel que soit le test de recherche de significativité employé. Cette technique, qui permet pourtant l'obtention rapide

d'information sur les grands groupes de molécules présents dans l'échantillon, ne permet pas de suggérer l'existence de modification des ratios entre ces groupes de molécules qui soient significatives au cours de l'altération. Soit la technique n'est pas suffisamment sensible, soit il est indispensable d'investiguer ces phénomènes d'altération, non pas au niveau macromoléculaire mais à l'échelle du métabolite. La composition chimique fine des échantillons est explorée dans la partie suivante présentant les résultats de prise d'empreinte par GC-MS et RMN au cours de l'altération.

Annexe Q. Filtration du bruit de fond pour l'analyse de l'altération avec la souche *B.weihenstephanensis*

Les intensités normalisées de l'ensemble des signaux ont été étudiées afin de confirmer la pertinence du seuil de coupure fixé à une intensité relative de 0,01. Ces intensités normalisées sont présentées par fraction dans la Figure 118.

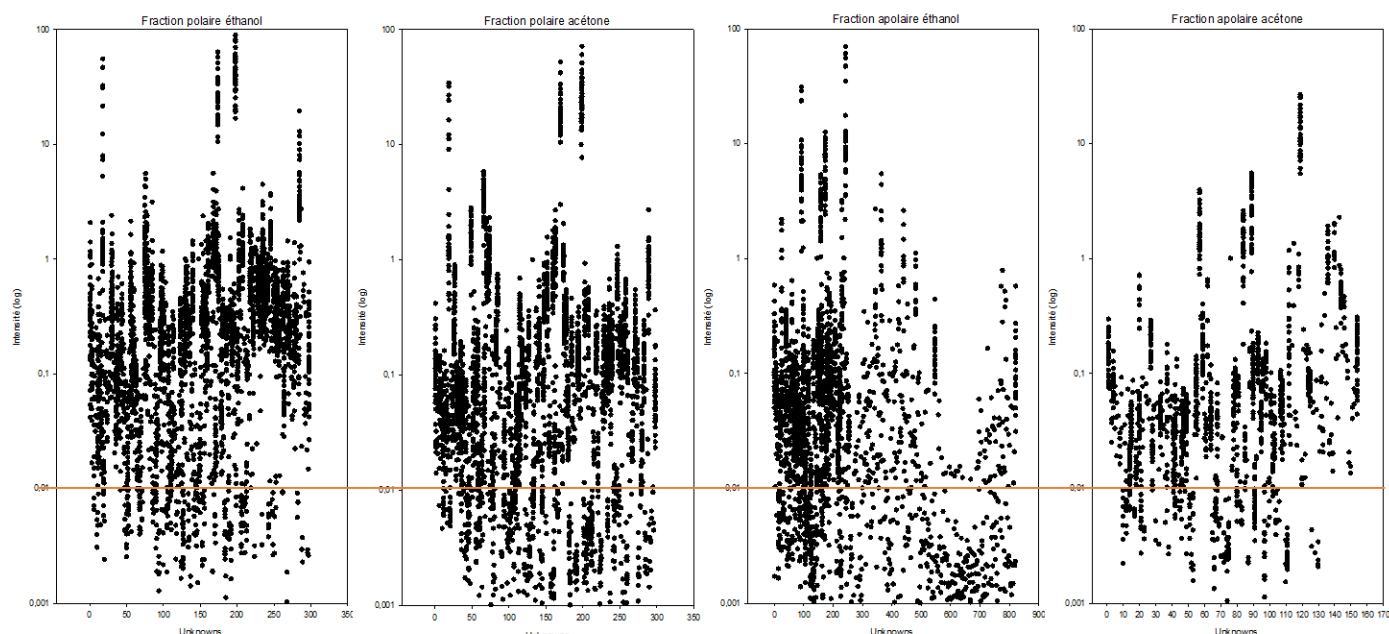


Figure 118 Intensités normalisées des signaux par fraction pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins à des temps d'analyse sélectionnés au cours de l'altération par la souche *B. weihenstephanensis*. Le seuil de coupure à 0,01 d'intensité relative est représenté par la barre orange.

Cette figure permet d'identifier visuellement la zone du seuil de coupure. On peut identifier assez clairement une zone dans laquelle les signaux sont plus rares aux alentours ou au-dessus de la valeur fixée à 0,01 dans l'ensemble des fractions. Cette zone correspond à la séparation entre les signaux d'intérêt potentiel et le bruit de fond. Le seuil de coupure employé et correspondant à 1% du signal de l'étalon interne permet donc d'éliminer les signaux les moins intenses tout en conservant la majeure partie des données.

Annexe R. Résultats des ACP réalisées sur les échantillons seuls et témoins seuls pour l'étude de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*

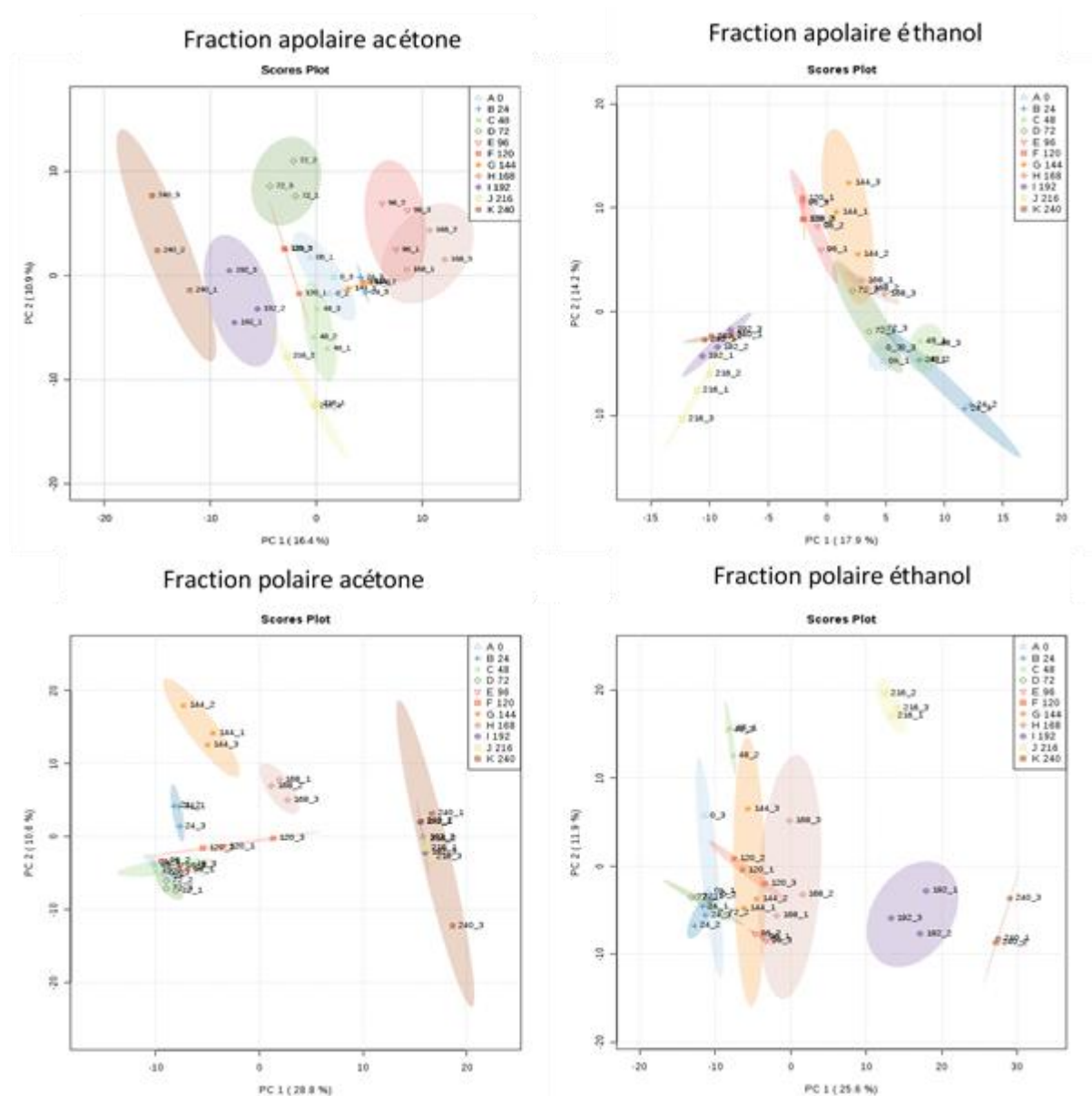


Figure 119. Résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse des échantillons seuls. Les données sont soumises à une transformation log et Pareto (centrées sur la moyenne et divisées par l'écart type de chaque variable).

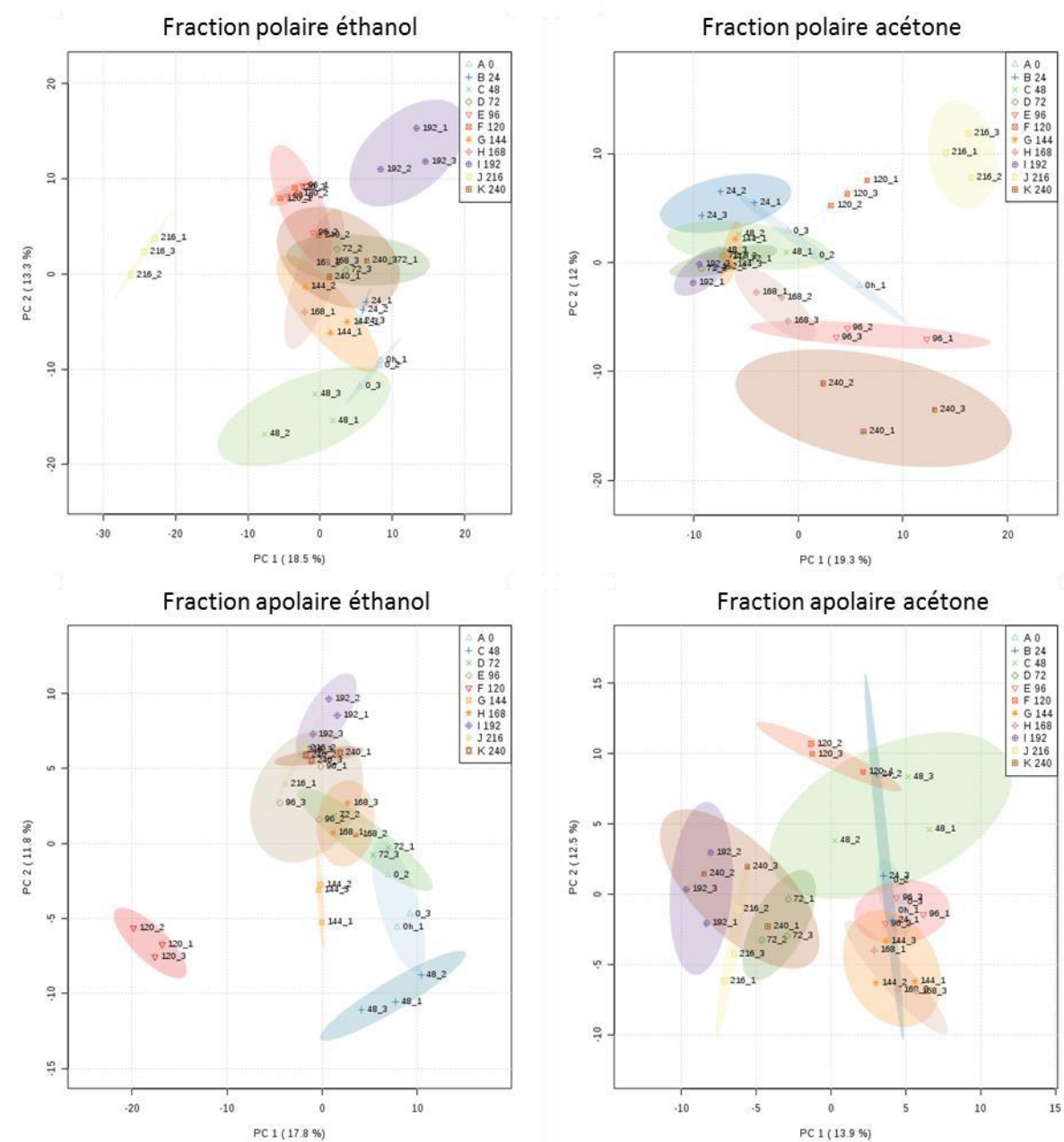


Figure 120. Résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse des témoins seuls. Les données sont soumises à une transformation log et Pareto (centrées sur la moyenne et divisées par l'écart type de chaque variable).

Annexe S. Résultats des ACP sur les données des différentes fractions pour l'analyse des échantillons et des témoins aux temps d'analyse sélectionnés (après élimination des réplicats aberrants) pour l'étude de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*

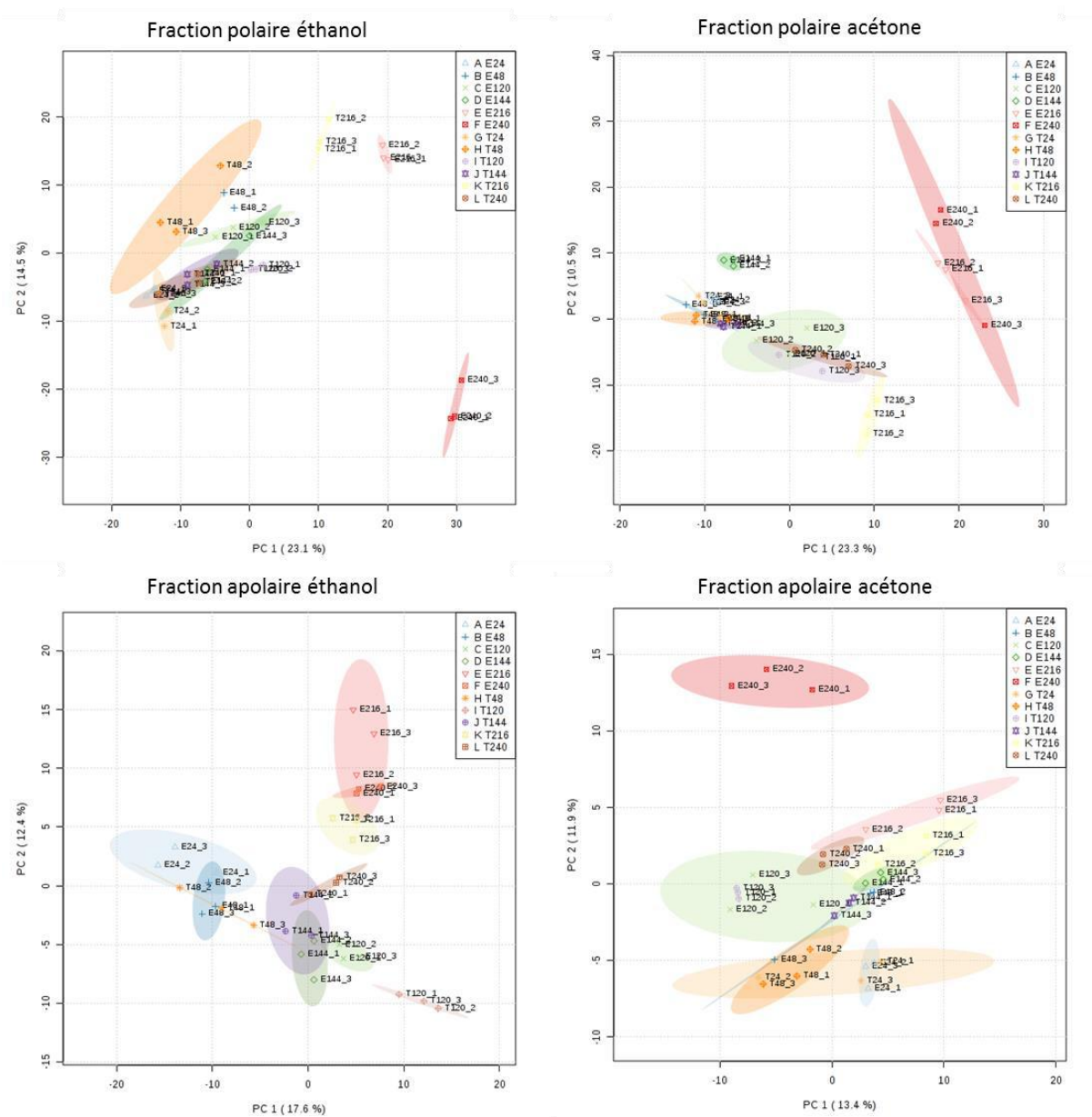


Figure 121. Représentation des résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins à des temps d'analyse sélectionnés

Annexe T. Analyse détaillée de la fraction polaire éthanol aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h

Pour chaque fraction, les résultats d'ACP, de PLS-DA et de classification hiérarchique ascendante correspondant à l'analyse des échantillons altérés seuls aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 244h ont été analysés. Ceux de la fraction polaire éthanol sont développés ici à titre d'exemple. Ceux des autres fractions sont succinctement présentés dans l'Annexe U.

L'objectif de ces observations est d'évaluer la possibilité de regrouper les temps d'analyse 24h et 48h, 120h et 144h et 216h et 240h, sous les appellations « début », « milieu » et « fin » correspondant au début, au milieu et à la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération. Ces regroupements permettraient de multiplier le nombre de répliques dans les analyses et de mieux identifier les cinétiques de variation des composés détectés au cours de l'altération. La Figure 122 présente les résultats d'ACP et de PLS-DA pour la fraction polaire éthanol aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h, 240h.

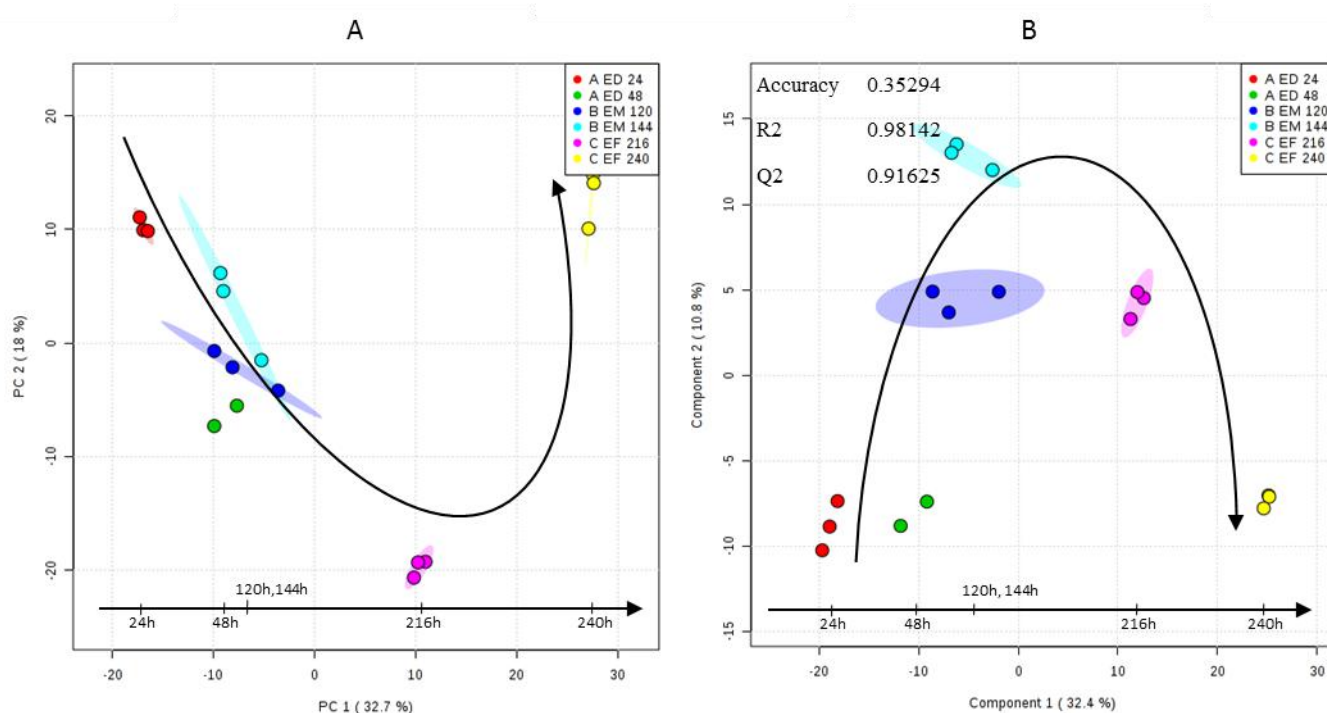


Figure 122. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h au cours de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis*.

Les groupes d'échantillons sont relativement bien séparés par l'ACP malgré quelques recouvrements pour les temps d'analyse 120h et 144h. La première composante, représentant 32,7% de la variance observée, permet de séparer les différents échantillons (en dehors des recouvrements cités plus haut). L'analyse par PLS-DA permet une séparation complète des groupes d'échantillons

selon les deux composantes. On notera une forte proximité entre les échantillons des groupes 24 et 48h, et ceux des groupes 120 et 144h, particulièrement selon la première composante représentant 32,4% de la variance observée. Les données ont ensuite été soumises à une classification hiérarchique ascendante (HC). La Figure 123 présente les résultats de cette analyse (dendrogramme) pour la fraction polaire éthanol aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h, 240h. Les algorithmes utilisés sont paramétrés avec les distances euclidiennes et utilise le critère de Ward pour le clustering.

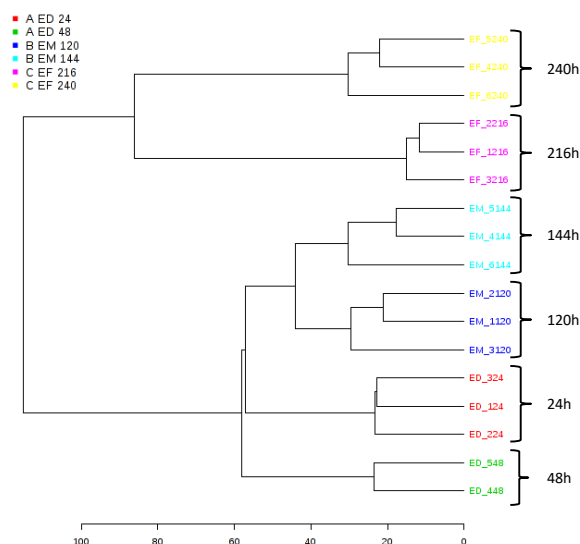


Figure 123. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h au cours de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis*.

L'analyse permet une très bonne classification des échantillons en fonction du temps d'altération. Les échantillons de milieu et de fin de cinétique sont correctement regroupés et séparés. Les échantillons du temps d'analyse 24h semblent plus proches de ceux du milieu de cinétique que les échantillons du temps d'analyse 48h.

L'analyse des autres fractions (voir -Annexe U) permet de confirmer la pertinence du regroupement des temps d'analyse 24h et 48h, 120h et 144h et 216h et 240h. En effet, en dehors de la fraction apolaire acétone, les seuls recouvrements observés sur les représentations graphiques des ACP concernent les échantillons que l'on se propose de regrouper. Les analyses en PLS-DA permettent également une bonne séparation des échantillons et ne présentent aucun recouvrement. Pour l'ensemble des fractions, une bonne séparation des « nouveaux groupes » d'échantillons début (24h et 48h), milieu (120h et 144h) et fin (216h et 240h) est constatée sur la composante représentant la plus grande partie de la variance observée. Ces observations sont confirmées par les résultats de classification ascendante hiérarchique pour l'ensemble des fractions.

Pour conclure, l'étude indépendante des différents temps d'analyse confirme la pertinence du regroupement des points 24h et 48h, 120h et 144h et 216h et 240h pour la suite des analyses.

Annexe U. Analyse des échantillons seuls aux temps d'analyse 24, 48, 120, 144, 216 et 240h pour les fractions polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone pour l'étude de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*

- Fraction polaire acétone

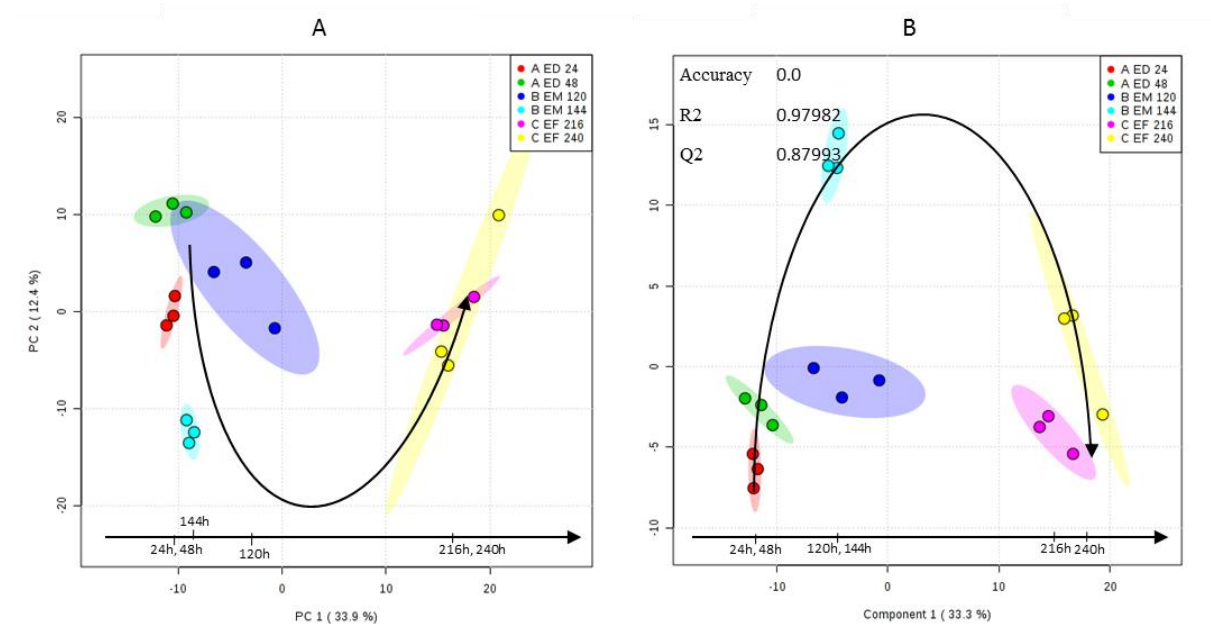


Figure 124. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.

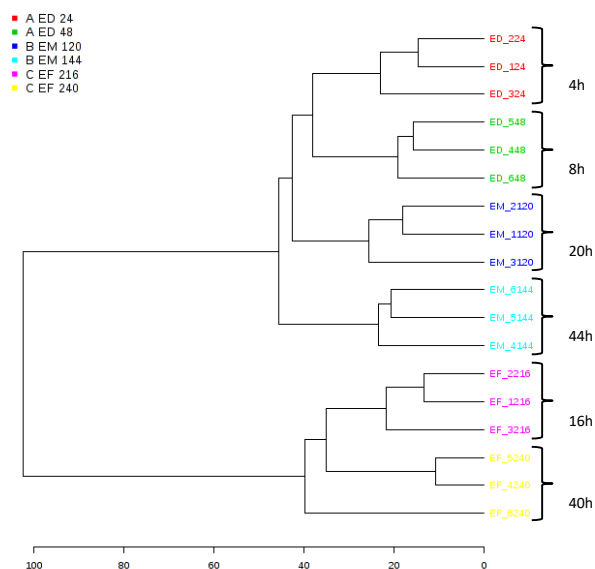


Figure 125. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.

- *Fraction apolaire éthanol*

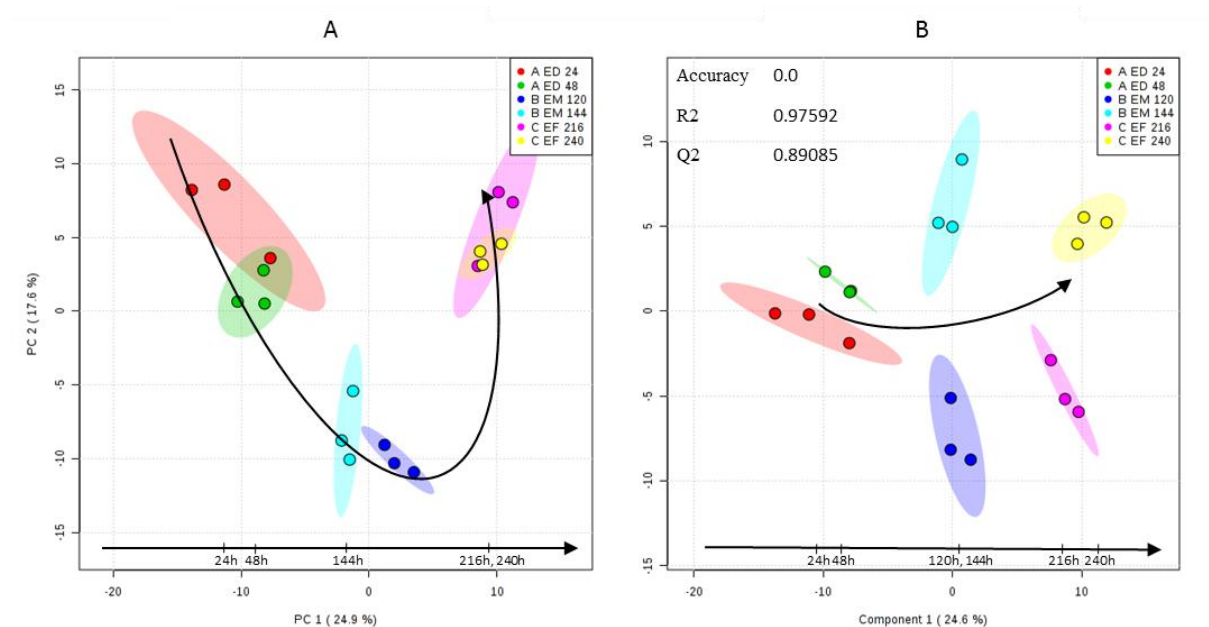


Figure 126. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.

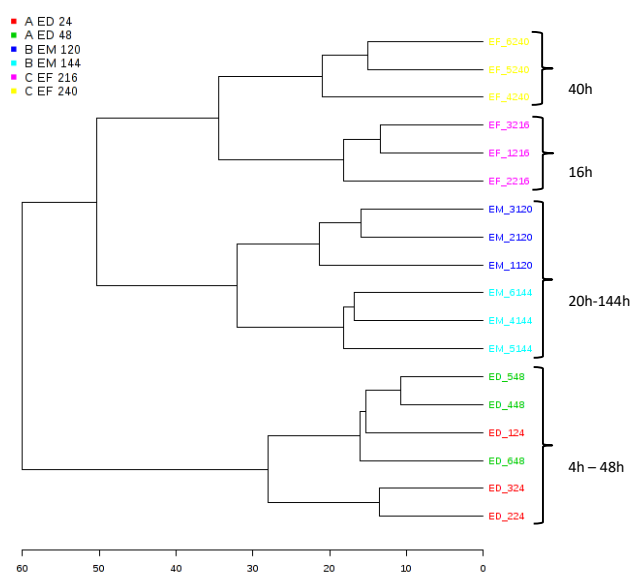


Figure 127. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.

- Fraction apolaire acétone

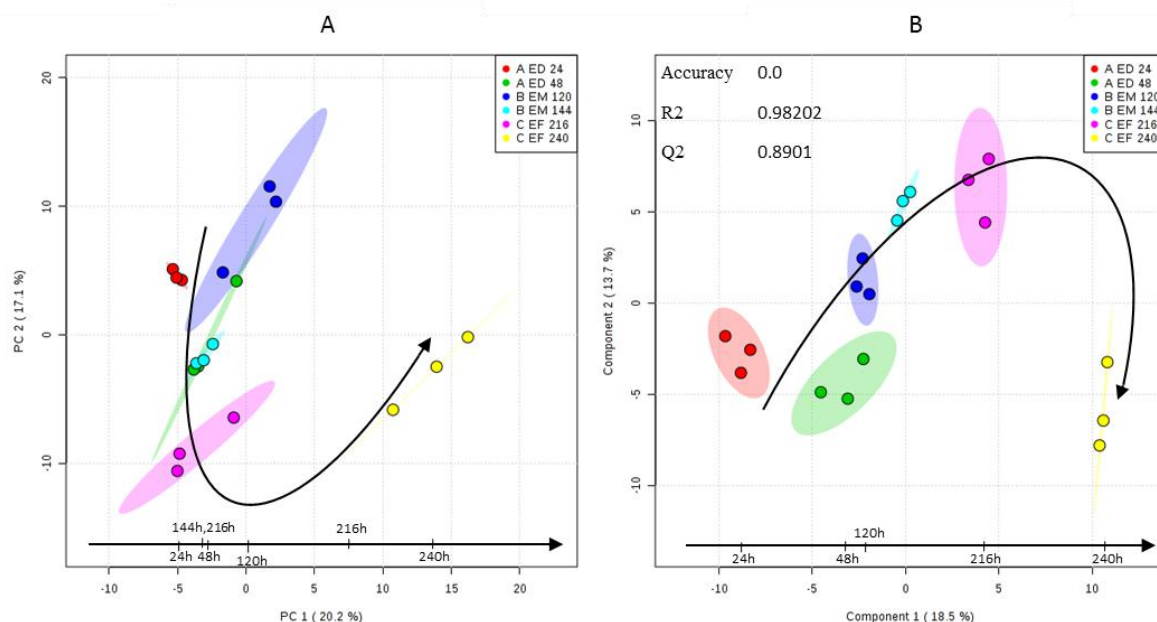


Figure 128. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.

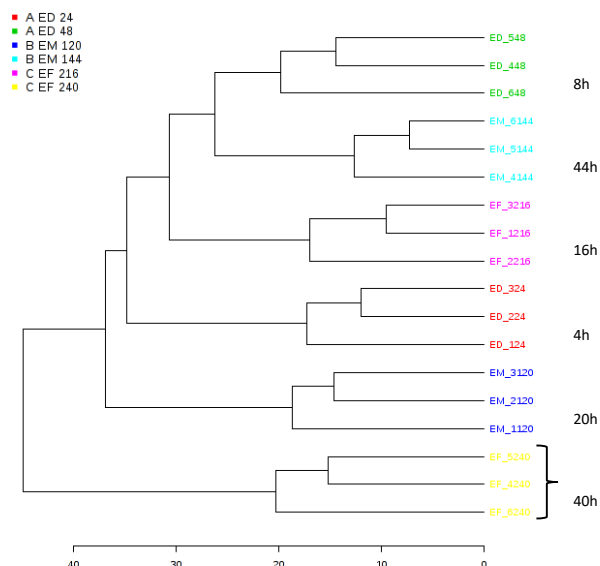


Figure 129. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h.

Annexe V. Analyse détaillée des fractions polaire éthanol, apolaire éthanol et apolaire acétone aux temps d'analyses regroupés 24 et 48h, 120 et 144h et 216 et 240 h pour l'étude de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstepfensis*

- Fraction polaire éthanol

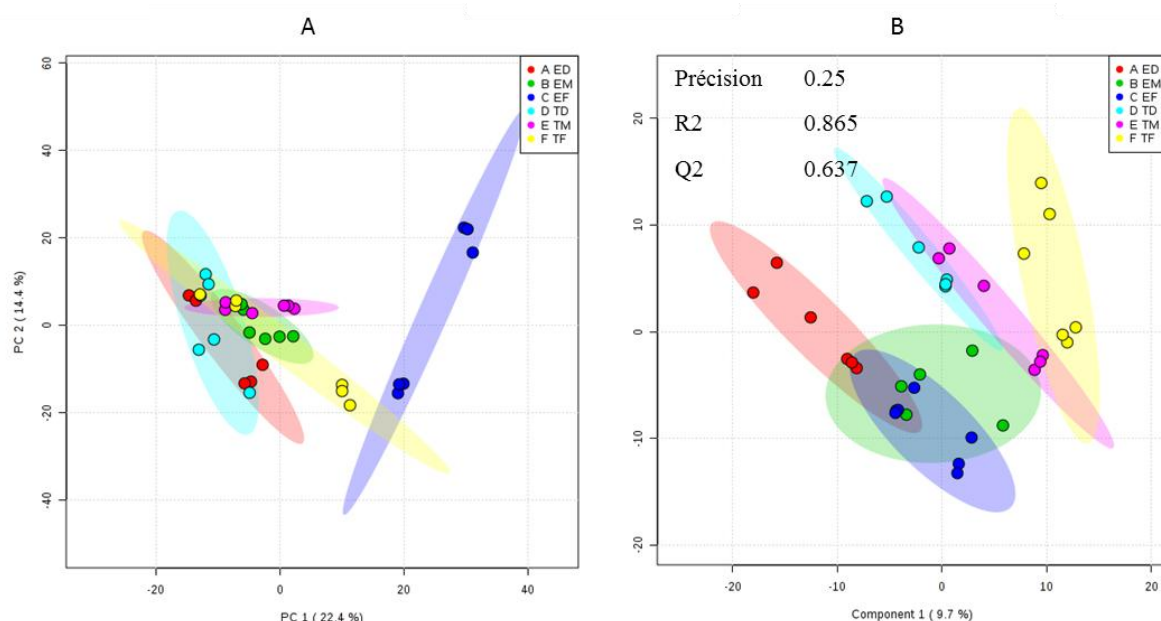


Figure 130. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

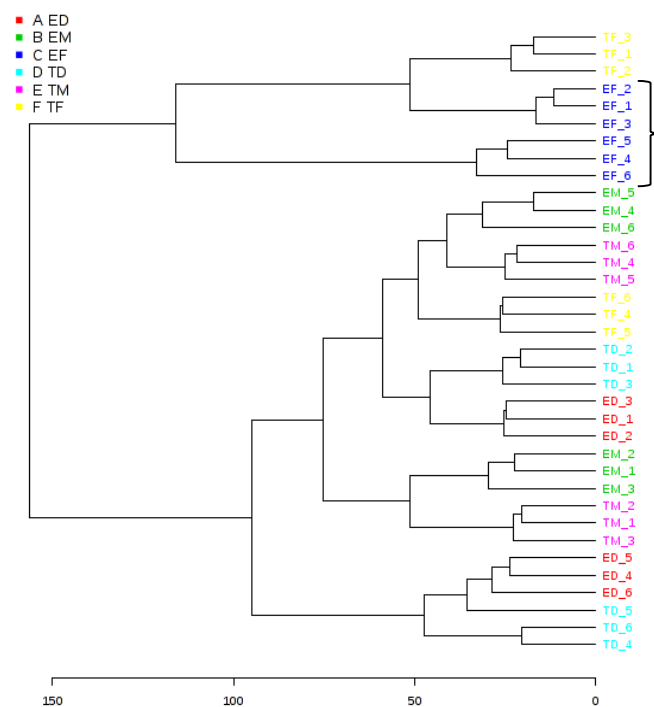


Figure 131. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

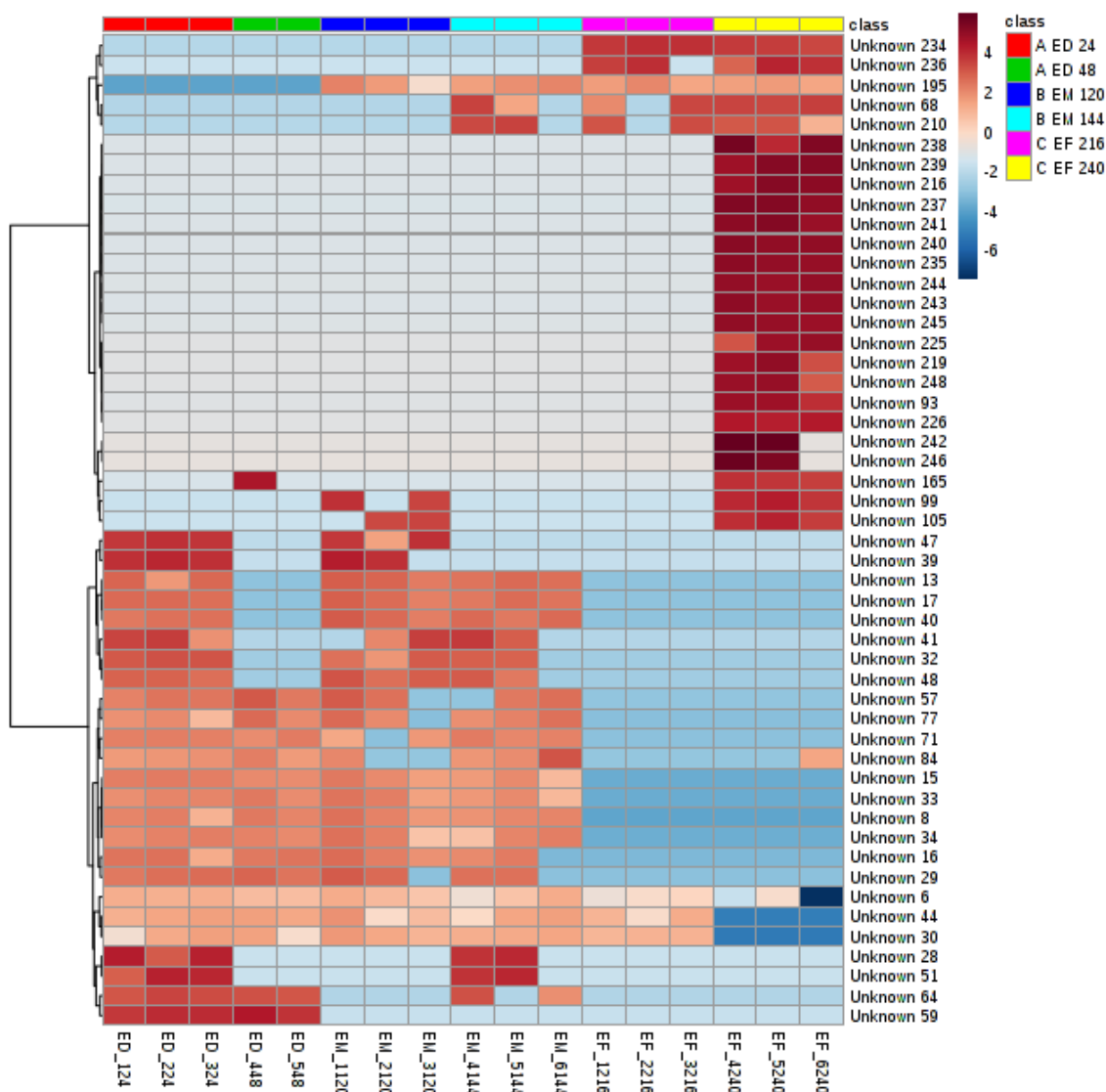


Figure 132. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.

- Fraction apolaire éthanol

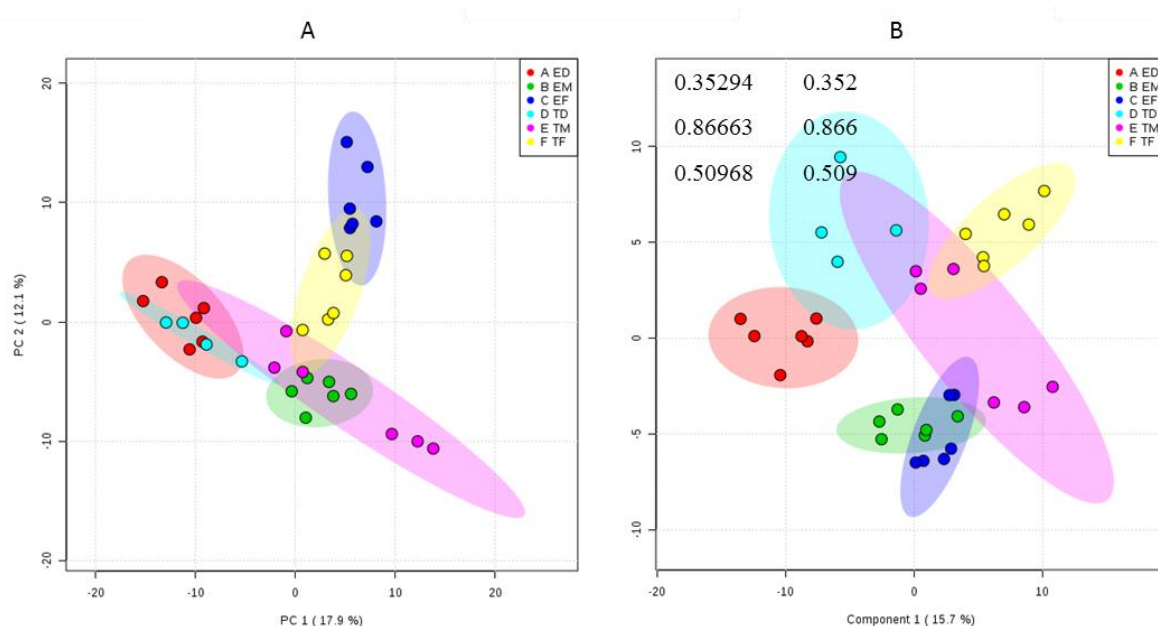


Figure 133. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

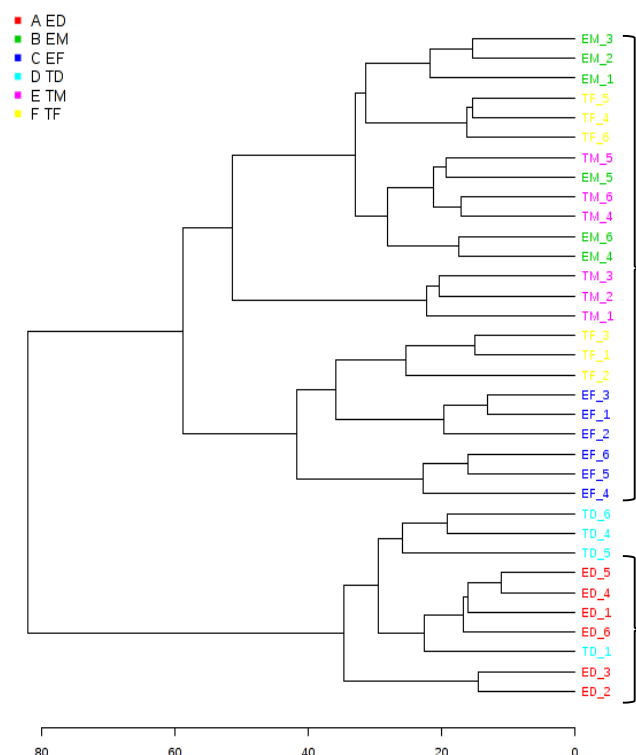


Figure 134. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

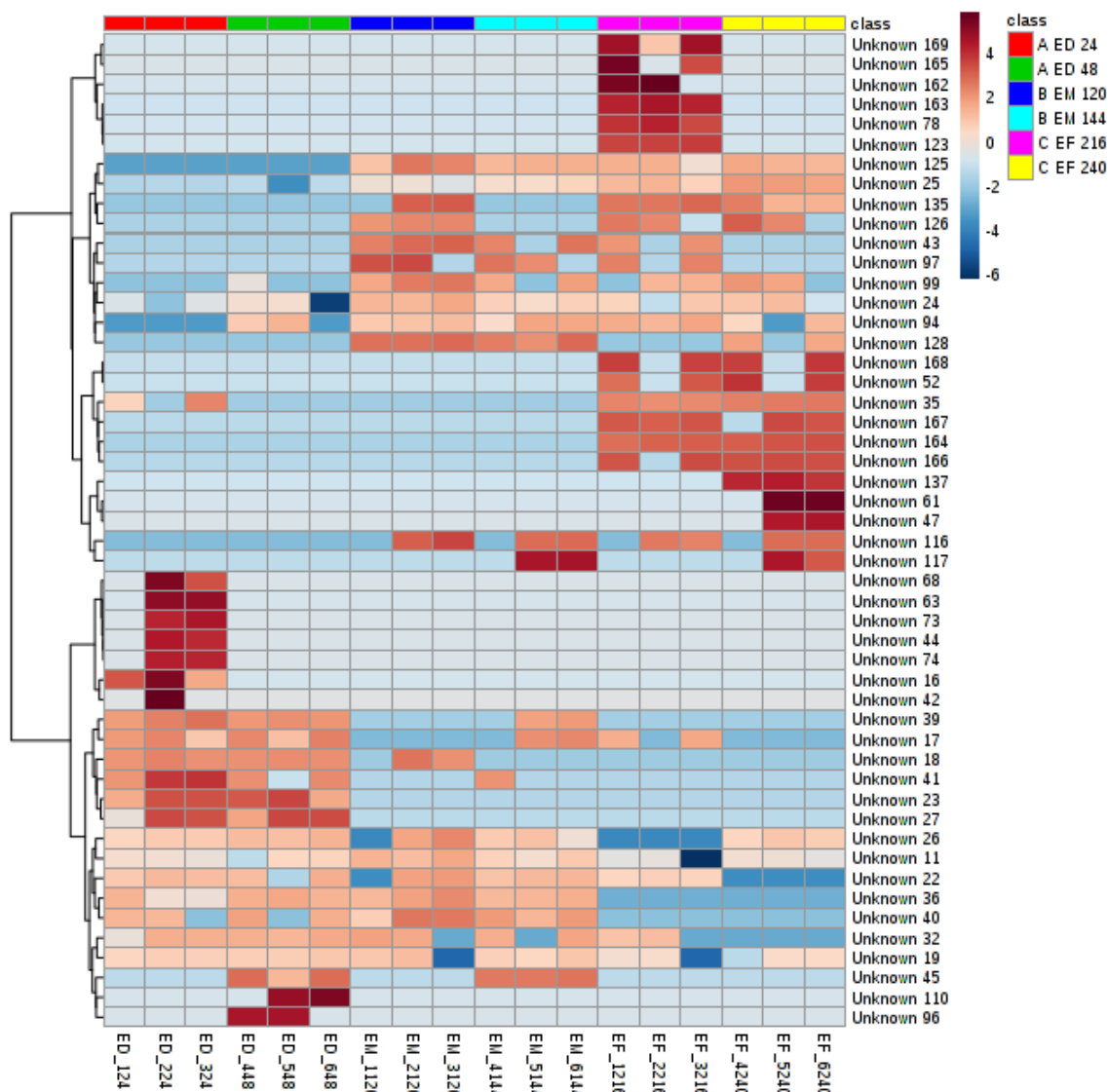


Figure 135. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.

- *Fraction apolaire acétone*

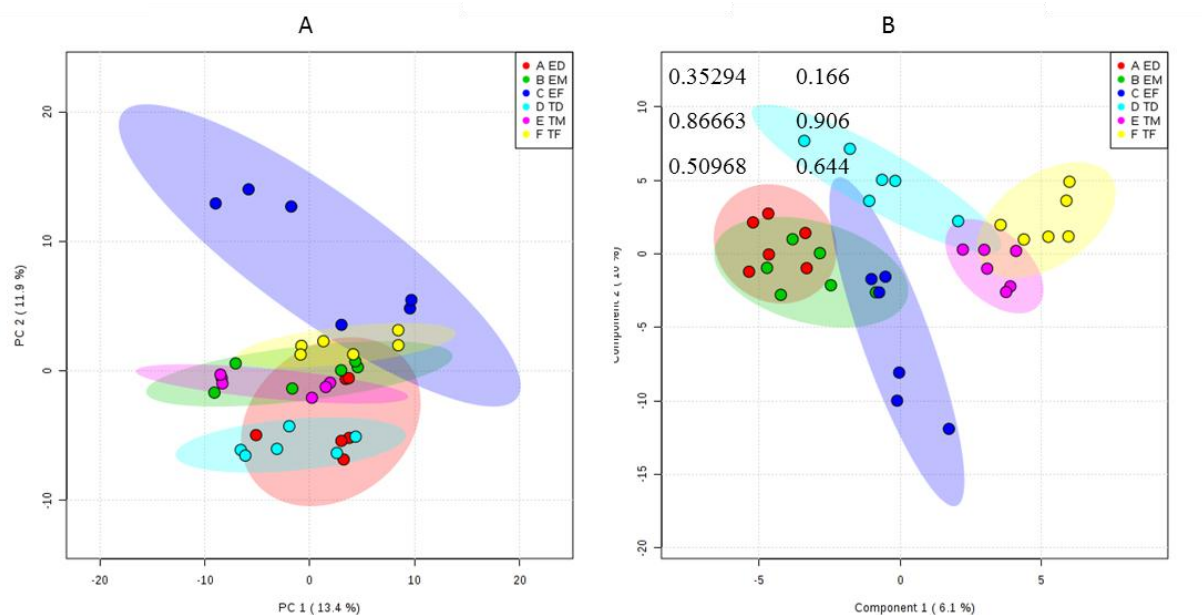


Figure 136. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

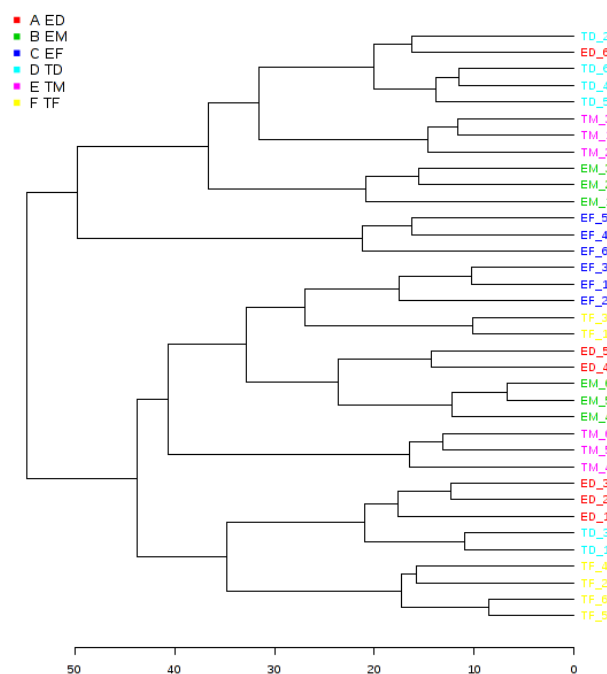


Figure 137. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

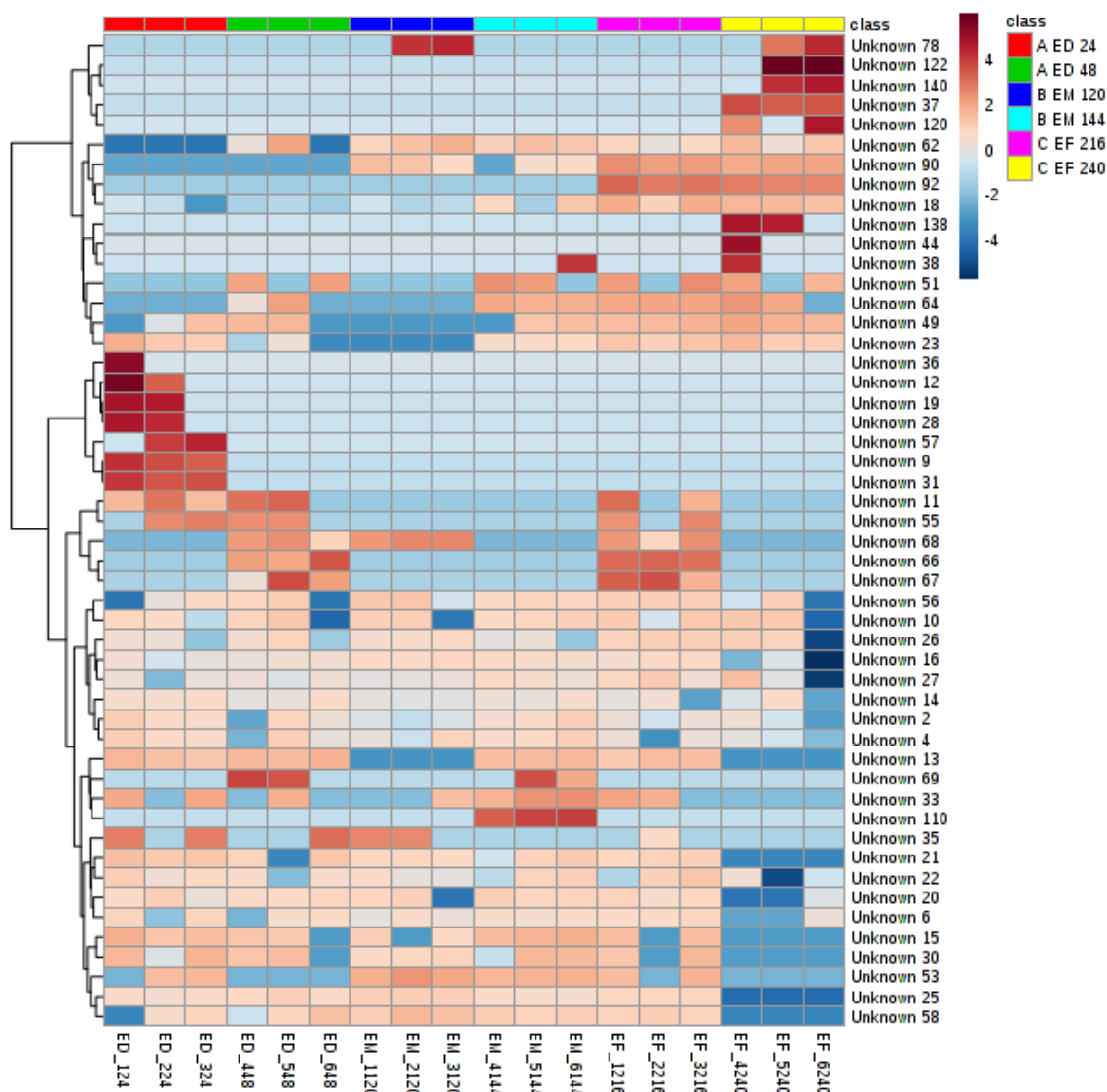


Figure 138. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.

La répartition des marqueurs potentiels dans les différentes fractions a été analysée à travers l'étude des diagrammes de Venn. La cinétique d'évolution de l'intensité de chacun des marqueurs retenus a également été étudiée dans le but d'identifier parmi ces composés ceux dont la variation d'intensité interviendrait le plus tôt. En effet, ces marqueurs pourraient permettre de caractériser le plus rapidement possible l'altération microbiologique et ainsi pouvoir réagir plus efficacement en milieu industriel (pendant le stade précoce de l'altération). L'évolution du signal de chacun de ces composés a donc été étudiée aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h pour les échantillons sains (témoins) et les échantillons altérés.

- Répartition des marqueurs potentiels dans les différentes fractions

La répartition des marqueurs dans les différentes fractions a été analysée à travers l'étude des diagrammes de Venn (Figure 139).

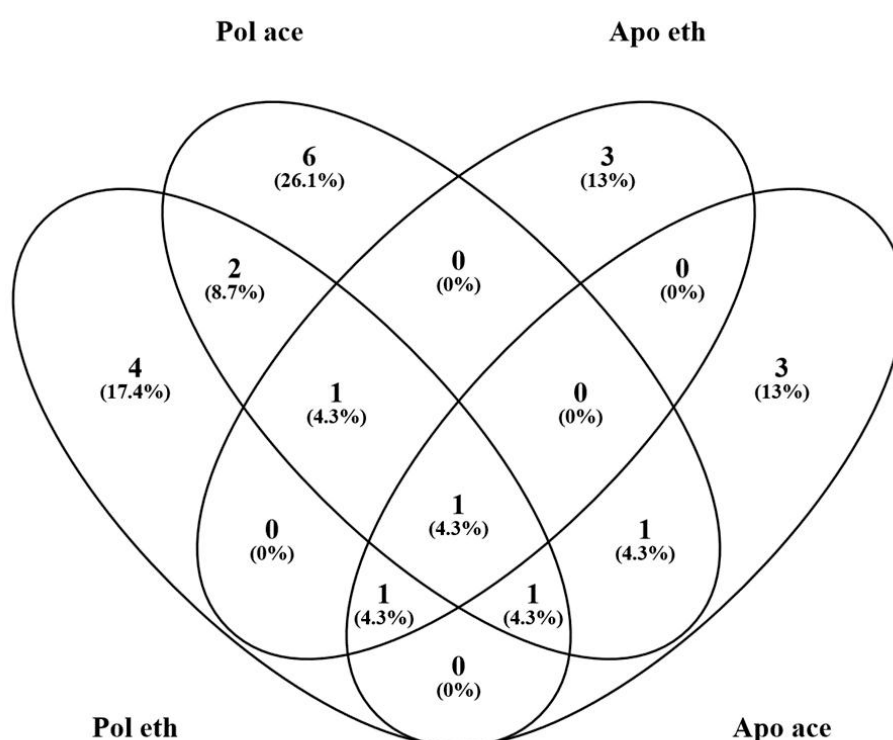


Figure 139. Diagramme de Venn présentant les composés d'intérêt identifiés dans les quatre fractions étudiées (polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone) pour l'étude de l'altération avec la souche *B. weihenstephanensis*.

Sur un ensemble de 21 marqueurs retenus, un seul est présent à la fois dans les quatre fractions étudiées (l'acide lactique). Les fractions dans lesquelles sont détectés le plus de composés d'intérêt sont la fraction polaire acétone avec 12 composés, la fraction polaire éthanol avec 10 composés, la fraction apolaire acétone avec 7 composés, et la fraction apolaire éthanol avec 5 composés. La majorité des composés d'intérêt n'est détectée que dans une seule des fractions étudiée. Les fractions polaire acétone, polaire éthanol, apolaire éthanol et apolaire acétone contiennent respectivement 6, 4, 3 et 3 composés qui ne sont détectés comme potentiellement intéressants dans aucune des autres fractions. Cette analyse permet de confirmer la complémentarité entre les données obtenues dans chacune des fractions employées et la pertinence de l'analyse des données issues de l'ensemble de ces fractions.

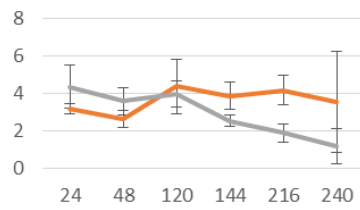
- *Quantification relative des marqueurs d'intérêt par fraction*

La Figure 140 présente les courbes d'intensité des signaux sélectionnés dans chacune des fractions aux différents temps d'analyses pour les échantillons (en orange) et les témoins (en gris). Les données correspondant aux signaux non identifiées sont présentées dans l'Annexe W.

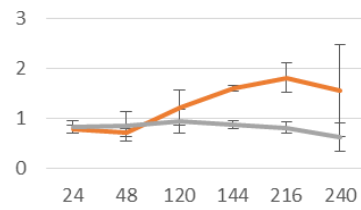
Polaire éthanol



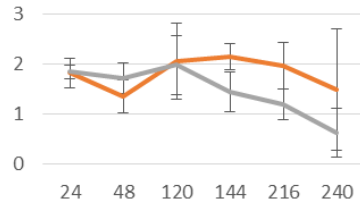
Polaire acétone



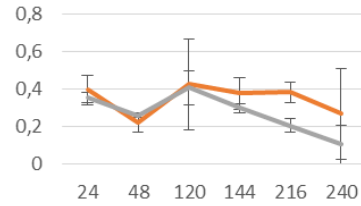
Leucine



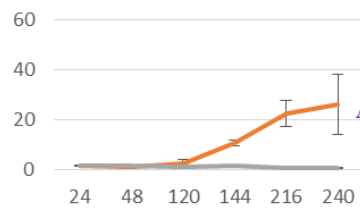
Glycérol



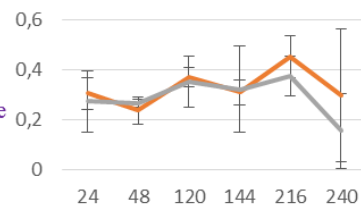
Valine



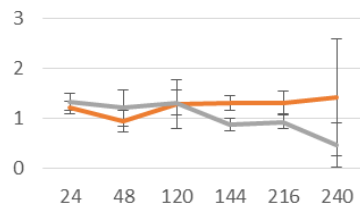
Phenylalanine



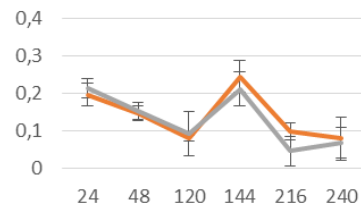
Acide lactique



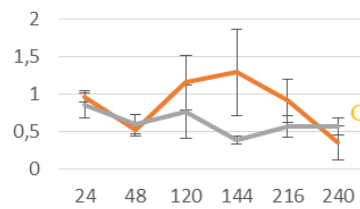
Tyrosine



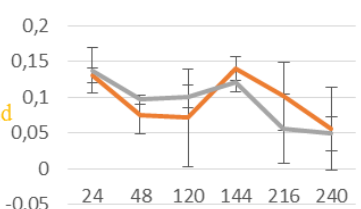
Isoleucine



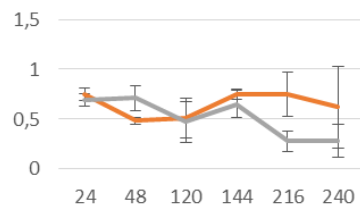
Urée



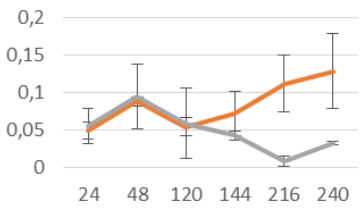
methyl α -D-Glucofuranoside



Acide pyroglutamique

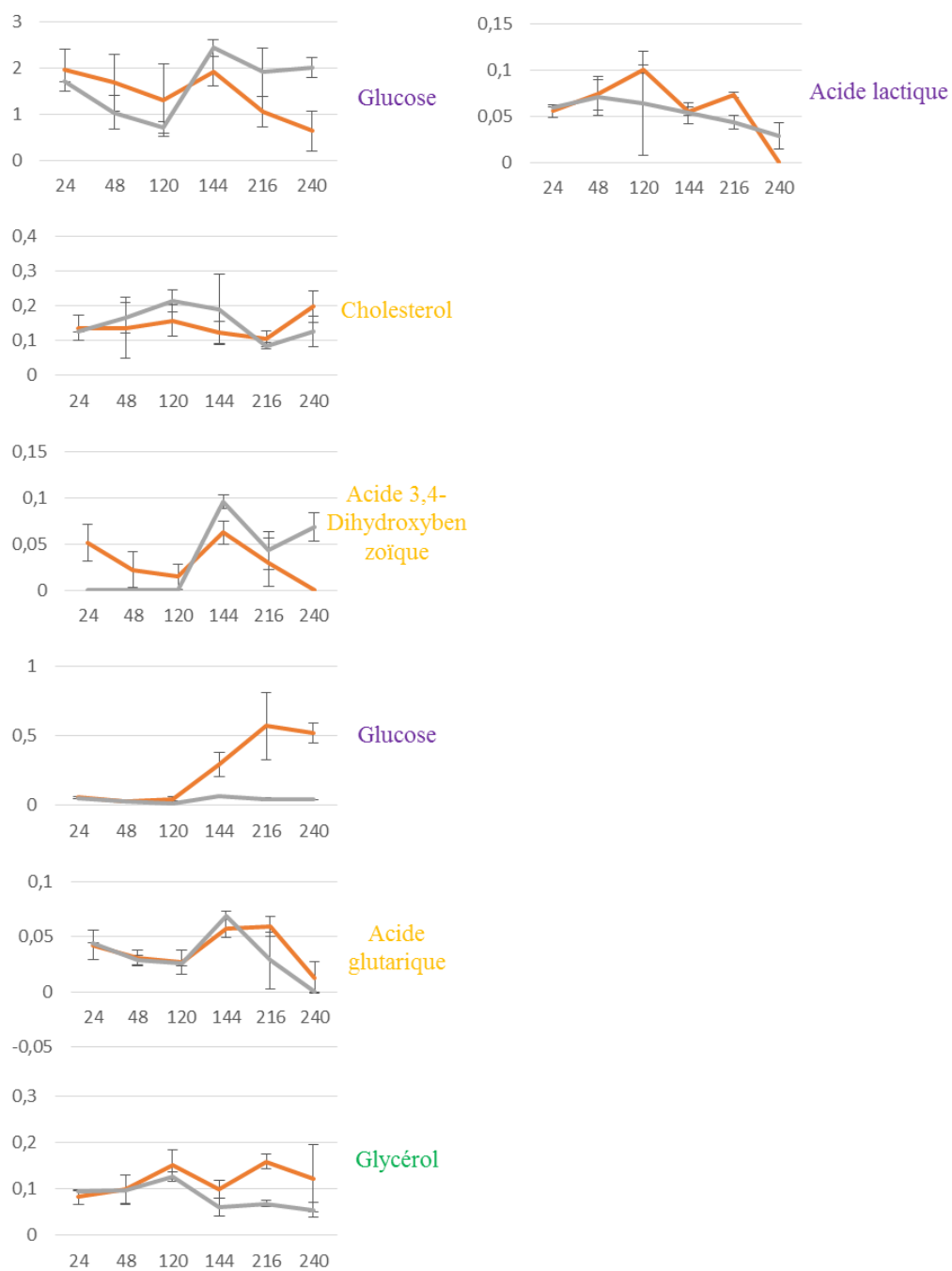


Alanine



Acide phosphorique

Apolaire éthanol



Apolaire acétone

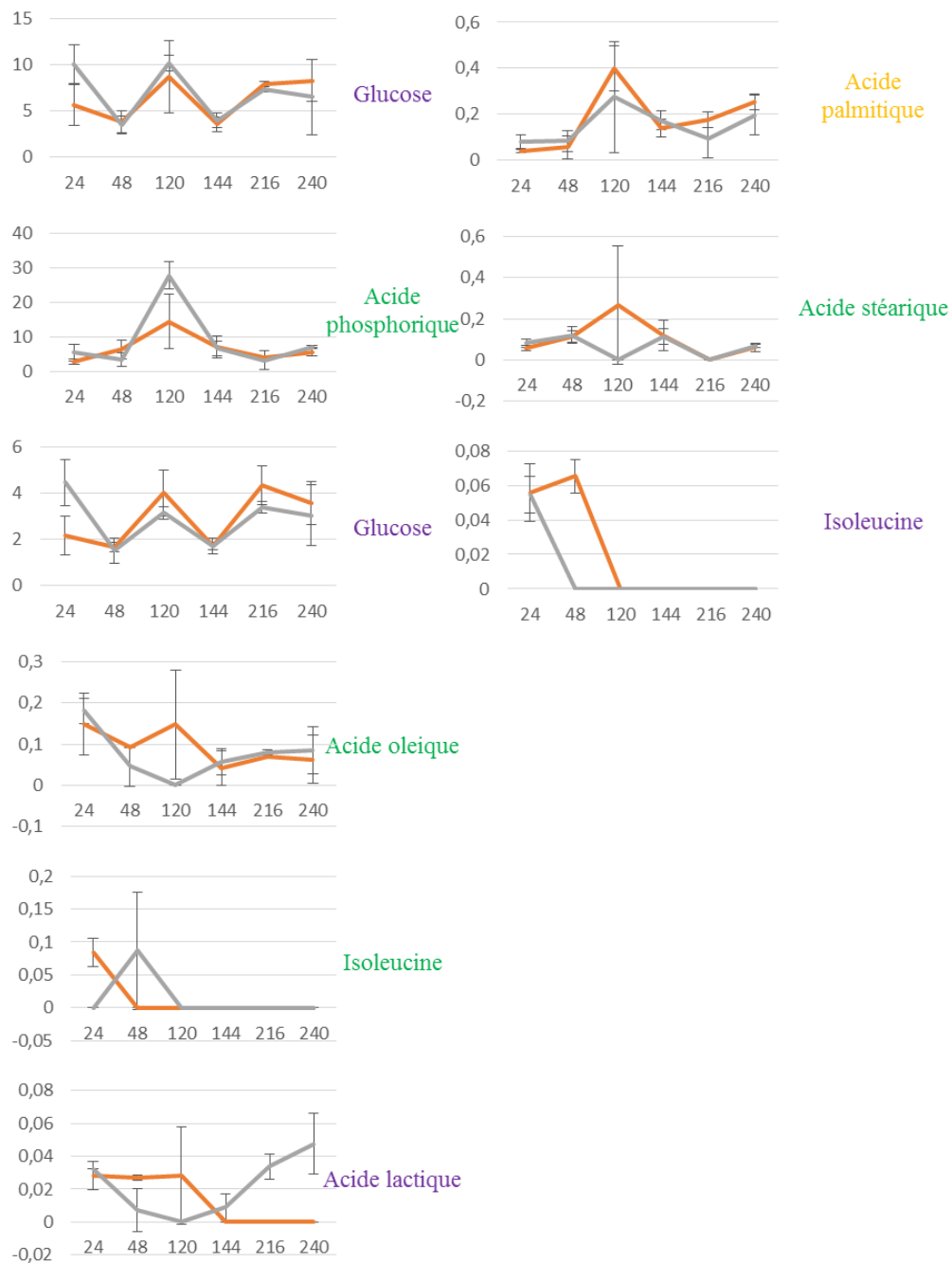


Figure 140. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h, 240h dans les quatre fractions étudiées. Les valeurs correspondant aux échantillons sains (témoins) sont indiquées en gris, celles correspondant aux échantillons en cours d'altération sont indiquées en orange. Les barres d'erreur correspondent à plus et moins l'écart type enregistré sur les trois réplicats pour chaque condition.

Polaire éthanol											
Echantillons	24h		48h		120h		144h		216h		240h
Acide lactique	1,3041 +/- 0,1212		1,2133 +/- 0,4150		2,9113 +/- 2,0337		9,1620 +/- 2,6762		44,7685 +/- 11,6067		33,0895 +/- 0,5324
Glycérol	0,4588 +/- 0,0740		0,6184 +/- 0,0729		1,3032 +/- 0,9460		0,9404 +/- 0,1954		1,7846 +/- 0,7519		1,7354 +/- 0,2462
Glutamine	0,3043 +/- 0,0364		0,0000 +/- 0,0000		0,5440 +/- 0,2811		0,4558 +/- 0,1618		0,7314 +/- 0,0502		0,8705 +/- 0,0934
Alanine	0,3167 +/- 0,0596		0,2902 +/- 0,0937		0,8192 +/- 0,2550		0,4666 +/- 0,2575		0,4967 +/- 0,0711		1,3193 +/- 0,1596
Acide phosphorique	0,2899 +/- 0,0547		0,6558 +/- 0,5587		0,5769 +/- 0,4891		0,4013 +/- 0,1512		1,9391 +/- 0,7168		4,9156 +/- 0,1259
Tyrosine	0,0311 +/- 0,0167		0,0000 +/- 0,0000		0,0333 +/- 0,0464		0,0581 +/- 0,0738		0,0000 +/- 0,0000		0,1519 +/- 0,0674
Glucose	46,0227 +/- 8,7283		22,8539 +/- 8,5777		58,1167 +/- 11,3748		27,1329 +/- 11,8195		38,6666 +/- 6,6433		33,2960 +/- 7,7332
Acide aspartique	0,2027 +/- 0,0620		0,0000 +/- 0,0000		0,0000 +/- 0,0000		0,1239 +/- 0,1442		0,0000 +/- 0,0000		0,0198 +/- 0,0685
Fructose	0,2095 +/- 0,0693		0,1550 +/- 0,0262		0,0000 +/- 0,0000		0,1094 +/- 0,0959		0,0000 +/- 0,0000		0,0000 +/- 0,0944
Témoins											
Acide lactique	1,3358 +/- 0,1344		0,9992 +/- 0,2253		1,1555 +/- 0,1391		0,9677 +/- 0,0633		0,5886 +/- 0,2986		1,5005 +/- 0,5324
Glycérol	0,5533 +/- 0,1023		0,4744 +/- 0,0895		0,8084 +/- 0,1031		0,4239 +/- 0,0658		1,0473 +/- 0,6209		0,7707 +/- 0,2462
Glutamine	0,3355 +/- 0,0584		0,0000 +/- 0,0000		0,5991 +/- 0,1521		0,2499 +/- 0,0425		0,2329 +/- 0,2844		0,2782 +/- 0,0934
Alanine	0,4457 +/- 0,1344		0,2053 +/- 0,0072		0,8131 +/- 0,1824		0,3774 +/- 0,1172		0,4789 +/- 0,0932		0,3460 +/- 0,1596
Acide phosphorique	0,1823 +/- 0,0506		0,6837 +/- 0,4880		0,0689 +/- 0,0107		0,3318 +/- 0,2004		0,4208 +/- 0,3133		0,2729 +/- 0,1259
Tyrosine	0,0518 +/- 0,0148		0,0000 +/- 0,0000		0,0478 +/- 0,0438		0,0370 +/- 0,0168		0,0000 +/- 0,0000		0,0852 +/- 0,0674
Glucose	41,5237 +/- 9,4078		29,8656 +/- 4,3818		73,5748 +/- 10,7320		34,2473 +/- 15,4963		##### +/- 74,9648		52,8876 +/- 7,7332
Acide aspartique	0,2018 +/- 0,0445		0,0470 +/- 0,0408		0,2997 +/- 0,0142		0,1542 +/- 0,0480		0,1554 +/- 0,1803		0,1411 +/- 0,0685
Fructose	0,1627 +/- 0,0678		0,2496 +/- 0,0798		0,0000 +/- 0,0000		0,1676 +/- 0,0207		0,0000 +/- 0,0000		0,2069 +/- 0,0944

Polaire acétone												
Echantillons	24h		48h		120h		144h		216h		240h	
Valine	1,8279 +/- 0,3029		1,3662 +/- 0,3280		2,0630 +/- 0,7666		2,1510 +/- 0,2571		1,9801 +/- 0,4688		1,4951 +/- 0,4958	
Acide lactique	1,4491 +/- 0,1307		1,1290 +/- 0,0936		2,5521 +/- 1,4592		10,4784 +/- 1,2142		22,3927 +/- 5,4149		26,0723 +/- 0,1768	
Isoléucine	1,2208 +/- 0,1204		0,9503 +/- 0,2104		1,2911 +/- 0,4971		1,3193 +/- 0,1474		1,3251 +/- 0,2335		1,4364 +/- 0,4435	
Alanine	0,7550 +/- 0,0627		0,4837 +/- 0,0331		0,5122 +/- 0,1957		0,7474 +/- 0,0505		0,7543 +/- 0,2213		0,6210 +/- 0,1649	
Glycérol	0,7801	0,0862	0,7115	0,0725	1,2179	0,3501	1,5989	0,0556	1,8075	0,3014	1,5464	0,2837
Acide pyroglutamique	0,0742 +/- 0,0251		0,0717 +/- 0,0683		0,1405 +/- 0,0170		0,1012 +/- 0,0480		0,0560 +/- 0,0576		0,1377 +/-	
Leucine	3,1732 +/- 0,2633		2,6063 +/- 0,4690		4,3561 +/- 1,4437		3,8530 +/- 0,7191		4,1529 +/- 0,7971		3,5193 +/- 0,9373	
Phénylalanine	0,3974 +/- 0,0785		0,2212 +/- 0,0487		0,4279 +/- 0,2425		0,3782 +/- 0,0871		0,3846 +/- 0,0536		0,2692 +/- 0,1027	
Tyrosine	0,3052 +/- 0,0640		0,2375 +/- 0,0547		0,3700 +/- 0,0398		0,3099 +/- 0,0495		0,4522 +/- 0,0843		0,2957 +/- 0,1504	
Urée	0,1978 +/- 0,0309		0,1476 +/- 0,0198		0,0812 +/- 0,0068		0,2463 +/- 0,0417		0,0997 +/- 0,0220		0,0808 +/- 0,0397	
Acide phosphorique	0,0489 +/- 0,0118		0,0879 +/- 0,0056		0,0541 +/- 0,0121		0,0716 +/- 0,0296		0,1118 +/- 0,0384		0,1285 +/- 0,0021	
méthyl α -D-Glucofuranoside	0,9668 +/- 0,0765		0,5142 +/- 0,0779		1,1521 +/- 0,3583		1,2907 +/- 0,5757		0,9094 +/- 0,2911		0,3505 +/- 0,1160	
Témoins												
Valine	1,8480 +/- 0,1314		1,7206 +/- 0,3012		1,9883 +/- 0,5860		1,4444 +/- 0,3978		1,2038 +/- 0,3120		0,6294 +/- 0,4958	
Acide lactique	1,4994 +/- 0,3800		1,4177 +/- 0,3055		0,9262 +/- 0,1456		1,2830 +/- 0,0790		0,4575 +/- 0,0757		0,7427 +/- 0,1768	
Isoléucine	1,3317 +/- 0,1678		1,2221 +/- 0,3658		1,3219 +/- 0,2471		0,8922 +/- 0,1270		0,9309 +/- 0,1359		0,4783 +/- 0,4435	
Alanine	0,6952 +/- 0,0611		0,7120 +/- 0,1260		0,4744 +/- 0,2028		0,6515 +/- 0,1337		0,2826 +/- 0,1017		0,2853 +/- 0,1649	
Glycérol	0,8197 +/- 0,1204		0,8350 +/- 0,3054		0,9378 +/- 0,2415		0,8780 +/- 0,0792		0,8032 +/- 0,1141		0,6149 +/- 0,2837	
Acide pyroglutamique	0,0967 +/- 0,0060		0,1010 +/- 0,0159		0,1218 +/- 0,0143		0,0555 +/- 0,0487		0,0491 +/- 0,0241		0,0104 +/-	
Leucine	4,3288 +/- 1,1558		3,5684 +/- 0,7490		3,9765 +/- 0,6997		2,5227 +/- 0,3021		1,8667 +/- 0,5082		1,1794 +/- 0,9373	
Phénylalanine	0,3565 +/- 0,0298		0,2604 +/- 0,0110		0,4079 +/- 0,0934		0,2996 +/- 0,0255		0,2068 +/- 0,0381		0,1068 +/- 0,1027	
Tyrosine	0,2728 +/- 0,1230		0,2666 +/- 0,0164		0,3528 +/- 0,1014		0,3213 +/- 0,1736		0,3744 +/- 0,0779		0,1544 +/- 0,1504	
Urée	0,2145 +/- 0,0250		0,1537 +/- 0,0226		0,0936 +/- 0,0596		0,2132 +/- 0,0459		0,0466 +/- 0,0405		0,0694 +/- 0,0397	
Acide phosphorique	0,0555 +/- 0,0236		0,0945 +/- 0,0428		0,0587 +/- 0,0471		0,0428 +/- 0,0059		0,0082 +/- 0,0071		0,0321 +/- 0,0021	
méthyl α -D-Glucofuranoside	0,8490 +/- 0,1690		0,5940 +/- 0,1318		0,7615 +/- 0,3592		0,3882 +/- 0,0495		0,5647 +/- 0,1401		0,5619 +/- 0,1160	

Apolaire éthanol												
Echantillons	24h		48h		120h		144h		216h		240h	
Glycérol	0,0831 +/-	0,0157	0,1001 +/-	0,0305	0,1529 +/-	0,0312	0,0992 +/-	0,0194	0,1596 +/-	0,0162	0,1232 +/-	0,0155
Acide lactique	0,0555 +/-	0,0070	0,0741 +/-	0,0182	0,1008 +/-	0,0044	0,0550 +/-	0,0045	0,0728 +/-	0,0032	0,0000 +/-	0,0143
Glucose	1,9473 +/-	0,4514	1,6776 +/-	0,6157	1,2946 +/-	0,7923	1,9176 +/-	0,3204	1,0572 +/-	0,3289	0,6280 +/-	0,2176
Glucose	0,0546 +/-	0,0102	0,0282 +/-	0,0062	0,0437 +/-	0,0148	0,2947 +/-	0,0856	0,5716 +/-	0,2419	0,5179 +/-	0,0014
Acide 3,4-Dihydroxybenzoïque	0,0514 +/-	0,0200	0,0223 +/-	0,0194	0,0147 +/-	0,0134	0,0625 +/-	0,0127	0,0299 +/-	0,0260	0,0000 +/-	0,0153
Cholestérol	0,1367 +/-	0,0364	0,1367 +/-	0,0891	0,1568 +/-	0,0452	0,1221 +/-	0,0318	0,1052 +/-	0,0218	0,1981 +/-	0,0429
Acide glutarique	0,0424 +/-	0,0132	0,0307 +/-	0,0074	0,0267 +/-	0,0109	0,0570 +/-	0,0081	0,0591 +/-	0,0093	0,0128 +/-	0,0000
Témoins												
Glycérol	0,0958 +/-	NA	0,0983 +/-	0,0321	0,1277 +/-	0,0105	0,0610 +/-	0,0193	0,0683 +/-	0,0071	0,0547 +/-	0,0155
Acide lactique	0,0595 +/-	NA	0,0701 +/-	0,0193	0,0641 +/-	0,0560	0,0532 +/-	0,0116	0,0434 +/-	0,0070	0,0282 +/-	0,0143
Glucose	1,7061 +/-	NA	1,0335 +/-	0,3702	0,7127 +/-	0,1249	2,4248 +/-	0,1803	1,9066 +/-	0,5194	2,0113 +/-	0,2176
Glucose	0,0491 +/-	NA	0,0273 +/-	0,0072	0,0149 +/-	0,0142	0,0633 +/-	0,0042	0,0425 +/-	0,0116	0,0398 +/-	0,0014
Acide 3,4-Dihydroxybenzoïque	0,0000 +/-	NA	0,0000 +/-	0,0000	0,0000 +/-	0,0000	0,0951 +/-	0,0074	0,0429 +/-	0,0205	0,0684 +/-	0,0153
Cholestérol	0,1249 +/-	NA	0,1658 +/-	0,0430	0,2148 +/-	0,0318	0,1903 +/-	0,1020	0,0850 +/-	0,0104	0,1263 +/-	0,0429
Acide glutarique	0,0444 +/-	NA	0,0289 +/-	0,0041	0,0262 +/-	0,0023	0,0693 +/-	0,0042	0,0284 +/-	0,0260	0,0000 +/-	0,0000

Apolaire acétone												
Echantillons	24h		48h		120h		144h		216h		240h	
Acide stéarique	0,0577	+/- 0,0128	0,1155	+/- 0,0273	0,2688	+/- 0,2878	0,1197	+/- 0,0747	0,0000	+/- 0,0000	0,0613	+/- 0,0094
Glucose	5,6640	+/- 2,2116	3,8399	+/- 1,1403	8,7256	+/- 3,8817	3,5874	+/- 0,7805	7,9177	+/- 0,2457	8,3281	+/- 4,0573
Glucose	2,1856	+/- 0,8360	1,6947	+/- 0,2043	4,0243	+/- 0,9861	1,7244	+/- 0,3424	4,3633	+/- 0,8557	3,6002	+/- 1,3178
Isoleucine	0,0836	+/- 0,0217	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000
Acide palmitique	0,0403	+/- 0,0073	0,0567	+/- 0,0492	0,4013	+/- 0,0983	0,1404	+/- 0,0391	0,1774	+/- 0,0345	0,2549	+/- 0,0871
Acide lactique	0,0283	+/- 0,0087	0,0269	+/- 0,0017	0,0281	+/- 0,0295	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0184
Acide oleique	0,1484	+/- 0,0740	0,0940	+/- 0,0027	0,1478	+/- 0,1315	0,0417	+/- 0,0414	0,0711	+/- 0,0031	0,0633	+/- 0,0576
Isoleucine	0,0836	+/- 0,0217	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000
Acide phosphorique	2,8483	+/- 0,6451	6,4124	+/- 2,7404	14,4724	+/- 7,8064	7,0242	+/- 3,1588	4,0042	+/- 0,1456	5,6779	+/- 0,5814
Témoins												
Acide stéarique	0,0814	+/- 0,0182	0,1201	+/- 0,0406	0,0000	+/- 0,0000	0,1148	+/- 0,0403	0,0000	+/- 0,0000	0,0683	+/- 0,0094
Glucose	10,0744	+/- 2,1257	3,5028	+/- 0,9463	10,2096	+/- 0,8174	3,9853	+/- 0,8153	7,4081	+/- 0,2798	6,5160	+/- 4,0573
Glucose	4,4760	+/- 1,0112	1,5322	+/- 0,5478	3,1551	+/- 0,2890	1,7101	+/- 0,1632	3,3906	+/- 0,2472	3,0507	+/- 1,3178
Isoleucine	0,0000	+/- 0,0000	0,0869	+/- 0,0891	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000
Acide palmitique	0,0818	+/- 0,0304	0,0838	+/- 0,0471	0,2766	+/- 0,2408	0,1740	+/- 0,0403	0,0952	+/- 0,0842	0,1972	+/- 0,0871
Acide lactique	0,0321	+/- 0,0000	0,0075	+/- 0,0130	0,0000	+/- 0,0000	0,0091	+/- 0,0079	0,0338	+/- 0,0077	0,0473	+/- 0,0184
Acide oleique	0,1806	+/- 0,0313	0,0470	+/- 0,0487	0,0000	+/- 0,0000	0,0577	+/- 0,0312	0,0806	+/- 0,0057	0,0857	+/- 0,0576
Isoleucine	0,0000	+/- 0,0000	0,0869	+/- 0,0891	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000	0,0000	+/- 0,0000
Acide phosphorique	5,4250	+/- 2,5106	3,4024	+/- 1,9596	27,8155	+/- 3,8253	6,6395	+/- 2,0419	3,2265	+/- 2,7955	7,0725	+/- 0,5814

Tableau 83. Données d'intensité relatives dans les échantillons sains (témoins) et altérés au cours de l'altération par la souche *B. weihenstephanensis* (type2) pour chaque marqueur d'altération identifié dans les différentes fractions.

- Profilage métabolique

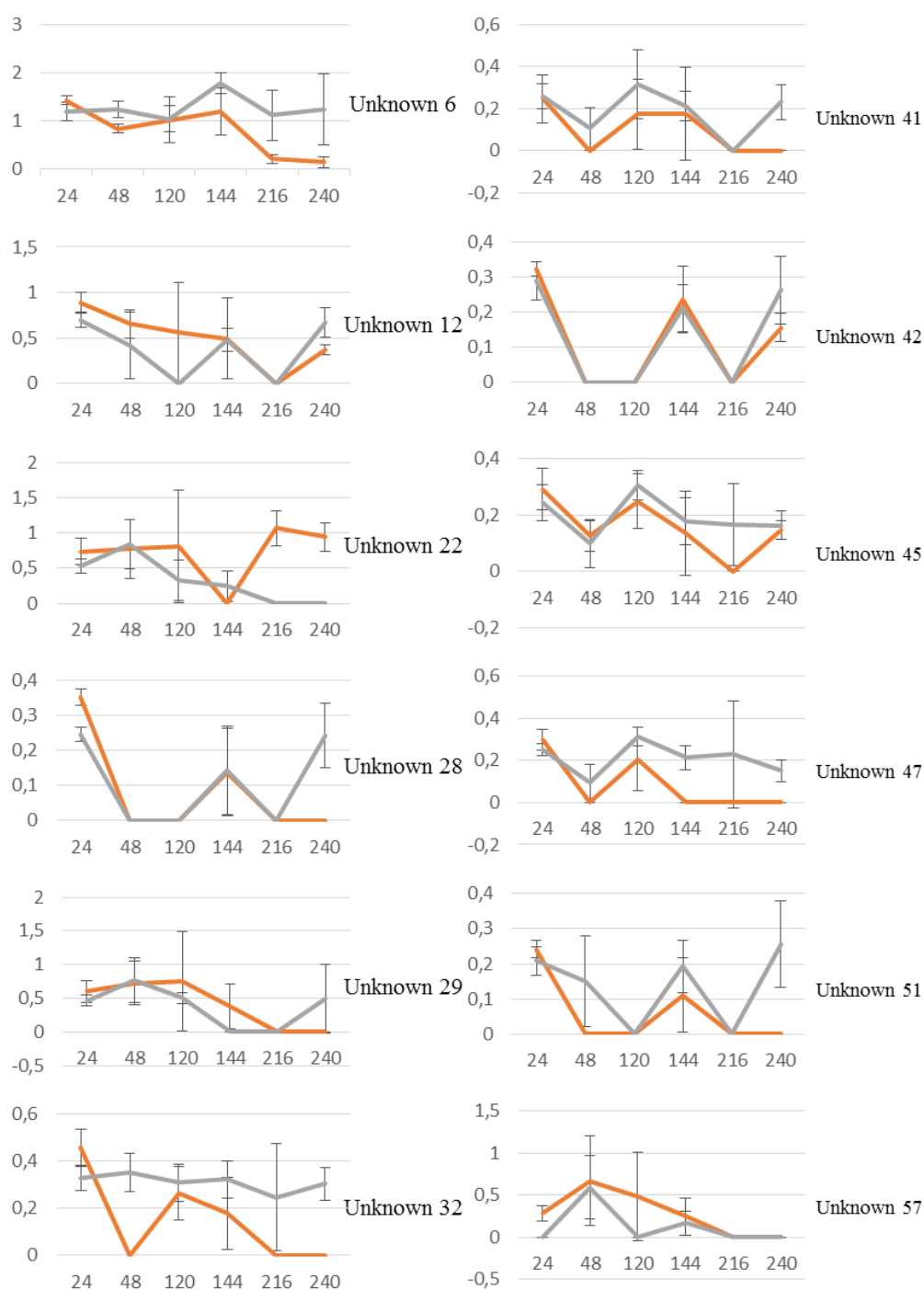
Pour l'analyse ciblée, les composés pour lesquels des gammes de calibrations étaient disponibles, ont été analysés de manière quantitative. L'évolution de la concentration de ces composés est présentée dans le Tableau 84.

Tableau 84. Evolution de la concentration des composés quantifiables dans les différentes fractions des échantillons altérés et témoins analysés à chaque temps d'analyse dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*. Certains composés notés « Hors gamme » présentaient des intensités trop importantes pour être quantifiés, d'autres notés NQ présentaient des intensités trop faibles pour être quantifiés (hors de la gamme de calibration).

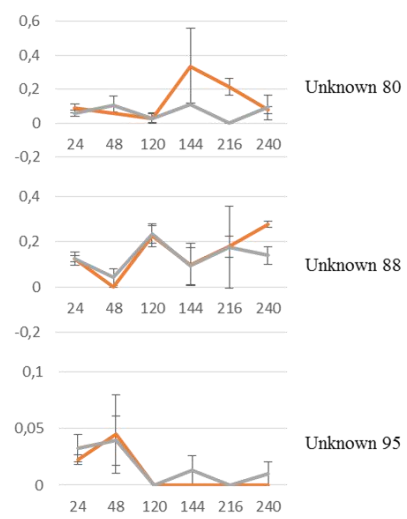
Composés (concentration en g.l ⁻¹)	24h			48h			120h			144h			216			240		
Echantillons																		
Polaire éthanol																		
Glucopyranose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Glucopyranose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Acide lactique	0,0887	+/-	0,0074	0,0811	+/-	0,0272	0,1471	+/-	0,0613	0,2743	+/-	0,0105	Hors gamme			Hors gamme		
Alanine	0,1404	+/-	0,0129	0,1336	+/-	0,0221	0,2120	+/-	0,0284	0,1631	+/-	0,0384	0,1724	+/-	0,0104	0,2678	+/-	0,0336
Fructose	0,1218	+/-	0,0318	0,0970	+/-	0,0159	0,0000			0,0685	+/-	0,0599	0			0		
Tyrosine	0,1120	+/-	0,0072	0,0000			0,0793	+/-	0,0702	0,0883	+/-	0,0789	0			0,1537	+/-	0,0232
Polaire acétone																		
L-leucine	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Valine	0,33	+/-	0,01	0,29	+/-	0,05	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Acide lactique	0,10	+/-	0,01	0,08	+/-	0,01	0,14	+/-	0,06	0,39		0,07	Hors gamme			Hors gamme		
Isoleucine	0,27	+/-	0,02	0,23	+/-	0,03	0,24	+/-	0,04	0,29		0,03	0,30	+/-	0,06	Hors gamme		
Alanine	0,21	+/-	0,01	0,17	+/-	0,01	0,17	+/-	0,03	0,20		0,01	0,20	+/-	0,03	0,18	+/-	0,07
Tyrosine	0,19	+/-	0,01	0,18	+/-	0,01	0,21	+/-	0,01	0,20		0,01	0,23	+/-	0,02	0,15	+/-	0,13
Apolaire éthanol																		
Glucopyranose	Hors gamme			0,52		0,18	Hors gamme			Hors gamme			0,36	+/-	0,12	0,22	+/-	0,13
Acide lactique	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			0,00		
Apolaire acétone																		
Glucopyranose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
α-D-Glucopyranose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Acide lactique	NQ			NQ			NQ			NQ			NQ			NQ		
Isoleucine	NQ			NQ			NQ			0,00			0,00			0,00		
Témoins																		
Polaire éthanol																		
Glucopyranose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Glucopyranose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Acide lactique	0,09	+/-	0,01	0,07	+/-	0,02	0,08	+/-	0,01	0,07	+/-	0,01	0,02	+/-	0,04	0,10	+/-	0,03
Alanine	0,16	+/-	0,02	0,11	+/-	0,00	0,21	+/-	0,02	0,15	+/-	0,02	0,17	+/-	0,01	0,14	+/-	0,03
Fructose	0,10	+/-	0,04	0,14	+/-	0,03	0,00	+/-	0,00	0,10	+/-	0,01	0,00	+/-	0,00	0,12	+/-	0,04
Tyrosine	0,12	+/-	0,01	0,00			0,09	+/-	0,07	0,11	+/-	0,01	0,00	+/-	0,00	0,13	+/-	0,02
Polaire acétone																		
L-leucine	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Valine	0,36	+/-	0,01	0,32	+/-	0,04	0,33	+/-	0,03	0,30	+/-	0,06	0,26	+/-	0,04	0,18	+/-	0,07
Acide lactique	0,10	+/-	0,02	0,09	+/-	0,02	0,06	+/-	0,01	0,09	+/-	0,00	0,01	+/-	0,01	0,04	+/-	0,02
Isoleucine	0,29	+/-	0,04	0,28	+/-	0,08	0,29	+/-	0,04	0,22	+/-	0,02	0,23	+/-	0,02	0,15	+/-	0,08
Alanine	0,20	+/-	0,01	0,20	+/-	0,01	0,17	+/-	0,03	0,19	+/-	0,02	0,13	+/-	0,02	0,13	+/-	0,04
Tyrosine	0,19	+/-	0,03	0,19	+/-	0,00	0,21	+/-	0,02	0,20	+/-	0,04	0,21	+/-	0,02	0,15	+/-	0,04
Apolaire éthanol																		
Glucopyranose	Hors gamme			0,25	+/-	0,10	0,17	+/-	0,03	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Acide lactique	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Apolaire acétone																		
Glucopyranose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
α-D-Glucopyranose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Acide lactique	NQ			NQ			NQ			NQ			NQ			NQ		
Isoleucine	NQ			0,00			0,00			0,00			0,00			0,00		

Annexe X. Courbes d'intensité des signaux sélectionnés non identifiés dans chacune des fractions aux différents temps d'analyses pour les échantillons (en orange) et les témoins (en gris) pour l'étude de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*

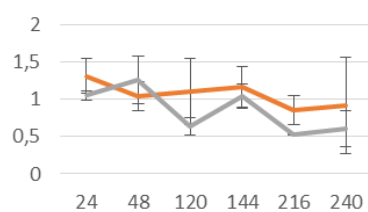
Polaire éthanol



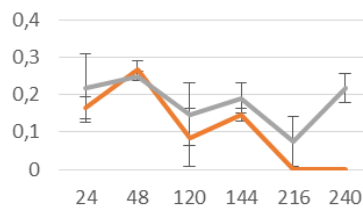
Polaire éthanol



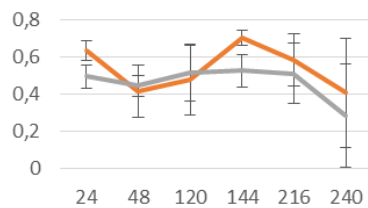
Polaire acétone



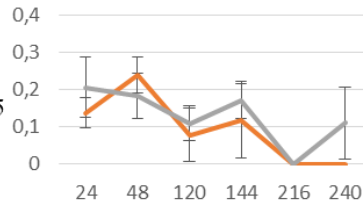
Unknown 8



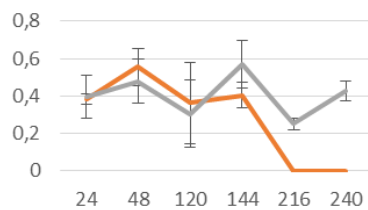
Unknown 39



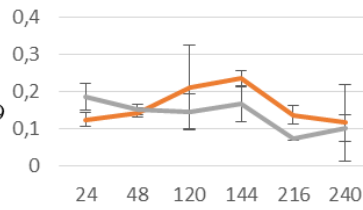
Unknown 15



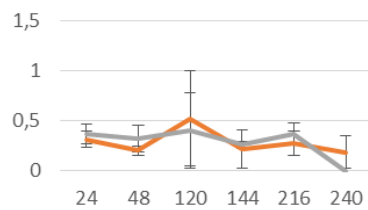
Unknown 45



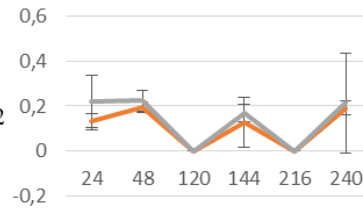
Unknown 19



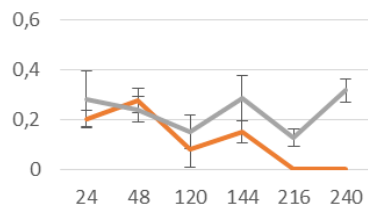
Unknown 46



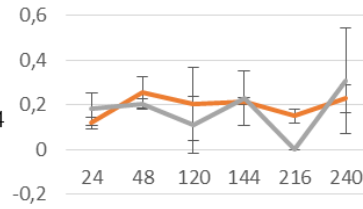
Unknown 22



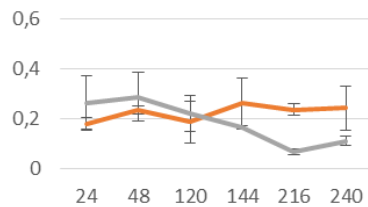
Unknown 47



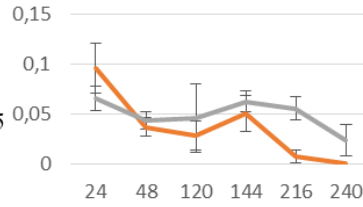
Unknown 34



Unknown 51

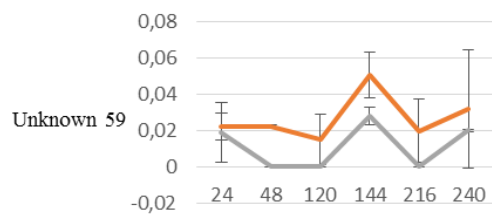
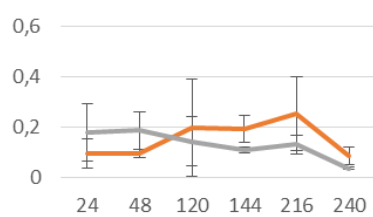


Unknown 35

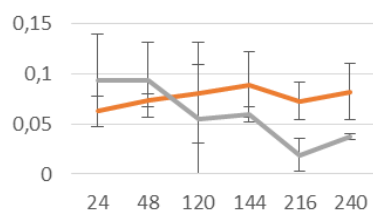


Unknown 52

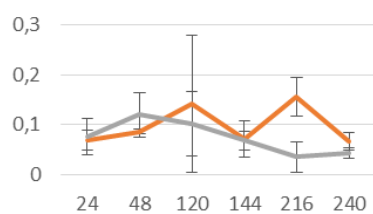
Polaire acétone



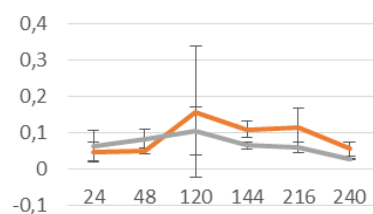
Unknown
88



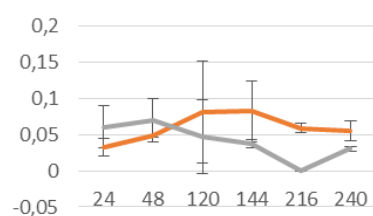
Unknown 64



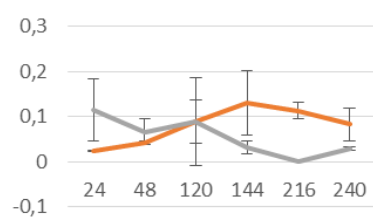
Unknown 65



Unknown 72

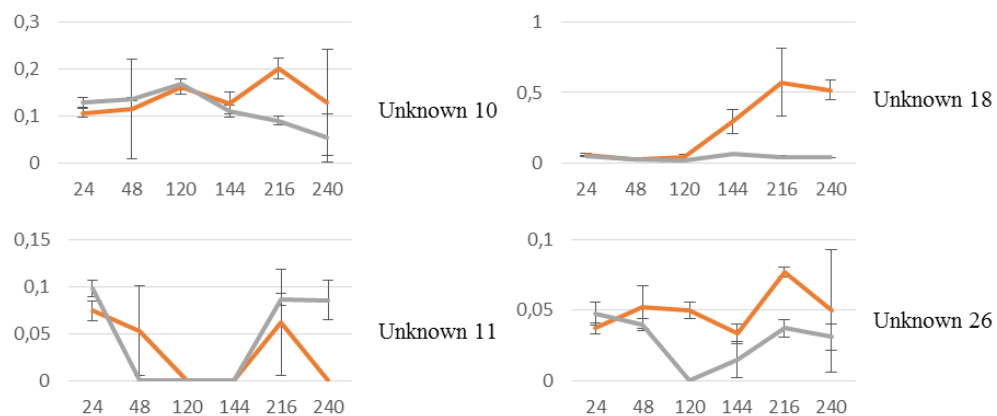


Unknown 76

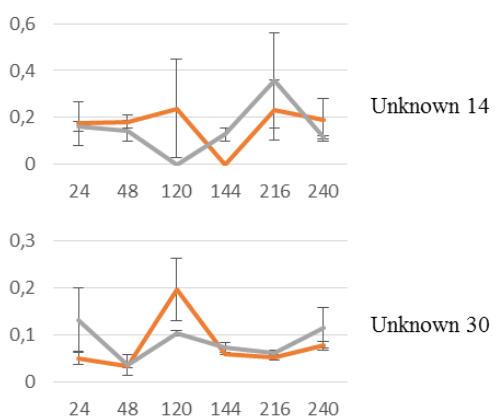


Unknown 79

Apolaire éthanol



Apolaire acétone



Annexe Y. Planning de lancement et journée type d'analyse pour l'étude de l'altération avec la souche E.faecium

- *Planning de lancement*

Le lancement de l'étude cinétique de la dégradation suit le même planning que celui présenté dans la partie 3.1 avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*.

- *Planning de prélèvement*

Les prélèvements sont effectués de manière quotidienne à partir de 9h. Un échantillon ensemencé (échantillon) et un échantillon non ensemencé (témoin) sont prélevés. Les échantillons sont ensuite homogénéisés au vortex pour la suite de l'analyse. Un schéma récapitulatif d'une journée d'analyse type est présenté dans la Figure 141 (A et B). Les journées de profilage par GC-MS (Figure 141 - A) et par GC-MS et RMN (Figure 141 - B) pour les temps d'analyses 120h, 216h, 312h et 384h sont présentées. L'étape de filtration, employée pour distinguer l'endo de l'exo-métabolome, est présentée en pointillés en début de journée d'analyse par GC-MS, et est réalisée sur des échantillons supplémentaires pour les temps d'analyse 240h et 456h (stades avancé et très avancé de la cinétique d'altération). Ces échantillons sont traités en parallèle des échantillons non filtrés pour l'analyse par GC-MS.

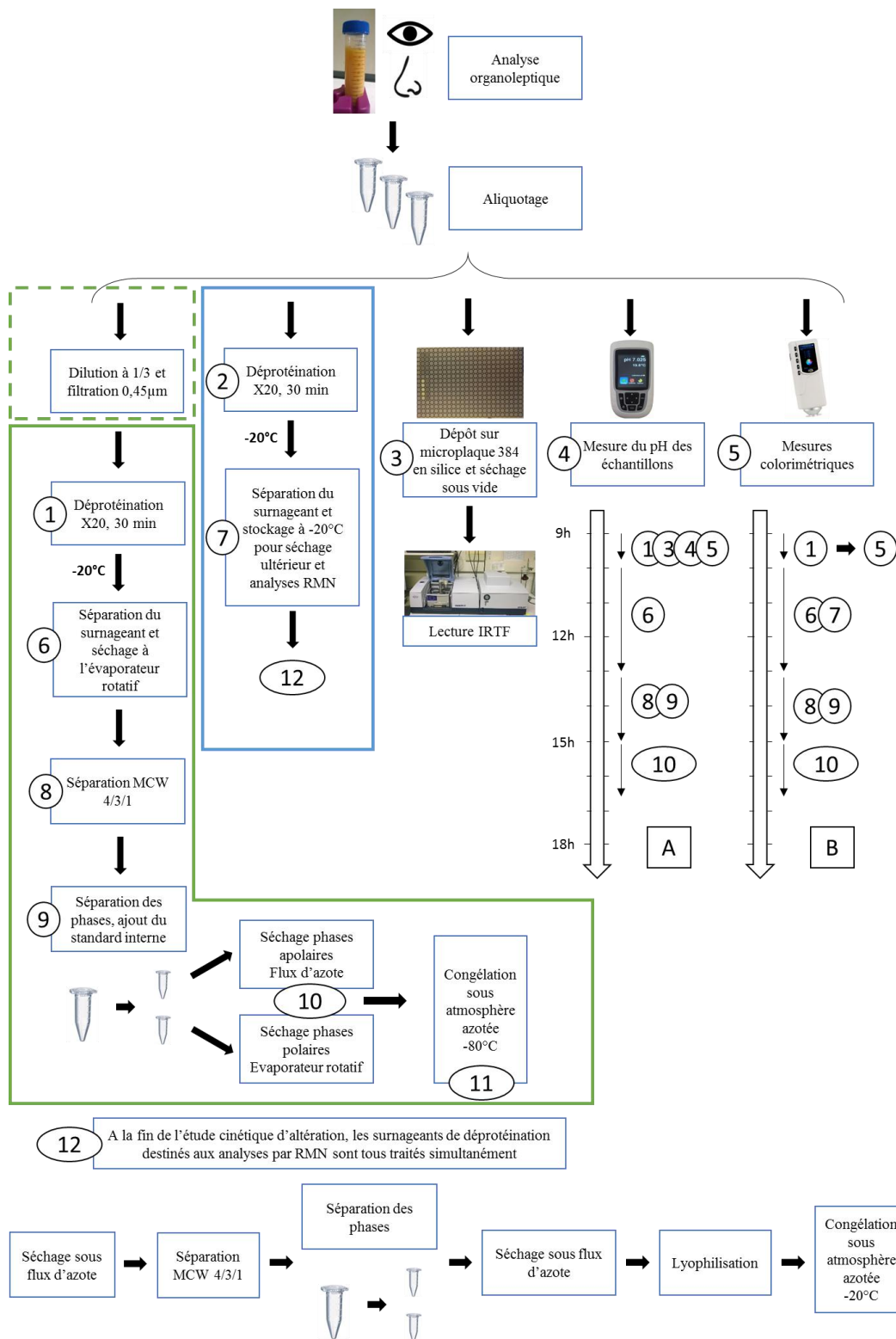


Figure 141. Schéma d'une journée type d'analyse pour l'étude de l'altération avec la souche *Enterococcus faecium*.

Annexe Z. Résultats de l'analyse par colorimétrie pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*

Les données présentant, comme pour les analyses de pH, des variations d'ordonnée à l'origine potentiellement dues à une différence de la matière première ou à une différence de calibration des instruments et des procédures de mesure, ont donc été centrées. La valeur de chaque composante à 48h a été fixée comme identique à celle du témoin du laboratoire GEPEA à t = 48h (premier point en commun entre les partenaires ne présentant pas de valeurs aberrantes) pour l'ensemble des distributions. La correction appliquée a été reproduite pour l'ensemble des temps d'analyse. Les valeurs de correction appliquées à chacune des distributions sont présentées dans le Tableau 85.

Tableau 85. Valeur de correction appliquée aux mesures de colorimétrie pour chaque distribution pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche *E. faecium*

	Moy Témoin STLO	Moyenne STLO	Moyenne ADRIA	Moy Témoin GEPEA	Moyenne GEPEA
L	Valeur à t = 48h	57,33	58,31	65,33	68,15
	Différence à soustraire	-10,83	-9,84	-2,82	0,00
a	Valeur à t = 48h	0,67	0,59	11,90	15,91
	Différence à soustraire	-15,24	-15,32	-4,02	0,00
b	Valeur à t = 48h	31,81	32,44	28,46	36,79
	Différence à soustraire	-4,98	-4,35	-8,33	0,00

La Figure 142 présente les résultats de colorimétrie centrés par composantes obtenues à chaque temps d'analyse pour les différents partenaires.

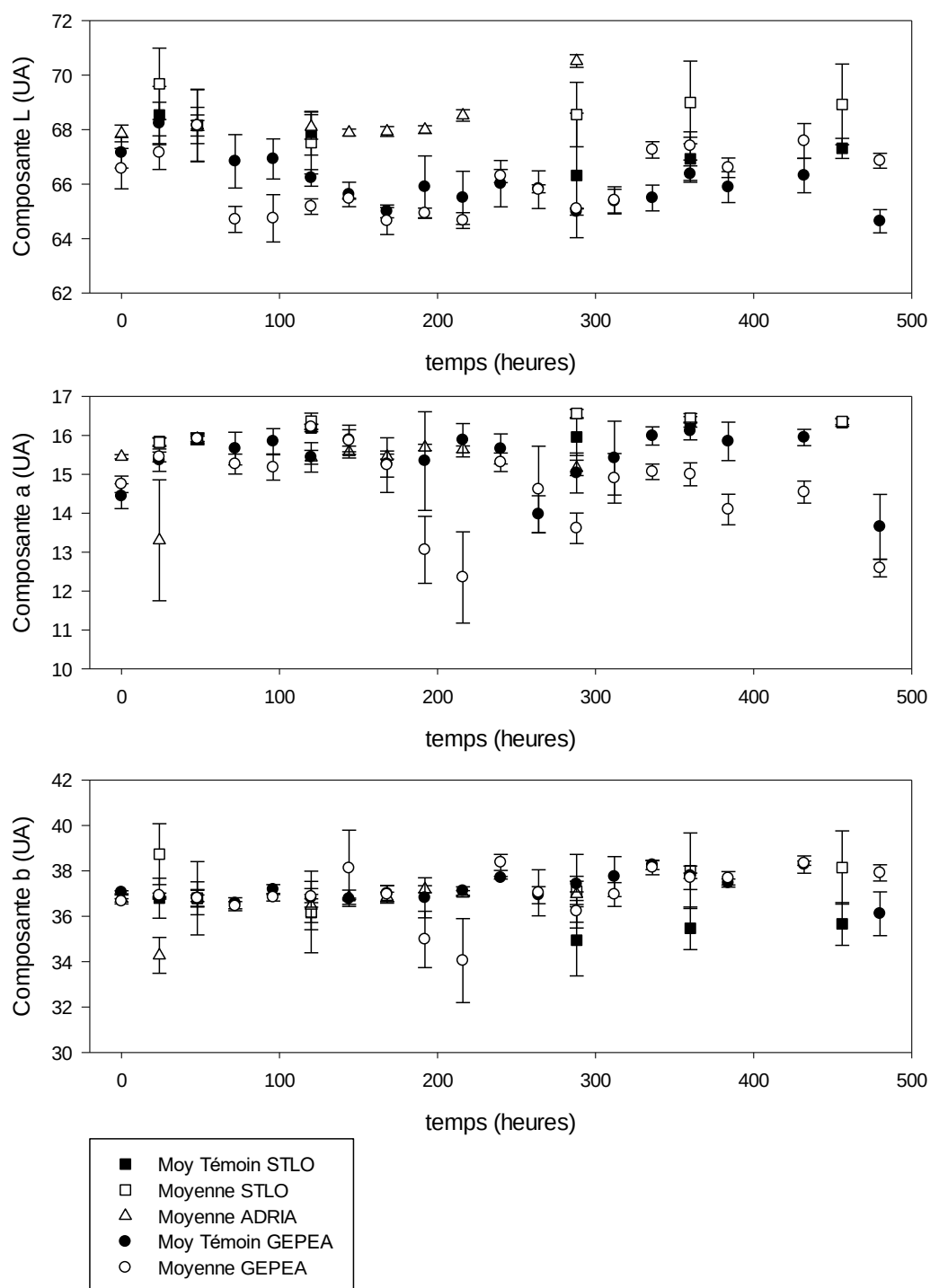


Figure 142. Résultats de colorimétrie (centrés) par composante L, a et b à chaque temps d'analyse pour les différents partenaires pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche *E. faecium*

La composante L présente une tendance à l'augmentation pour la société ADRIA et le laboratoire STLO. Une différence significative est détectée à partir du temps 144h pour la société ADRIA et rien n'est observé pour le laboratoire STLO, probablement en raison de la variabilité importante des mesures. Il apparaît toutefois que ces valeurs augmentent pour les échantillons à partir du temps d'analyse 288h. Une différence significative est détectable entre les échantillons et les

témoins du laboratoire GEPEA aux temps d'analyse 72h, 96h et 120h (les échantillons présentent des valeurs inférieures aux témoins) et aux temps d'analyse situés entre 336h et 380h (échantillons supérieurs aux témoins). La variation positive des échantillons n'est cependant significative que pour les temps d'analyses 336h et 380h. Les témoins présentent des variations non négligeables au cours de la cinétique. La composante a ne présente pas de variation significative pour les échantillons de la société ADRIA au cours de la cinétique d'altération. La distribution correspondant aux échantillons du laboratoire STLO présente des variations non significatives avec une légère tendance à l'augmentation. La distribution correspondant aux échantillons du laboratoire GEPEA présente une tendance à la diminution. Cette diminution des valeurs pour les échantillons par rapport au témoin est significative pour la majorité des points d'analyse sans présenter d'aspect monotone. Les témoins présentent des différences d'intensité significatives au cours de la cinétique d'altération, rendant difficile l'interprétation de ces résultats. La composante b ne présente pas de variation significative pour les données de la société ADRIA et du laboratoire STLO. Des variations, parfois significatives et suivant un profil non monotone sont observables pour les échantillons du laboratoire GEPEA. Les témoins présentent une variation significative au cours de la cinétique rendant, comme pour la composante a, l'interprétation de ces données difficiles.

Pour les analyses effectuées au laboratoire GEPEA, les variations d'intensité des composantes L et b enregistrées entre les échantillons et les témoins sont toutes inférieures au seuil de significativité fixé au cours des développements méthodologiques (équivalent à deux fois la variabilité interne moyenne mesurée, voir chapitre 3 - Colorimétrie en référentiel CIE lab). Seules les variations correspondant à la diminution des valeurs pour la composante a dans les échantillons par rapport aux témoins à différents temps d'analyses de la cinétique dépassent le seuil de significativité fixé (de 12%, 10% et 20% pour les composantes L, a et b).

Pour conclure, on observe que les mesures des composantes a et b ne présentent pas de variations clairement identifiables au cours de l'altération de type 1, même si une tendance à l'augmentation semble se dessiner dans les résultats des échantillons pour la composante L. La colorimétrie est ici, comme constaté dans le cadre de l'altération avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*, au moins dans les conditions utilisées au laboratoire GEPEA, un outil moins robuste que la mesure du pH pour le suivi macroscopique de l'altération des EL.

Annexe AA. Résultats des analyses par FTIR pour l'étude de l'altération avec la souche E.faecium

Comme précédemment, les résultats ont été analysés après une étape de correction de ligne de base réalisée directement dans le logiciel OPUS 7 utilisé pour l'enregistrement des données. Les données des différents temps d'analyse présentant un faible contraste, une comparaison des signaux moyens enregistrés en début et en fin de cinétique a été effectuée pour confirmer le potentiel de discrimination des échantillons de cette technique. La Figure 143 présente le résultat de cette comparaison ; la p-value d'un t-test est également présentée pour chacun des points d'analyse (nombres d'onde).

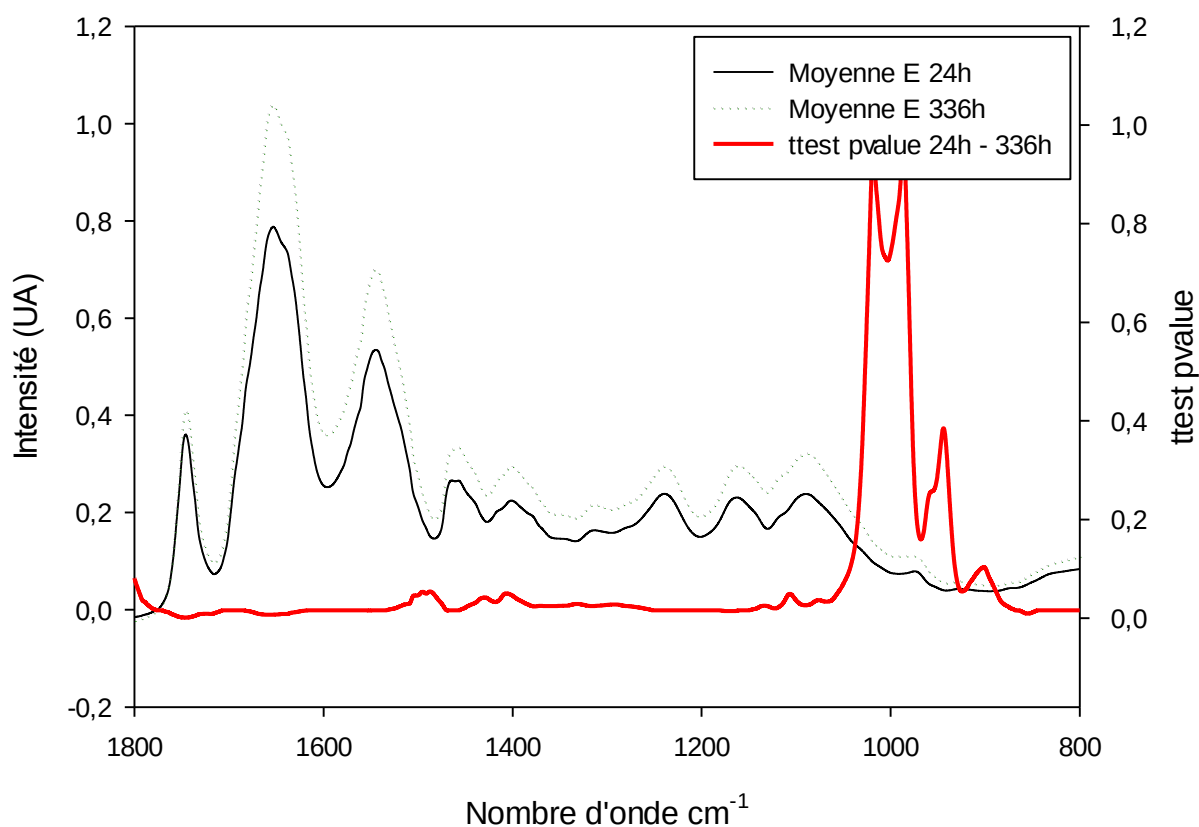


Figure 143. Spectres IRTF moyennés sur 10 répliques correspondant à des échantillons issus de l'étude cinétique de l'altération des EL. La ligne continue correspond au premier jour d'analyse (24h d'incubation) et la ligne discontinue au temps d'analyse 336h (axe de gauche). La ligne rouge correspond à la valeur de p-value d'un t-test réalisé sur les valeurs moyennes de chaque vibrateur (axe de droite). Seule la zone d'intérêt (800-1800cm⁻¹) est représentée.

Les scores de p-value du t-test permettent de visualiser les zones spectrales où les spectres présentent les différences les plus importantes. Une diminution de la p-value signifiant une différence plus importante entre les deux spectres moyennés, contrairement au suivi par FTIR de l'altération de type 2, les valeurs de p-value passent sous le seuil des 0,05 pour la majeure partie de la zone

d'analyse. Les spectres sont donc significativement différents. Cependant on observe clairement sur ces échantillons fortement contrastés (début et fin d'altération) que la différence de profil est très faible. Seules des variations globales d'intensité sont observables. Comme précédemment cette analyse a été complétée par l'analyse des scores de corrélation entre les spectres enregistrés, le résultat de ce test pour chaque nombre d'onde est présenté sous forme de boîtes à moustaches dans la Figure 144.

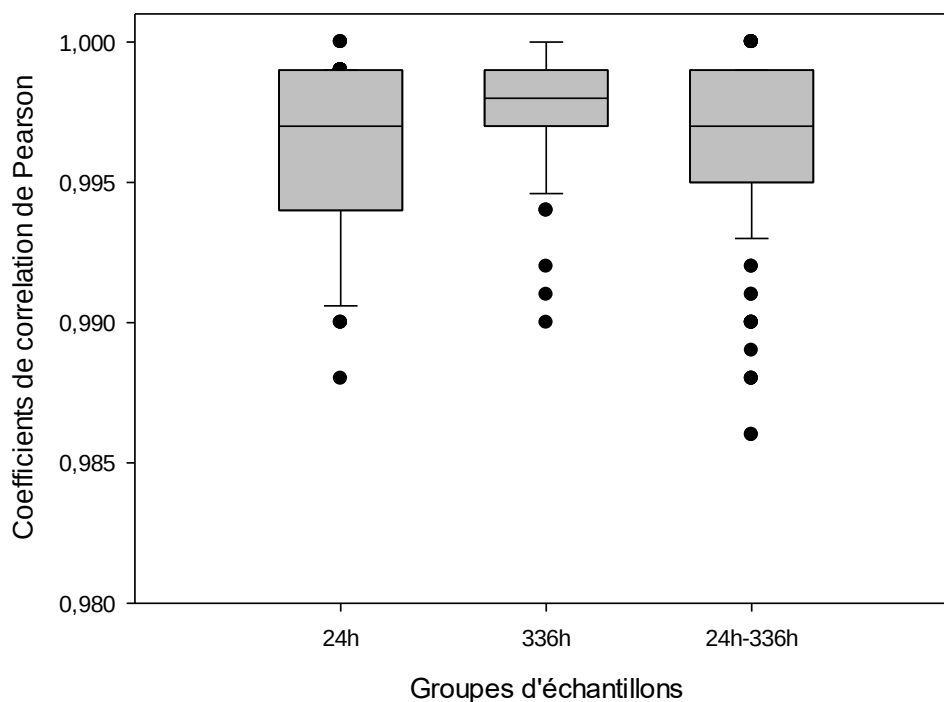


Figure 144. Distribution des scores de corrélation calculés sur les données spectrales correspondant à l'analyse par IRTF d'échantillons issus de l'étude cinétique de l'altération des EL avec la souche *E. faecium*, le premier groupe correspond au temps d'analyse 24h, le deuxième groupe au temps d'analyse 336h, le dernier groupe correspond à l'ensemble des échantillons contenus dans les deux premiers groupes.

Les scores de corrélation de Pearson enregistrés sont très élevés (supérieurs à 0,985, avec une médiane au-dessus de 0,995). Ces valeurs, proches des valeurs enregistrées lors de l'étude la variabilité interne de la matrice (score médian de 0,998), montrent la similarité entre les spectres des différents échantillons. Il apparaît clairement qu'aucune différence significative n'est détectable entre les échantillons de début et de fin d'altération dans les résultats d'analyses par FTIR. Ces observations permettent de conclure comme précédemment pour l'étude de l'altération de type 2, que la spectrométrie IRTF telle qu'employée dans le cadre de cette étude ne permet pas de refléter l'état d'altération des EL au cours du temps, ni d'expliquer les phénomènes d'altération constatés au niveau macroscopique.

Annexe BB. Analyse des échantillons seuls aux six premiers temps d'analyse pour l'étude de l'altération avec la souche E.faecium

La représentation des résultats sous forme d'analyse en composante principale a été employée pour permettre une première visualisation de la séparation des différentes conditions analysée (témoins / échantillons, temps d'analyse). Les résultats de cette analyse pour la fraction polaire éthanol sont présentés ici à titre d'exemple. Les résultats pour les autres fractions (polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone) sont succinctement présentés dans la suite de cette annexe.

- *Filtration des répliques aberrants*

Dans le but d'affiner l'analyse, la détection des échantillons aberrants a été réalisée, comme pour l'étude cinétique de l'altération de type 2, visuellement sur les données à l'aide des résultats d'ACP ainsi qu'à l'aide du module « Quality metrics » de la plateforme W4M. Les échantillons présentant un score de Hotelling p-value inférieur à 0,05 (limite fixée empiriquement pour l'élimination des répliques aberrants identifiés visuellement) ont été éliminés. La liste par fraction des répliques éliminées pour les données correspondant aux échantillons et aux témoins pour les six premiers temps d'analyse (24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h) de la cinétique est présentée dans le Tableau 86.

Tableau 86. Liste des répliques aberrants par fraction pour l'analyse des données correspondant aux groupes contenant à la fois les échantillons et les témoins pour les six premiers temps d'analyse (24h, 48h, 120h, 144h, 216h et 240h) dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*

Pol Eth	Pol Ace	Apo Eth	Apo Ace
T_144_1	E_144_3	E_144_2	E_144_2
T_144_2		E_144_3	E_144_3
T_144_3		T_120_2	
		T_120_3	
		T_144_1	
		T_144_2	
		T_144_3	

A l'exception des répliques T_120_2 et T_120_3 correspondant aux témoins du point d'analyse 120h, l'ensemble des échantillons identifiés comme aberrants correspondent au temps d'analyse 144h. Une erreur de manipulation au cours de cette analyse est probablement à l'origine de cette quantité inhabituelle de répliques présentant des comportements extrêmes.

- *Visualisation des résultats*

La Figure 145 présente les résultats des ACP réalisées sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls et des témoins seuls au temps d'analyse 0h à 144h. Les

données sont soumises à une transformation log puis une mise à l'échelle de Pareto (centrées sur la moyenne et divisées par l'écart type de chaque variable).

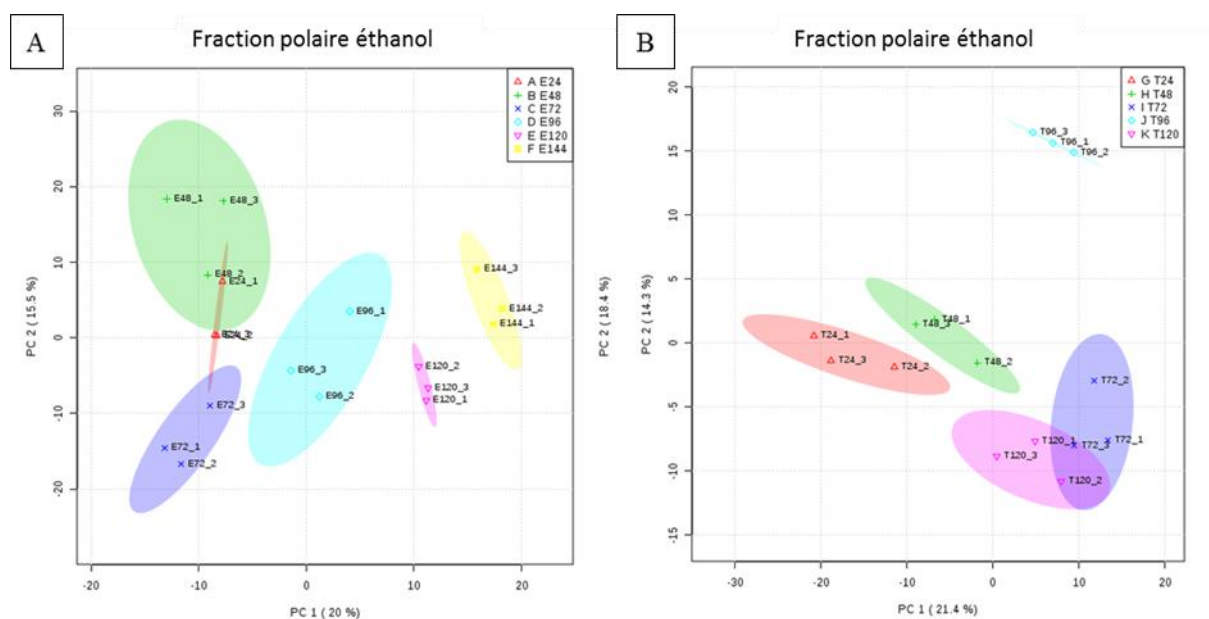


Figure 145. Résultats des ACP effectuées sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls (A) et des témoins seuls (B).

On constate sur la figure A que les empreintes métaboliques des échantillons présentent un contraste significatif. Une ligne temporelle se dessine suivant la première composante (représentant 20% de la variance mesurée). La figure B met en évidence une différence significative entre les empreintes des témoins, cependant aucune ligne temporelle n'apparaît clairement pour les données des témoins. L'analyse détaillée des échantillons seuls permettra d'affiner l'analyse du contraste détecté entre ces différents temps d'analyse.

- Analyse détaillée des échantillons seuls pour le jeu de données

0h – 144h

Pour chaque fraction, les résultats d'ACP, de PLS-DA, de classification hiérarchique ascendante et de carte de chaleur correspondant à l'analyse des échantillons altérés seuls aux temps d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h ont été étudiés. Ceux de la fraction polaire éthanol sont présentés ici à titre d'exemple, les résultats des autres fractions sont succinctement présentés dans la suite de cette annexe.

L'objectif de cette analyse est d'évaluer la possibilité de regrouper les temps d'analyse 24h et 48h, 72h et 96h et 120h et 144h sous les appellations « début » « milieu » et « fin » correspondant au début, au milieu et à la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour ce premier jeu de données. Ces regroupements pourraient permettre, comme dans le cadre de l'étude de l'altération de type 2 de

multiplier le nombre de réplicas dans les analyses pour ainsi mieux identifier les cinétiques de variation des composés détectés précocement au cours de l'altération.

La Figure 146 présente les résultats d'ACP et de PLS-DA pour la fraction polaire éthanol aux temps d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

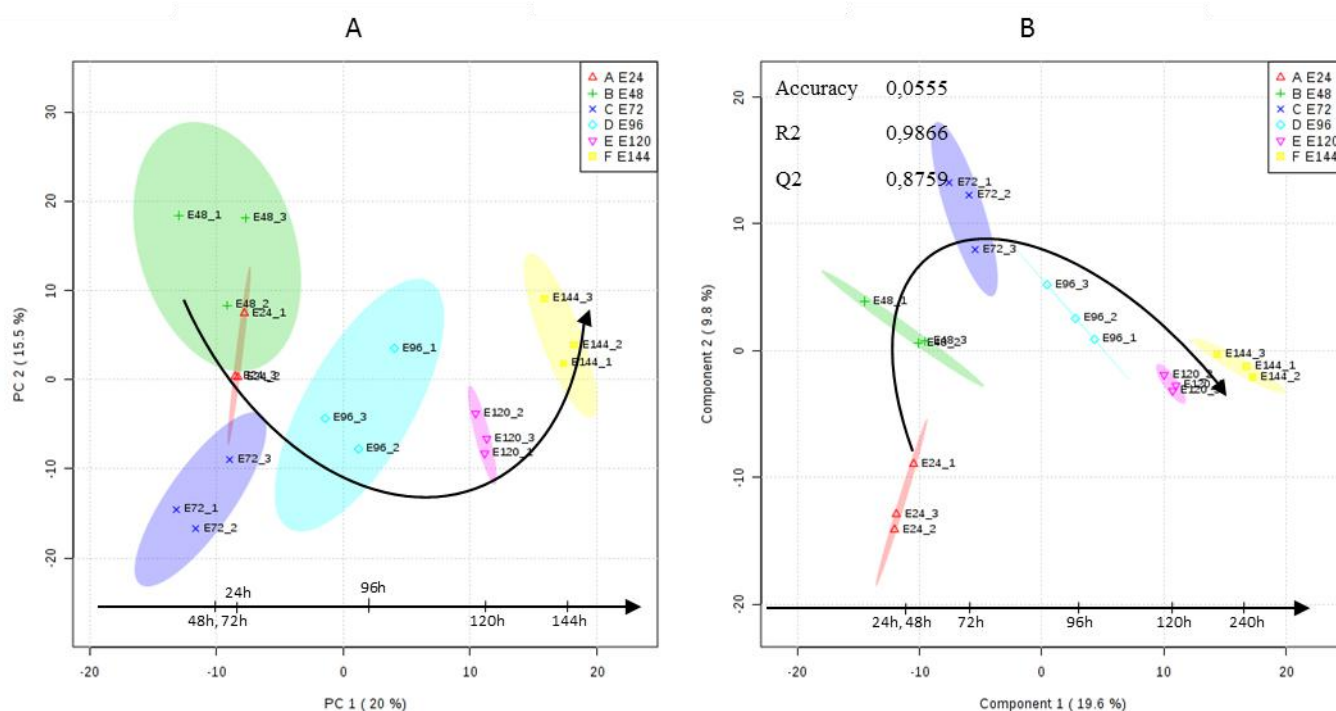


Figure 146. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

Les groupes d'échantillons sont relativement bien séparés par l'ACP malgré un recouvrement au niveau des temps d'analyses 24h et 48h. Un effet cinétique se dessine clairement sur les deux composantes. La PLS-DA permet d'améliorer la séparation des signatures métaboliques et d'identifier un effet cinétique encore plus clair. Les scores de validation R2 et Q2 obtenus (0,9866 et 0,8759) indiquent une très bonne qualité des modèles de prédiction employés pour cette analyse. Les résultats ont également été soumis à une classification ascendante hiérarchique. La Figure 147 présente les résultats de cette analyse pour la fraction polaire éthanol aux temps d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

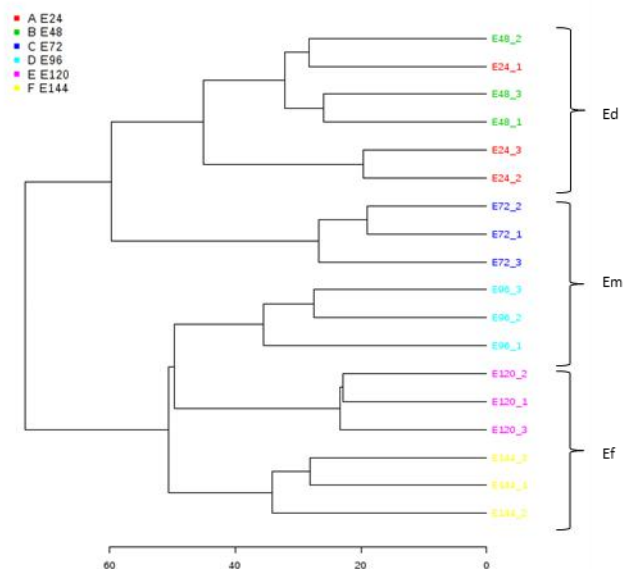


Figure 147. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (distance euclidienne-Ward) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. Les temps d'analyse regroupés « début » « milieu » et « fin » sont signalés par les accolades de droite (Ed, Em, et Ef).

La bonne classification des échantillons confirme les observations réalisées sur les résultats d'ACP. Les échantillons sont correctement séparés en fonction de leur profil chimique. Le seul recouvrement identifié concerne les échantillons des points d'analyse 24h et 48h. Les observations précédentes ont permis de mettre en évidence le contraste entre les échantillons aux différents points d'analyses. L'analyse des cartes de chaleur nous a permis de confirmer l'existence de signaux ou de groupes de signaux caractéristiques de chacun des groupes d'échantillons. La Figure 148 présente la carte de chaleur obtenue pour la fraction polaire éthanol. Les algorithmes utilisés sont paramétrés avec un calcul utilisant les distances euclidiennes et un critère d'agrégation de Ward pour le regroupement ou « clustering ». Seuls les 50 premiers composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont représentés.

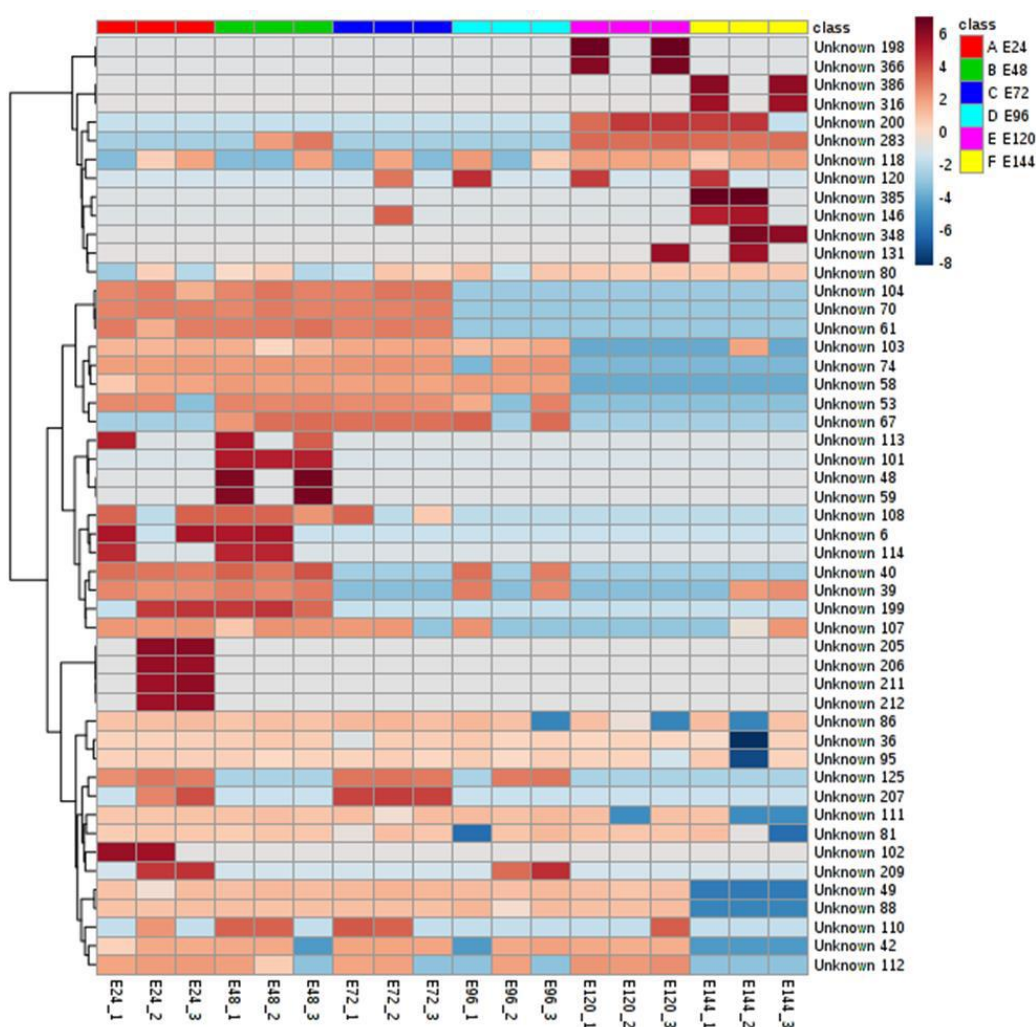


Figure 148. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.

Cette analyse permet de confirmer la présence de groupes de composés (dendrogrammes situées sur le bord gauche de la figure) qui peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels de l'altération.

Les autres fractions étudiées et présentées dans la suite de cette annexe montrent des résultats moins contrastés que ceux de la fraction polaire éthanol présentée ici. On notera que l'analyse par PLS-DA permet pour l'ensemble des fractions de distinguer clairement une ligne temporelle selon une ou deux composantes, malgré des recouvrements importants constatés dans les résultats d'ACP et de classification hiérarchique ascendante. La dispersion des répliques selon les PLS-DA apparaît propice au regroupement des points d'analyse 24 et 48h, 72 et 96h et 120 et 144h dans l'ensemble des fractions. Pour l'ensemble de ces fractions, l'analyse des cartes de chaleur permet la détection de composés ou groupes de composés dont l'intensité est caractéristique des différents groupes d'échantillon.

Pour conclure, l'analyse indépendante des différents temps confirme bien l'existence de composés ou de groupes de composés caractéristiques des différents groupes d'échantillons et donc des différents temps d'altération. Les observations effectuées confirment également la pertinence du regroupement des points 24h et 48h, 120h et 144h et 216h et 240h pour la suite des analyses.

- *Visualisation des résultats (ACP) pour les échantillons seuls et les témoins seuls aux temps d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h pour l'étude cinétique de l'altération avec la souche E. faecium.*

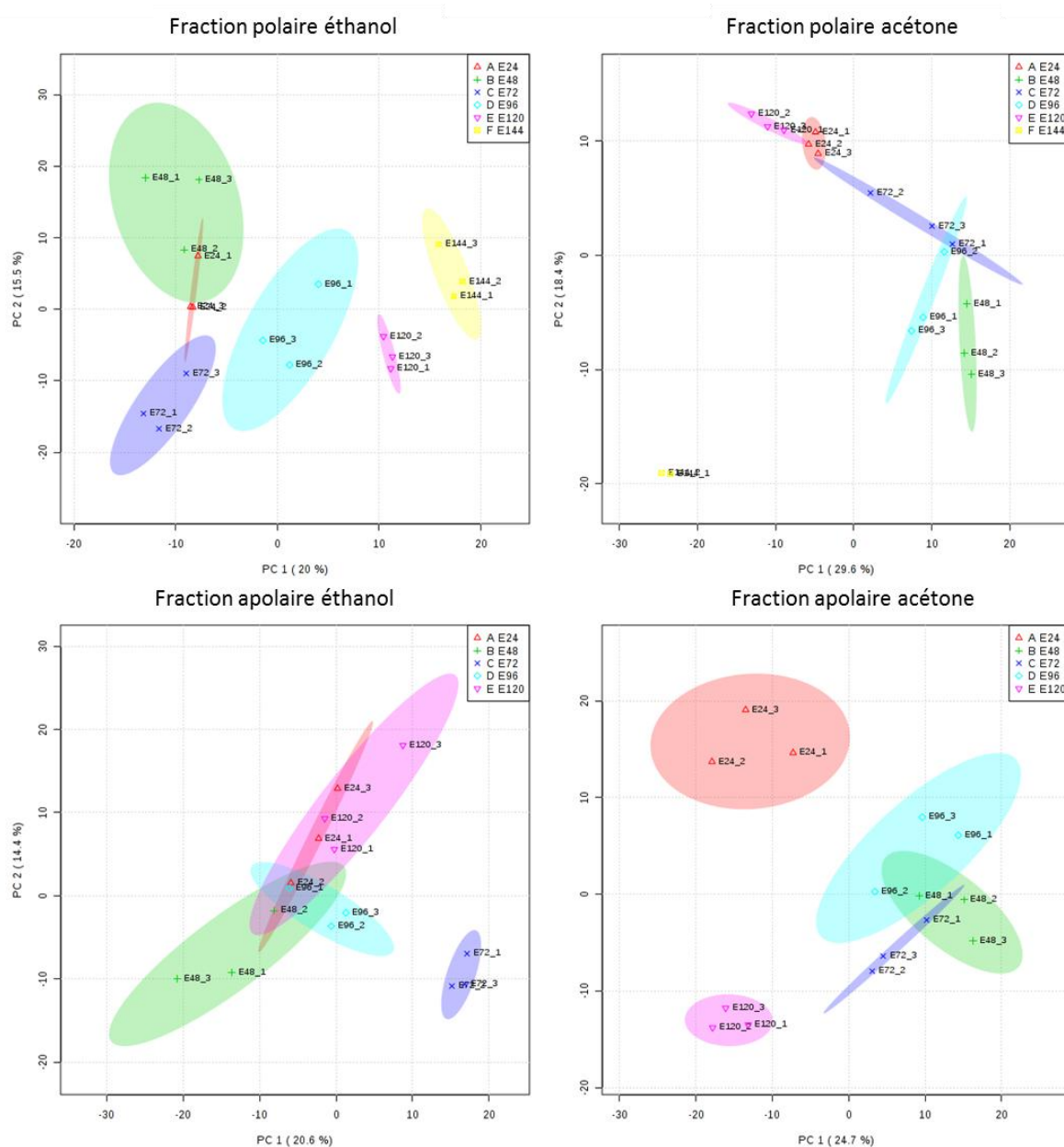


Figure 149. Résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse des échantillons seuls

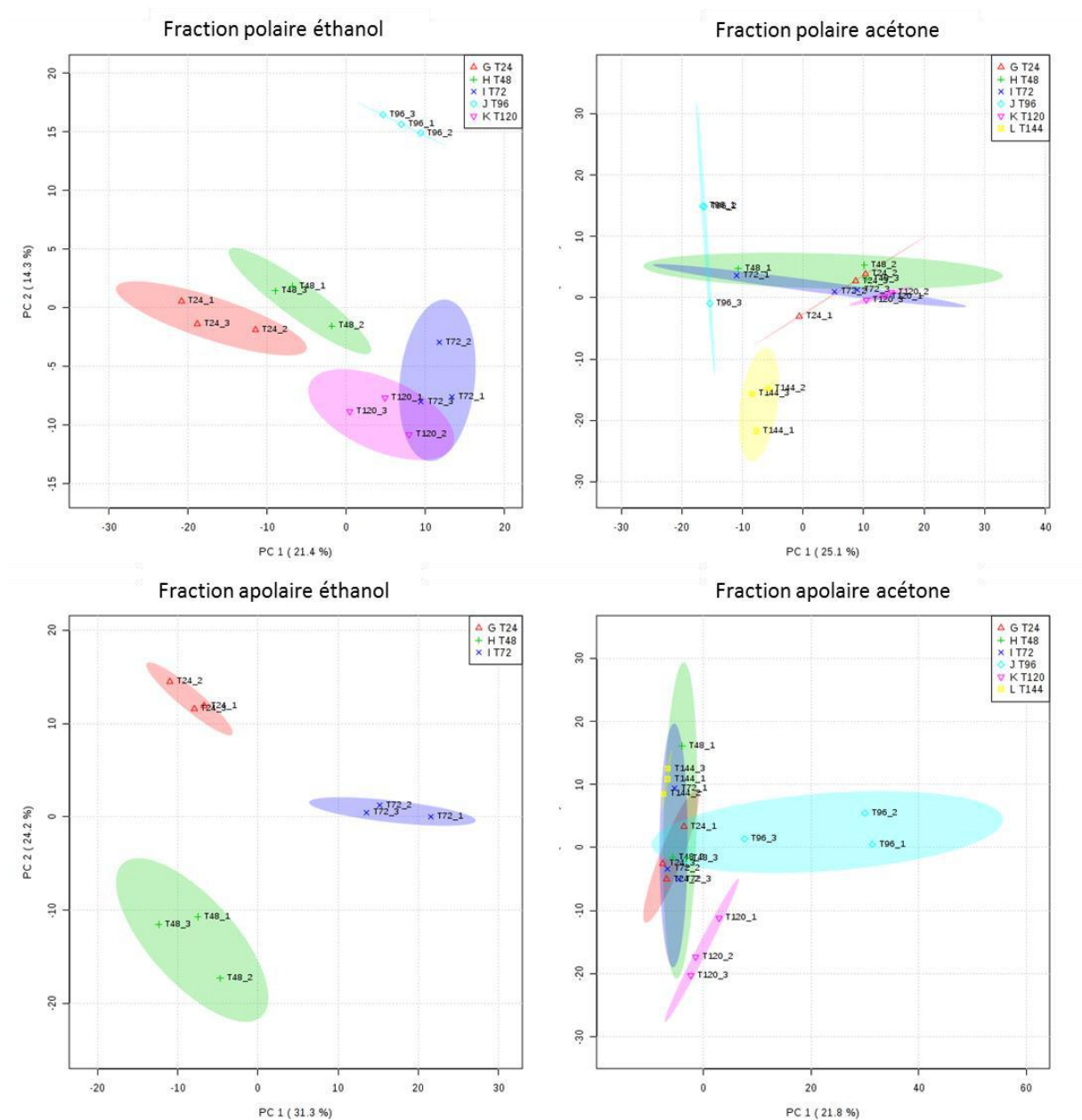
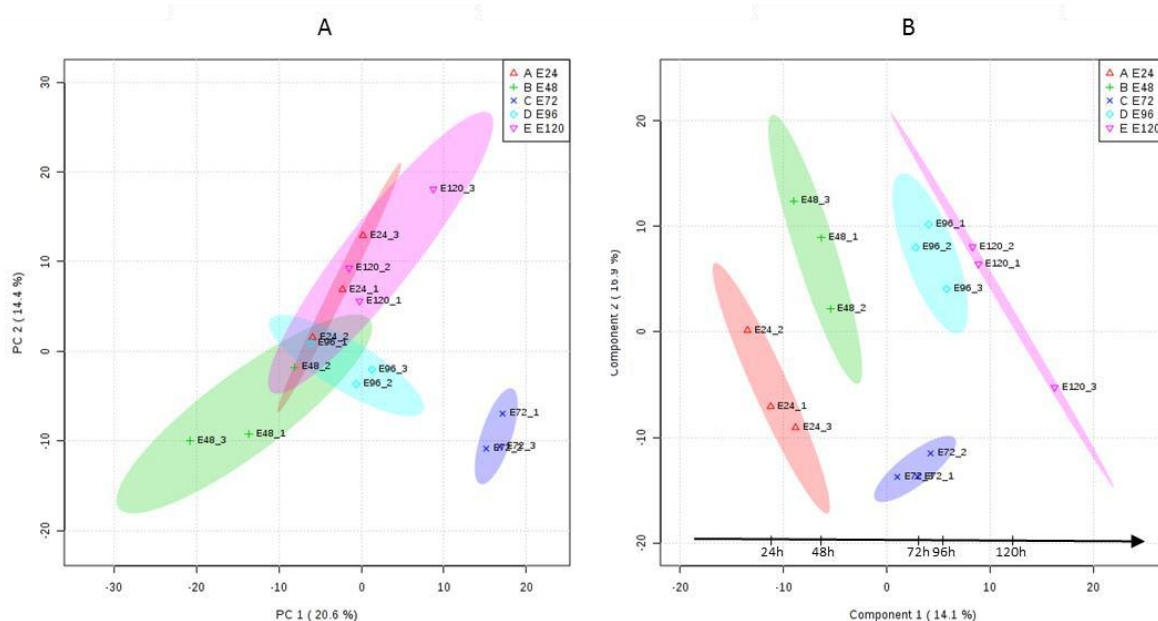


Figure 150. Résultats des ACP effectuées sur les données des différentes fractions pour l'analyse des témoins seuls

- Résultats d'ACP, de PLS-DA, de classification hiérarchique ascendante et de carte de chaleur correspondant à l'analyse des échantillons altérés seuls aux temps d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h pour les fractions polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone.

- Fraction apolaire éthanol

Figure 151. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les



données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

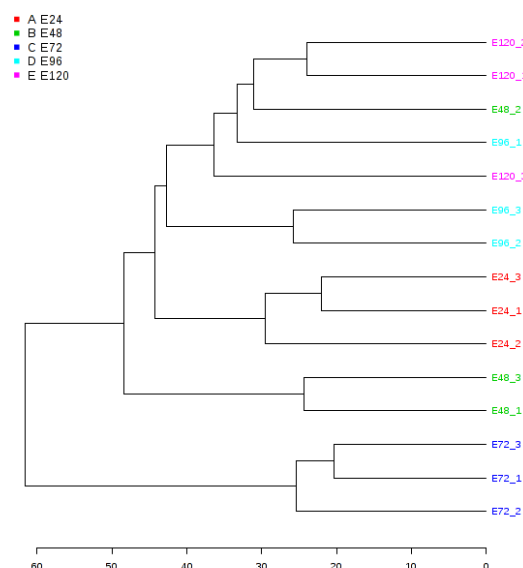


Figure 152. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

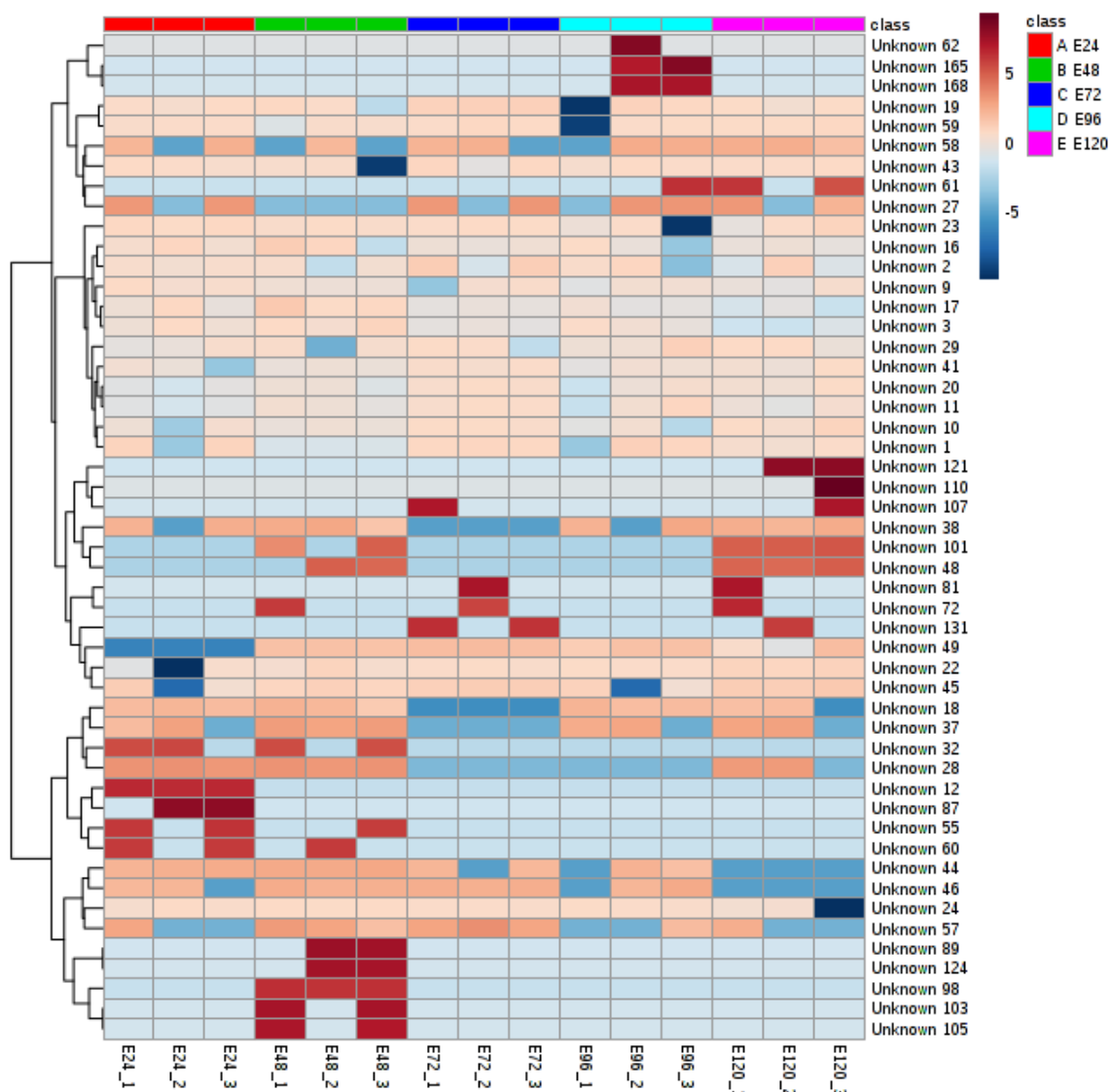


Figure 153. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.

- Fraction polaire acétone

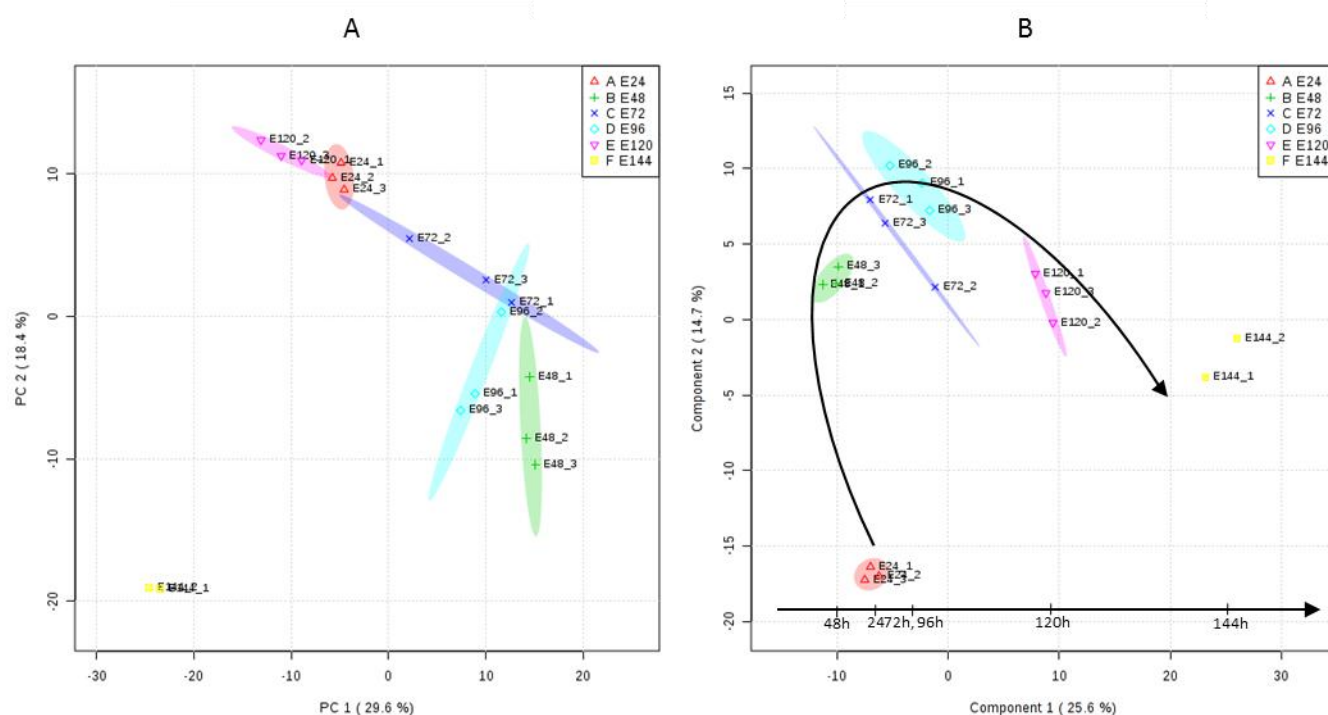


Figure 154. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

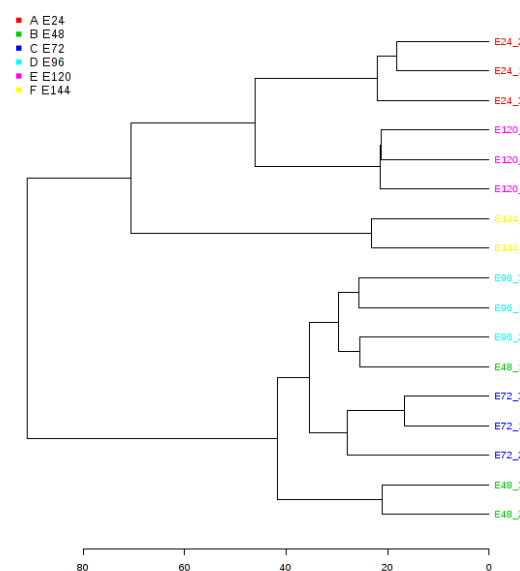


Figure 155. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

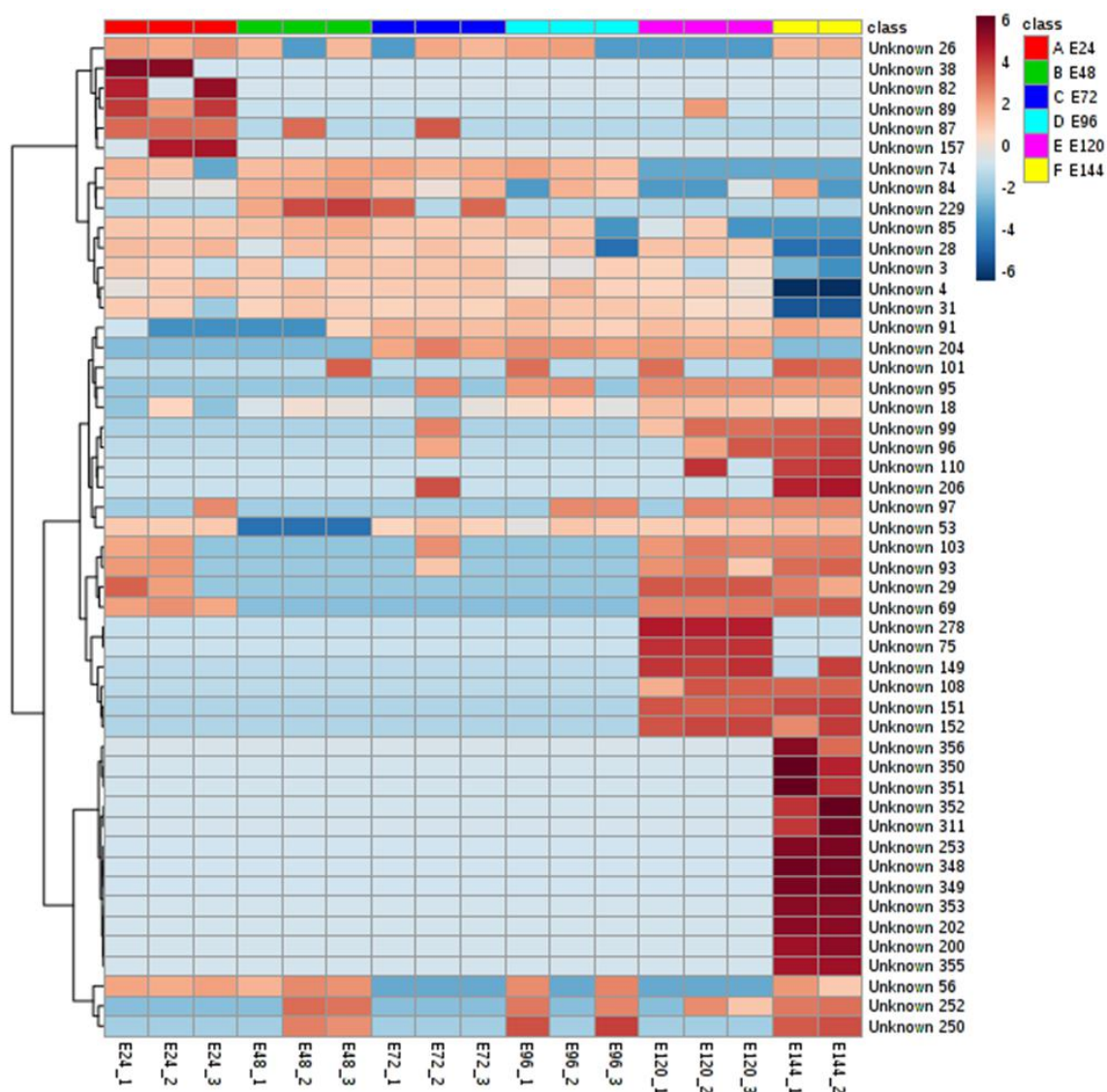


Figure 156. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction polaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. Les algorithmes utilisés exploitent les distances euclidiennes et l'approche de Ward pour le regroupement (ou clustering). Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.

- *Fraction apolaire acétone*

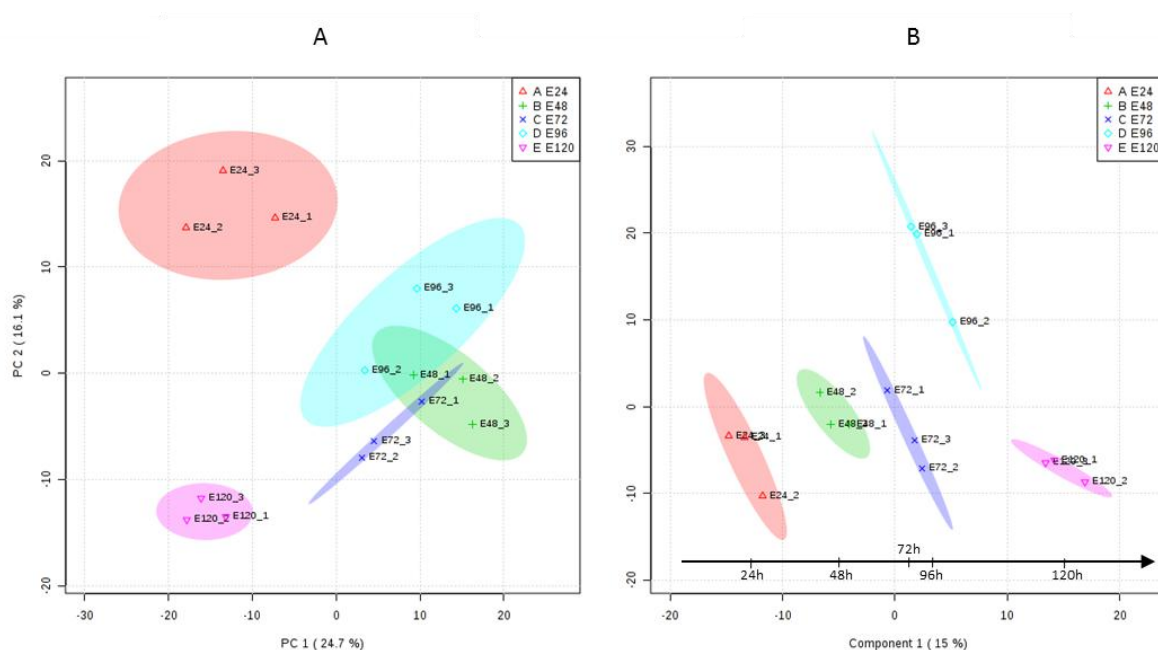


Figure 157. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

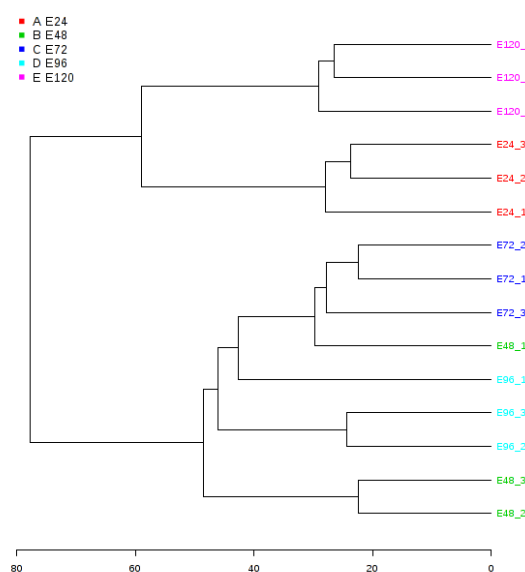


Figure 158. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h.

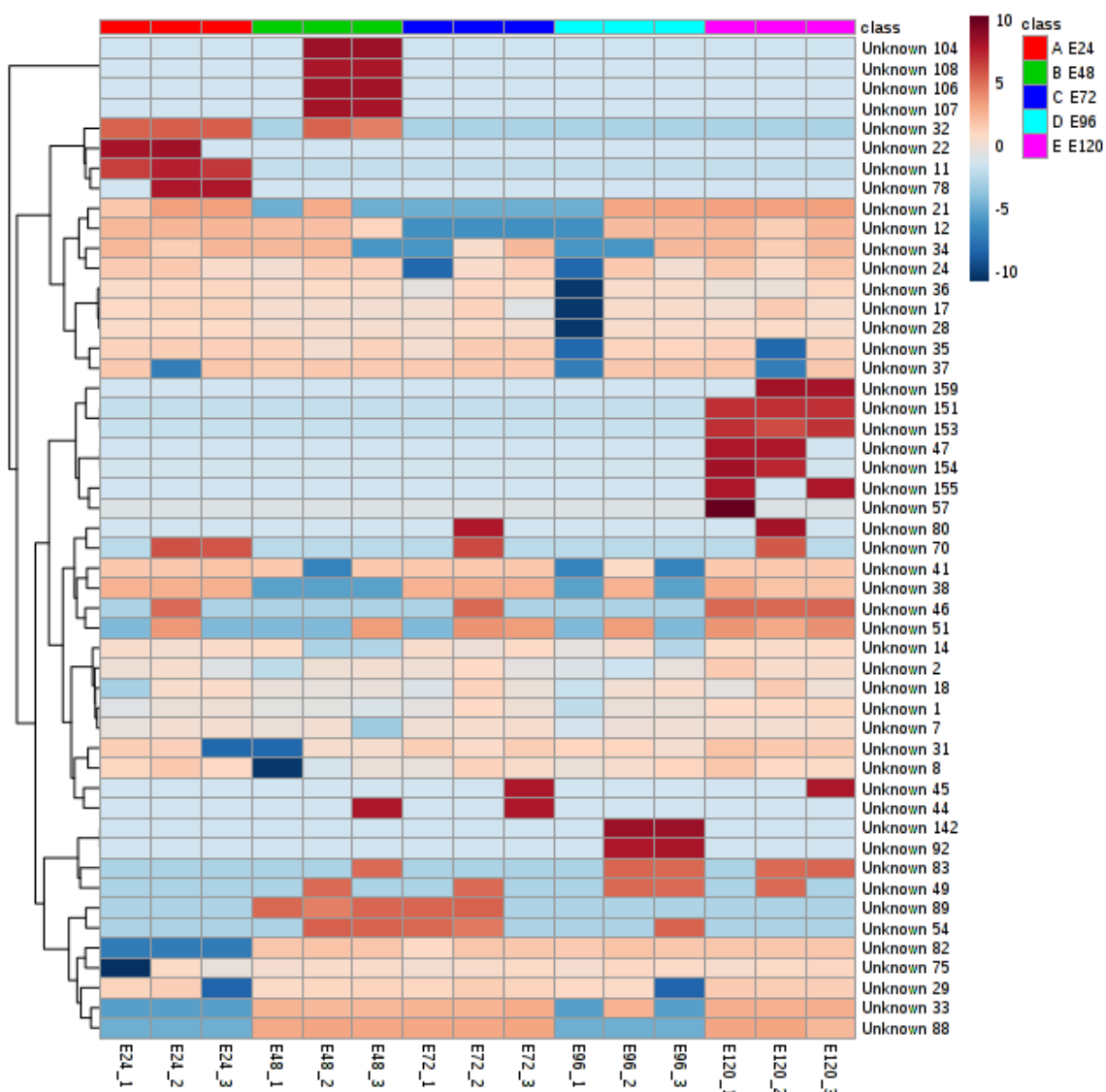


Figure 159. Carte de chaleur effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse des échantillons seuls aux temps d'analyses 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h. Seuls les 50 composés ayant obtenu le meilleur score au test de significativité (PLS-DA VIP) sont présentés. L'ordre des échantillons n'est pas réorganisé.

Annexe CC.Résultats d'ACP, de PLS-DA et de classification ascendante hiérarchique pour les points regroupés 24h et 48h, 72h et 96h et 120h et 144h pour les fractions polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone pour l'analyse de l'altération avec la souche *E. faecium*.

- Fraction polaire éthanol

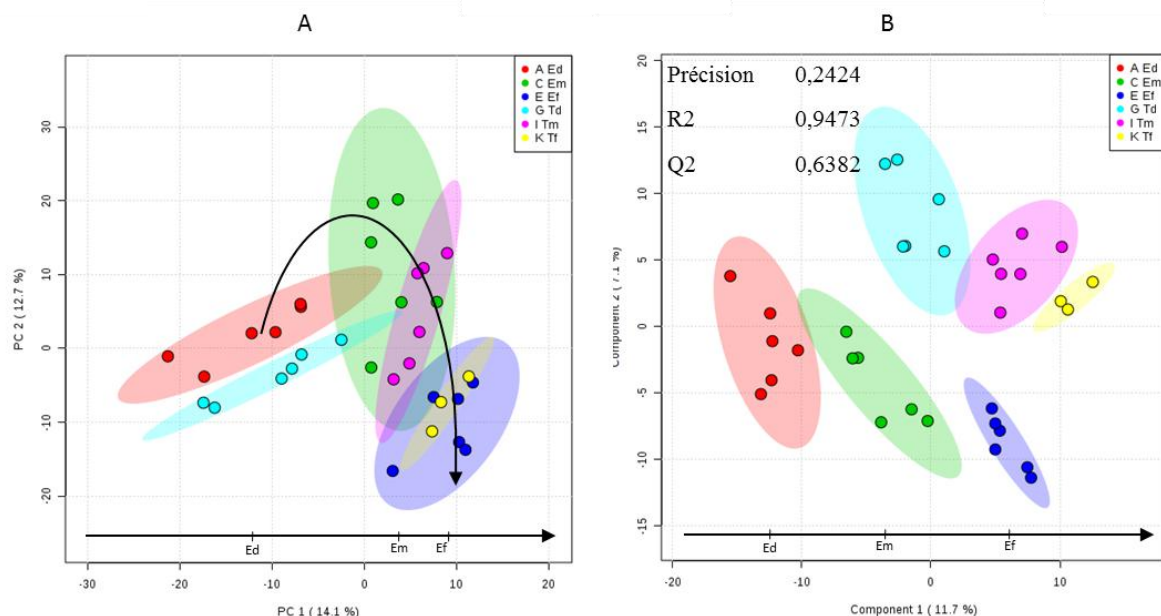


Figure 160. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

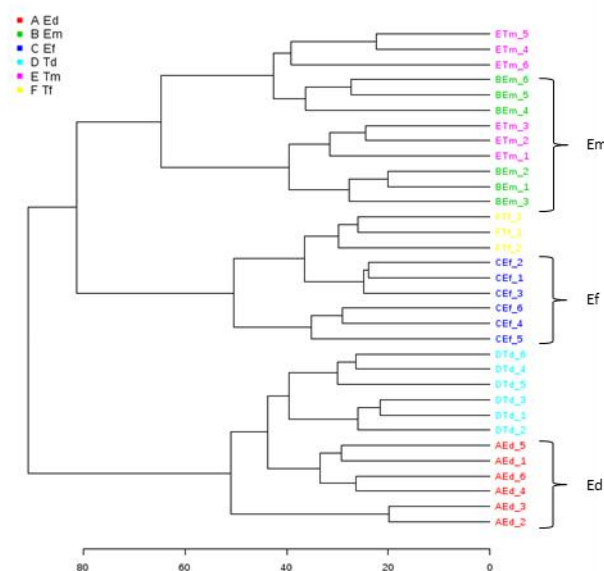


Figure 161. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction polaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

- *Fraction apolaire éthanol*

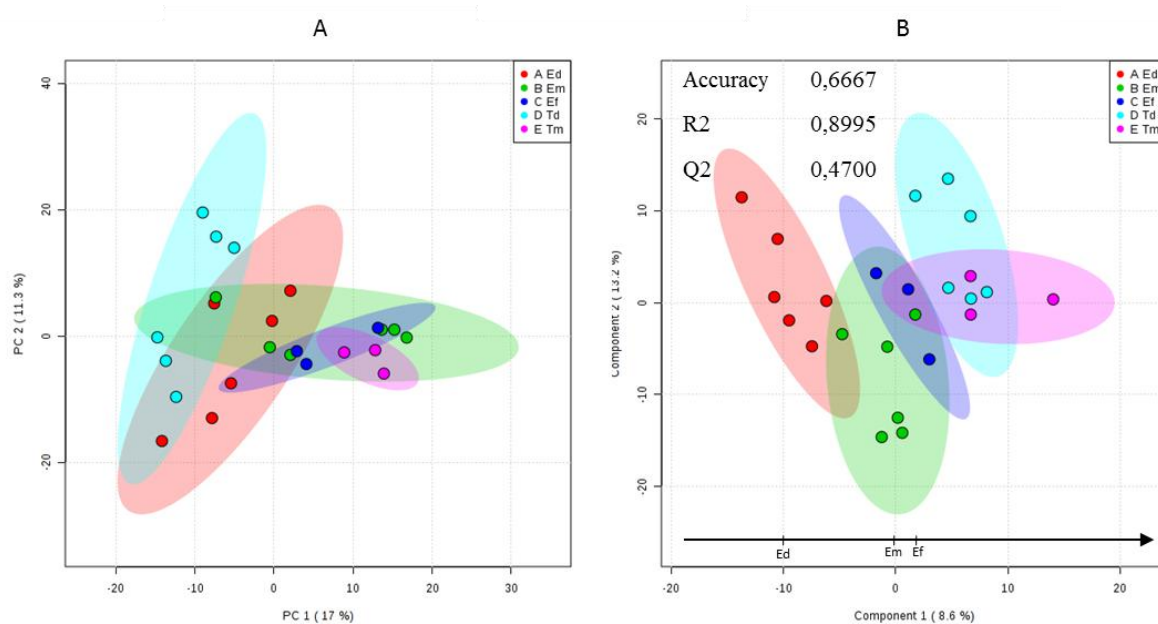


Figure 162. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

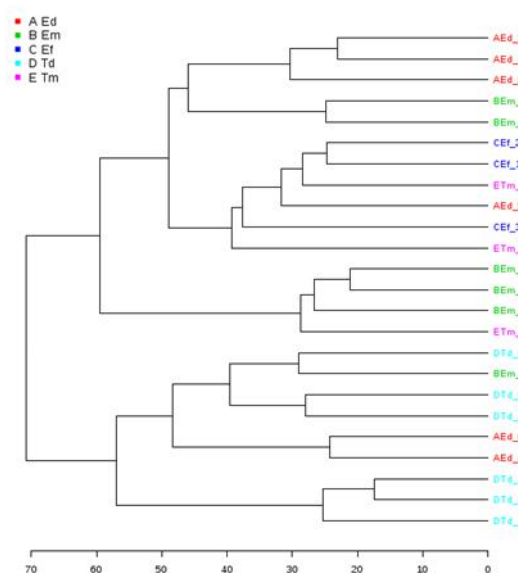


Figure 163. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire éthanol pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

- *Fraction apolaire acétone*

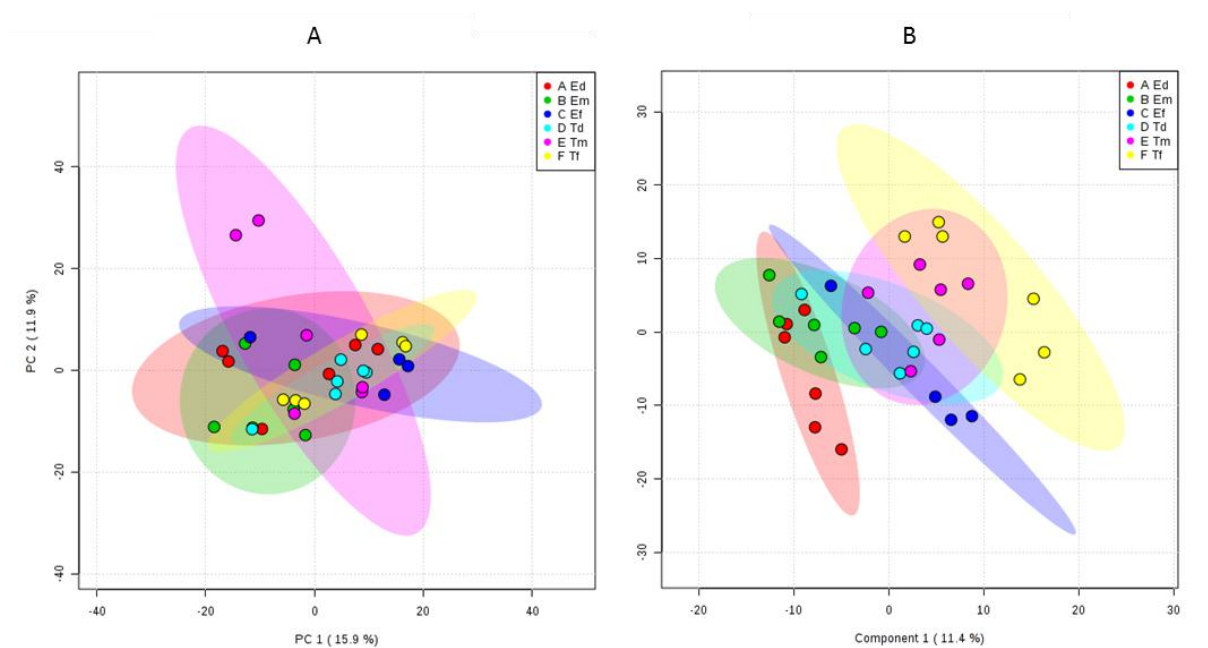


Figure 164. Représentation des résultats de l'ACP (A) et de la PLS-DA (B) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

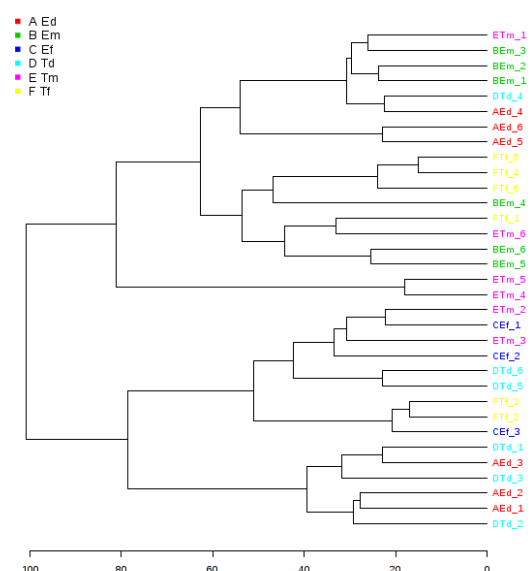


Figure 165. Représentation des résultats de classification hiérarchique ascendante (dendrogramme) effectuée sur les données de la fraction apolaire acétone pour l'analyse simultanée des échantillons et des témoins pour le début, le milieu et la fin de la plage d'analyse sélectionnée pour l'étude cinétique de l'altération

- Répartition des marqueurs potentiels dans les différentes fractions

La complémentarité de la répartition des marqueurs potentiels dans les différentes fractions extraites est représentée dans un digramme de Venn (Figure 166).

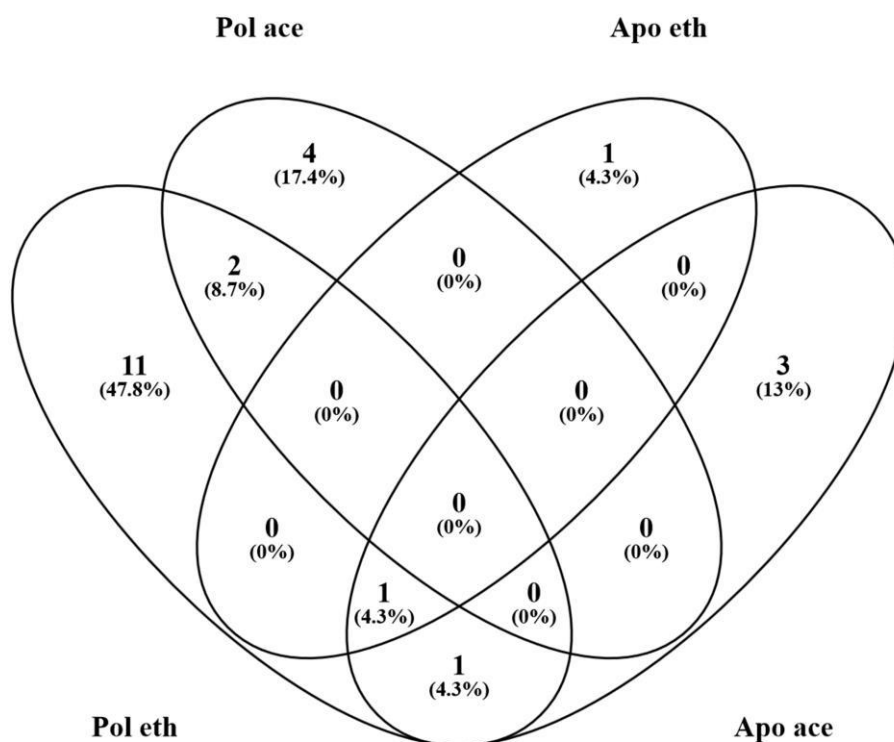


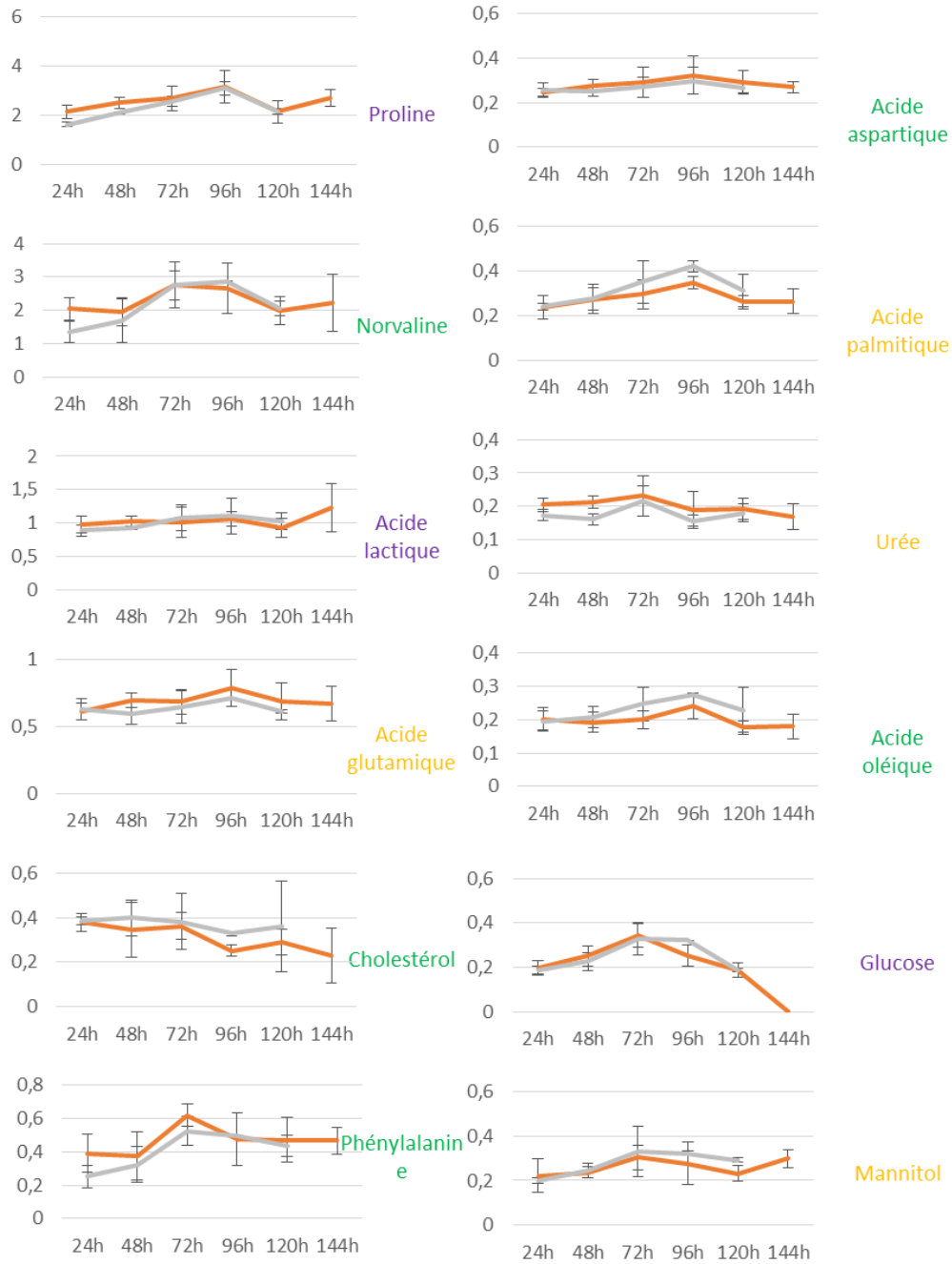
Figure 166. Diagramme de Venn présentant les composés d'intérêt identifiés dans les quatre fractions étudiées (polaire éthanol, polaire acétone, apolaire éthanol et apolaire acétone).

Sur un ensemble de 23 marqueurs retenus, aucun n'est retenu dans l'ensemble des fractions . Les fractions dans lesquelles sont détectés le plus de composés d'intérêt sont les fractions polaires éthanol avec 15 composés, la fraction polaire acétone avec 6 composés, la fraction apolaire acétone avec 5 composés et la fraction apolaire éthanol avec 2 composés. La majorité des composés d'intérêt ne sont détectés et retenus comme potentiellement intéressants, que dans l'une des fractions étudiées. En effet, les fractions polaire éthanol, polaire acétone, apolaire acétone et apolaire éthanol contiennent respectivement 11, 4, 3 et 1 composés qui ne sont détectés comme potentiellement intéressants dans aucune des autres fractions.

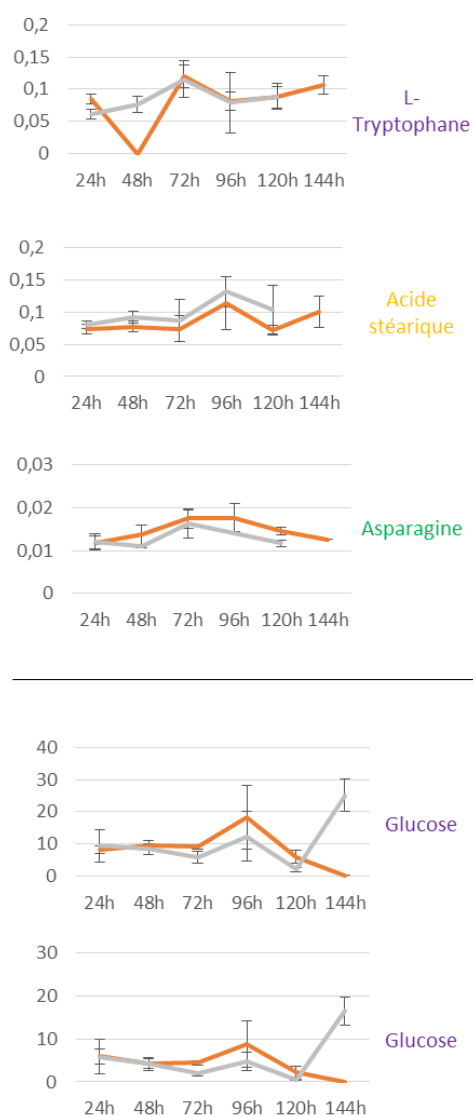
- *Quantification relative des marqueurs d'intérêt par fraction*

La cinétique d'évolution de l'intensité de chacun des marqueurs retenus a été étudiée dans le but d'identifier parmi ces composés ceux dont la variation d'intensité intervient le plus tôt, afin d'identifier les marqueurs qui pourraient permettre de caractériser précocement l'altération microbiologique. Les composés d'intérêt qui n'ont pas pu être identifiés sont présentés dans l'Annexe FF.

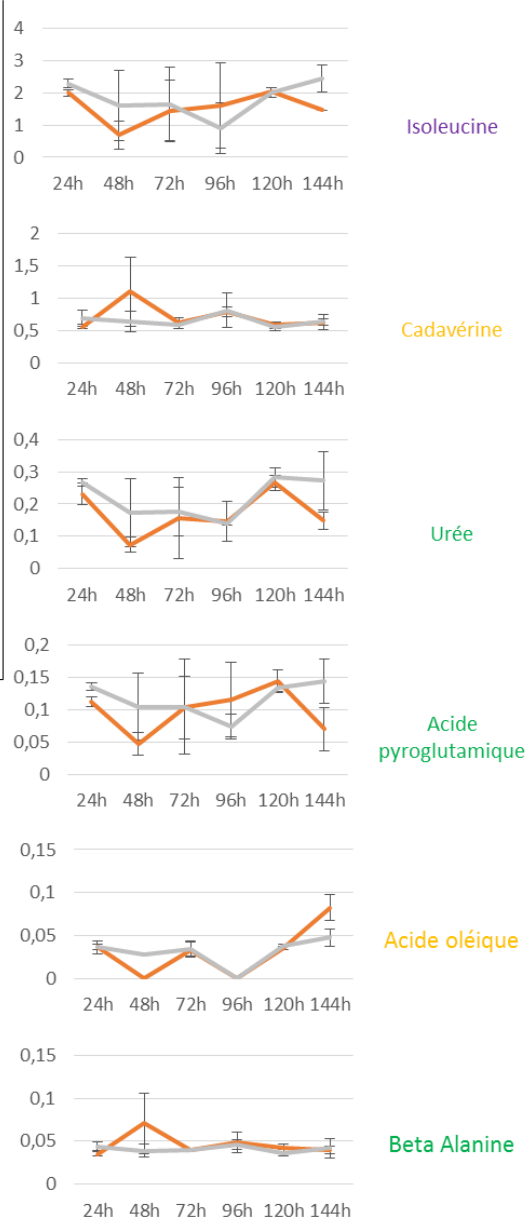
Polaire éthanol



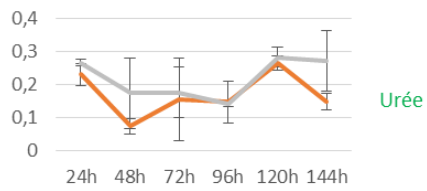
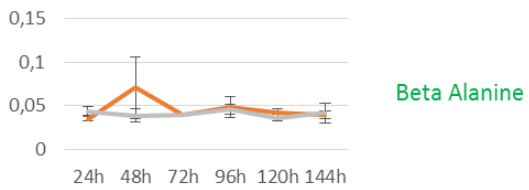
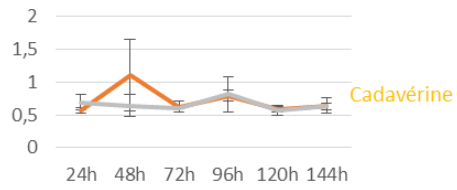
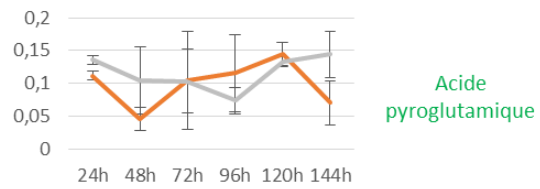
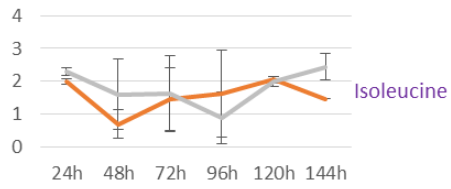
Polaire éthanol



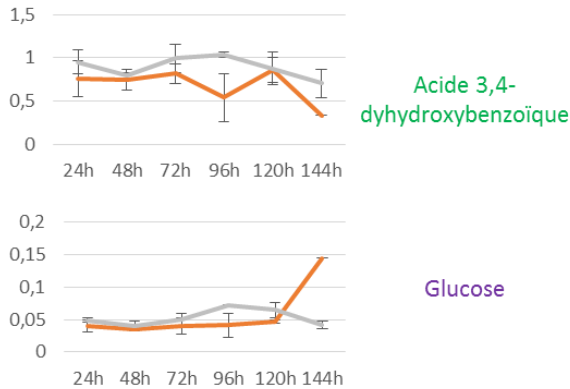
Polaire acétone



Polaire acétone



Apolaire éthanol



Apolaire acétone

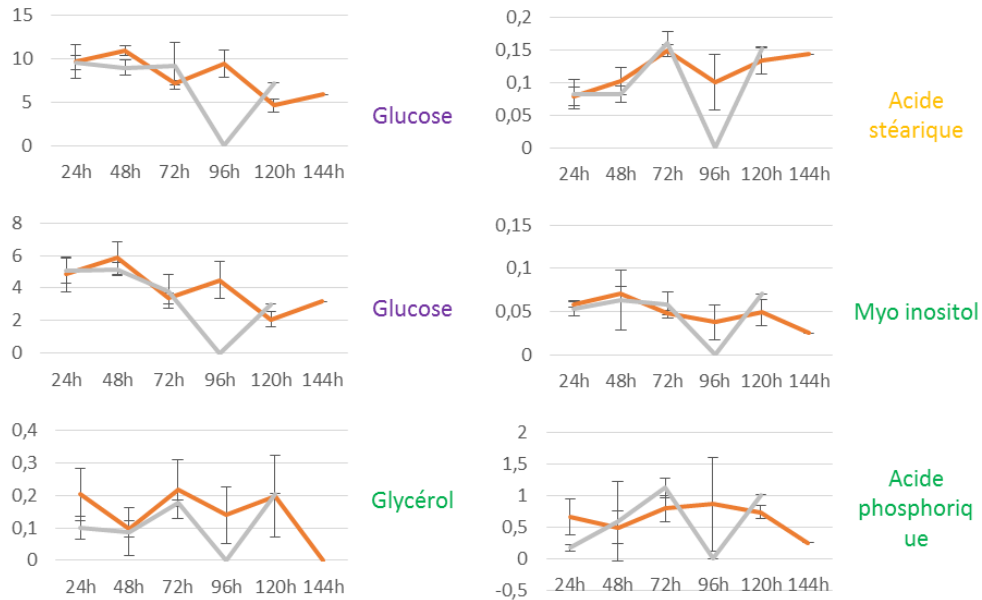


Figure 167. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés aux temps d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h dans les différentes fractions. Les valeurs correspondant aux échantillons sains (témoins) sont indiquées en gris, celles correspondant aux échantillons en cours d'altération sont indiquées en orange. Les barres d'erreur correspondent à plus et moins l'écart type enregistré sur les trois réplicats pour chaque condition. Le code couleur pour l'identification est le même que précédemment (Identification en violet, annotation niveau 1 en vert et niveau 2 en orange).

Les données d'intensité relatives dans les échantillons sains et altérés à chaque point d'analyse pour les marqueurs d'altération identifiés sont présentées ci-dessous.

Tableau 87. Données d'intensité relatives dans les échantillons sains (témoins) et altérés au cours de l'altération par la souche *E. faecium* pour chaque marqueur d'altération identifié dans les différentes fractions

Echantillons	Polaire Ethanol											
	24h	48h	72h	96h	120h	144h						
Acide aspartique	0,2445 +/- 0,0166	0,2777 +/- 0,0241	0,2913 +/- 0,0663	0,3222 +/- 0,0860	0,2921 +/- 0,0533	0,2690 +/- 0,0257						
Acide glutamique	0,6131 +/- 0,0619	0,6967 +/- 0,0547	0,6859 +/- 0,0938	0,7863 +/- 0,1382	0,6924 +/- 0,1370	0,6731 +/- 0,1306						
Acide lactique	0,9763 +/- 0,1274	1,0298 +/- 0,0756	1,0149 +/- 0,2235	1,0627 +/- 0,1147	0,9295 +/- 0,1411	1,2285 +/- 0,3577						
Asparagine	0,0118 +/- 0,0015	0,0137 +/- 0,0022	0,0175 +/- 0,0023	0,0176 +/- 0,0033	0,0145 +/- 0,0008	0,0126 +/- #DIV/0!						
Proline	2,1506 +/- 0,2786	2,5010 +/- 0,2389	2,6903 +/- 0,4957	3,1756 +/- 0,6601	2,1384 +/- 0,4533	2,6997 +/- 0,3513						
Norvaline	2,0495 +/- 0,3428	1,9502 +/- 0,4280	2,7489 +/- 0,4366	2,6504 +/- 0,7572	2,0049 +/- 0,4207	2,2322 +/- 0,8584						
Cholesterol	0,3787 +/- 0,0402	0,3435 +/- 0,1228	0,3621 +/- 0,0612	0,2508 +/- 0,0253	0,2900 +/- 0,0579	0,2287 +/- 0,1215						
Phenylalanine	0,3908 +/- 0,1132	0,3755 +/- 0,1419	0,6189 +/- 0,0651	0,4747 +/- 0,1550	0,4698 +/- 0,1348	0,4655 +/- 0,0824						
Acide palmitique	0,2374 +/- 0,0517	0,2735 +/- 0,0657	0,2961 +/- 0,0652	0,3476 +/- 0,0258	0,2600 +/- 0,0319	0,2648 +/- 0,0535						
Urée	0,2046 +/- 0,0206	0,2125 +/- 0,0175	0,2320 +/- 0,0596	0,1883 +/- 0,0554	0,1914 +/- 0,0318	0,1696 +/- 0,0381						
Acide oléique	0,2013 +/- 0,0332	0,1921 +/- 0,0304	0,1994 +/- 0,0264	0,2406 +/- 0,0387	0,1774 +/- 0,0167	0,1793 +/- 0,0379						
Glucose	0,2003 +/- 0,0294	0,2516 +/- 0,0449	0,3424 +/- 0,0528	0,2543 +/- 0,0464	0,1877 +/- 0,0336	0,0000						
Mannitol	0,2224 +/- 0,0738	0,2363 +/- 0,0256	0,3048 +/- 0,0548	0,2774 +/- 0,0944	0,2323 +/- 0,0348	0,2989 +/- 0,0404						
L-Tryptophane	0,0851 +/- 0,0073	0,0000	0,1200 +/- 0,0175	0,0813 +/- 0,0136	0,0873 +/- 0,0174	0,1068 +/- 0,0147						
Acide stéarique	0,0737 +/- 0,0080	0,0775 +/- 0,0079	0,0745 +/- 0,0199	0,1138 +/- 0,0412	0,0720 +/- 0,0077	0,1007 +/- 0,0249						
Témoins	24h	48h	72h	96h	120h	144h						
Acide aspartique	0,2542 +/- 0,0337	0,2513 +/- 0,0251	0,2684 +/- 0,0441	0,2973 +/- 0,0605	0,2668 +/- 0,0258	NA +/- NA						
Acide glutamique	0,6275 +/- 0,0799	0,6016 +/- 0,0848	0,6486 +/- 0,1209	0,7182 +/- 0,0635	0,6133 +/- 0,0098	NA +/- NA						
Acide lactique	0,8898 +/- 0,0850	0,9250 +/- 0,0308	1,0798 +/- 0,1971	1,1095 +/- 0,2674	1,0243 +/- 0,1258	NA +/- NA						
Asparagine	0,0122 +/- 0,0017	0,0109 +/- 0,0003	0,0162 +/- 0,0033	0,0141 +/- 0,0002	0,0117 +/- 0,0008	NA +/- NA						
Proline	1,6288 +/- 0,1475	2,0931 +/- 0,2360	2,5633 +/- 0,4878	3,0919 +/- 0,6202	2,1472 +/- 0,3114	NA +/- NA						
Norvaline	1,3565 +/- 0,3132	1,6793 +/- 0,6588	2,7620 +/- 0,7010	2,8539 +/- 0,0167	2,0426 +/- 0,2185	NA +/- NA						
Cholesterol	0,3858 +/- 0,0159	0,3981 +/- 0,0818	0,3817 +/- 0,1267	0,3277 +/- 0,0089	0,3594 +/- 0,2049	NA +/- NA						
Phenylalanine	0,2515 +/- 0,0674	0,3231 +/- 0,1070	0,5241 +/- 0,0871	0,4922 +/- 0,0035	0,4329 +/- 0,0637	NA +/- NA						
Acide palmitique	0,2409 +/- 0,0158	0,2752 +/- 0,0493	0,3511 +/- 0,0944	0,4222 +/- 0,0247	0,3139 +/- 0,0719	NA +/- NA						
Urée	0,1733 +/- 0,0164	0,1614 +/- 0,0158	0,2163 +/- 0,0454	0,1565 +/- 0,0164	0,1800 +/- 0,0265	NA +/- NA						
Acide oléique	0,1951 +/- 0,0306	0,2077 +/- 0,0318	0,2459 +/- 0,0517	0,2759 +/- 0,0039	0,2262 +/- 0,0698	NA +/- NA						
Glucose	0,1865 +/- 0,0214	0,2269 +/- 0,0399	0,3283 +/- 0,0734	0,3232 +/- 0,0097	0,1871 +/- 0,0081	NA +/- NA						
Mannitol	0,2010 +/- 0,0130	0,2465 +/- 0,0331	0,3293 +/- 0,1136	0,3210 +/- 0,0097	0,2919 +/- 0,0117	NA +/- NA						
L-Tryptophane	0,0613 +/- 0,0082	0,0763 +/- 0,0130	0,1157 +/- 0,0280	0,0791 +/- 0,0466	0,0886 +/- 0,0197	NA +/- NA						
Acide stéarique	0,0797 +/- 0,0059	0,0920 +/- 0,0086	0,0873 +/- 0,0326	0,1315 +/- 0,0235	0,1040 +/- 0,0378	NA +/- NA						

Polaire Acétone												
Echantillons	24h		48h		72h		96h		120h		144h	
Glucose	8,2629 +/- 1,1126	9,5537 +/- 1,6022	9,0901 +/- 0,7224	18,2948 +/- 9,8495	5,9677 +/- 1,9830	0,1383 +/- 0,0935						
Glucose	5,8967 +/- 1,7394	4,1383 +/- 1,5335	4,3879 +/- 0,4842	8,7217 +/- 5,3491	2,3438 +/- 1,2779	0,0000 +/- 0,0000						
Isoleucine	1,9957 +/- 0,0978	0,7006 +/- 0,4373	1,4528 +/- 0,9498	1,6161 +/- 1,3231	2,0551 +/- 0,0939	1,4687 +/- 0,0034						
Cadaverine	0,5653 +/- 0,0392	1,1047 +/- 0,5413	0,6230 +/- 0,0818	0,7933 +/- 0,0826	0,5886 +/- 0,0489	0,6306 +/- 0,0490						
Urée	0,2315 +/- 0,0335	0,0732 +/- 0,0233	0,1557 +/- 0,1256	0,1469 +/- 0,0625	0,2654 +/- 0,0228	0,1483 +/- 0,0255						
Acide pyroglutamique	0,1122 +/- 0,0070	0,0467 +/- 0,0174	0,1044 +/- 0,0741	0,1156 +/- 0,0581	0,1442 +/- 0,0180	0,0704 +/- 0,0335						
Beta Alanine	0,0354 +/- 0,0028	0,0707 +/- 0,0348	0,0405 +/- 0,0004	0,0486 +/- 0,0119	0,0417 +/- 0,0048	0,0398 +/- 0,0048						
Acide oléique	0,0369 +/- 0,0034	0,0000	0,0336 +/- 0,0089	0,0000 +/- 0,0000	0,0354 +/- 0,0016	0,0825 +/- 0,0149						
Témoins	24h	48h	72h	96h	120h	144h						
Glucose	9,4436 +/- 5,1454	8,4231 +/- 1,6041	5,9413 +/- 1,7194	12,3732 +/- 7,8010	2,0907 +/- 0,6278	25,1502 +/- 5,0775						
Glucose	5,7940 +/- 4,0225	4,2588 +/- 1,0117	1,9061 +/- 0,4995	4,7606 +/- 2,1927	0,4805 +/- 0,1380	16,4523 +/- 3,2444						
Isoleucine	2,2931 +/- 0,1255	1,6046 +/- 1,0783	1,6281 +/- 1,1562	0,8980 +/- 0,7879	2,0028 +/- 0,1597	2,4456 +/- 0,4169						
Cadaverine	0,6919 +/- 0,1199	0,6411 +/- 0,1662	0,5942 +/- 0,0042	0,8117 +/- 0,2693	0,5601 +/- 0,0661	0,6377 +/- 0,1184						
Urée	0,2669 +/- 0,0114	0,1738 +/- 0,1061	0,1763 +/- 0,0763	0,1409 +/- 0,0074	0,2829 +/- 0,0296	0,2721 +/- 0,0911						
Acide pyroglutamique	0,1359 +/- 0,0062	0,1046 +/- 0,0516	0,1033 +/- 0,0484	0,0737 +/- 0,0200	0,1339 +/- 0,0061	0,1443 +/- 0,0348						
Beta Alanine	0,0441 +/- 0,0046	0,0391 +/- 0,0075	0,0401 +/- 0,0011	0,0461 +/- 0,0052	0,0365 +/- 0,0037	0,0420 +/- 0,0115						
Acide oléique	0,0365 +/- 0,0073	0,0280 +/- 0,0006	0,0349 +/- 0,0090	0,0000	0,0387 +/- 0,0011	0,0478 +/- 0,0101						

Apolaire Ethanol												
Echantillons	24h		48h		72h		96h		120h		144h	
Acide 3,4-d'hydroxybenzoïque	0,7610 +/- 0,2097		0,7490 +/- 0,1223		0,8173 +/- 0,1184		0,5433 +/- 0,2782		0,8614 +/- 0,1452		0,3378 +/- 0,3378	NA
Glucose	0,0404 +/- 0,0097		0,0357 +/- 0,0020		0,0406 +/- 0,0125		0,0409 +/- 0,0178		0,0460 +/- 0,0026		0,1445 +/- 0,1445	NA
Témoins	24h		48h		120h		144h		216h		240h	
Acide 3,4-d'hydroxybenzoïque	0,9530 +/- 0,1381		0,8024 +/- 0,0305		0,9952 +/- 0,1611		1,0353 +/- 0,0273		0,8776 +/- 0,1912		0,7060 +/- 0,7060	0,1592
Glucose	0,0487 +/- 0,0031		0,0400 +/- 0,0069		0,0504 +/- 0,0090		0,0720 +/- 0,0001		0,0646 +/- 0,0112		0,0413 +/- 0,0413	0,0059
Apolaire Acétone												
Echantillons	24h		48h		72h		96h		120h		144h	
Glucose	9,6681 +/- 1,9250		10,9299 +/- 0,5675		7,2494 +/- 0,2581		9,4351 +/- 1,6154		4,6153 +/- 0,7550		5,9108 +/- 5,9108	NA
Glucose	4,8338 +/- 1,0477		5,8412 +/- 1,0193		3,3549 +/- 0,3030		4,4915 +/- 1,1187		2,0740 +/- 0,4457		3,1855 +/- 3,1855	NA
Glycérol	0,2027 +/- 0,0795		0,0962 +/- 0,0259		0,2185 +/- 0,0896		0,1389 +/- 0,0875		0,1973 +/- 0,1266		0,0000 +/- 0,0000	NA
Acide octadécanoïque	0,0789 +/- 0,0137		0,1017 +/- 0,0209		0,1499 +/- 0,0093		0,1008 +/- 0,0431		0,1343 +/- 0,0213		0,1434 +/- 0,1434	NA
Myo-inositol	0,0589 +/- 0,0039		0,0714 +/- 0,0081		0,0485 +/- 0,0023		0,0377 +/- 0,0200		0,0490 +/- 0,0147		0,0253 +/- 0,0253	NA
Acide phosphorique	0,6576 +/- 0,2900		0,4918 +/- 0,2636		0,7900 +/- 0,2024		0,8587 +/- 0,7437		0,7365 +/- 0,1090		0,2492 +/- 0,2492	NA
Témoins	24h		48h		72h		96h		120h		144h	
Glucose	9,5981 +/- 0,7924		9,0067 +/- 0,8752		9,1906 +/- 2,7029		NA +/- NA		7,2309 +/- NA		NA +/- NA	NA
Glucose	5,0815 +/- 0,7559		5,1450 +/- 0,3885		3,8012 +/- 1,0609		NA +/- NA		2,9924 +/- NA		NA +/- NA	NA
Glycérol	0,1005 +/- 0,0340		0,0885 +/- 0,0746		0,1765 +/- 0,0104		NA +/- NA		0,2041 +/- NA		NA +/- NA	NA
Acide octadécanoïque	0,0828 +/- 0,0225		0,0822 +/- 0,0133		0,1616 +/- 0,0172		NA +/- NA		0,1534 +/- NA		NA +/- NA	NA
Myo-inositol	0,0535 +/- 0,0081		0,0634 +/- 0,0342		0,0579 +/- 0,0149		NA +/- NA		0,0704 +/- NA		NA +/- NA	NA
Acide phosphorique	0,1679 +/- 0,0495		0,5922 +/- 0,6301		1,1198 +/- 0,1531		NA +/- NA		1,0100 +/- NA		NA +/- NA	NA

Profilage métabolique

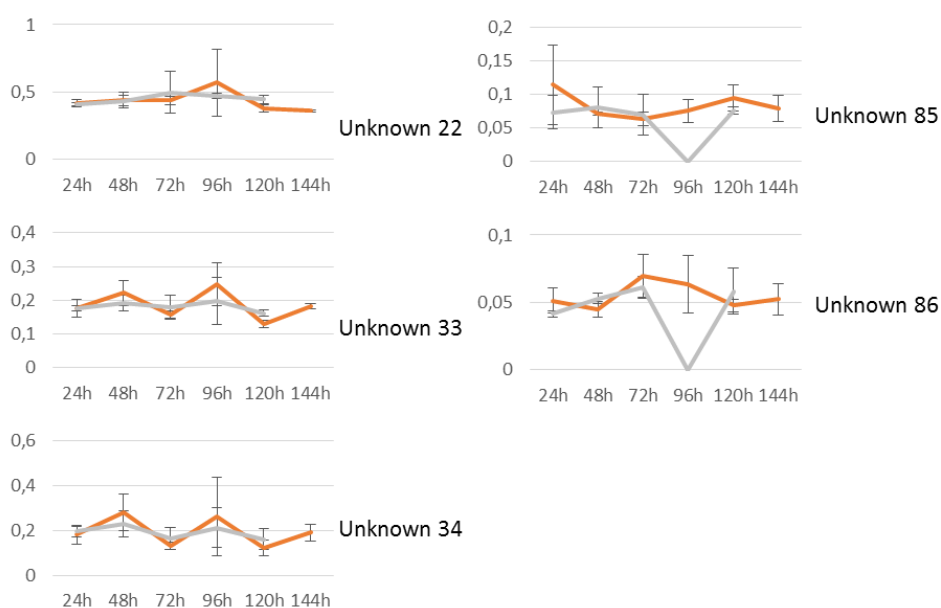
Pour l'analyse ciblée, les composés pour lesquels des gammes de calibrations ont été effectuées ont été analysés de manière quantitative. L'évolution de la concentration des composés quantifiables dans les échantillons altérés et témoins analysés dans le cadre de l'étude de l'altération avec la souche *Enterococcus faecium* est présentée dans le Tableau 88.

Tableau 88. Evolution de l'abondance absolue des composés identifiés aux temps d'analyse 24h, 48h, 120h, 144h, 216h, 240h dans des données de prise d'empreinte par GC-MS de la fraction apolaire acétone. Certains composés notés « Hors gamme » présentaient des intensités trop importantes pour être quantifiés (hors de la gamme de calibration)

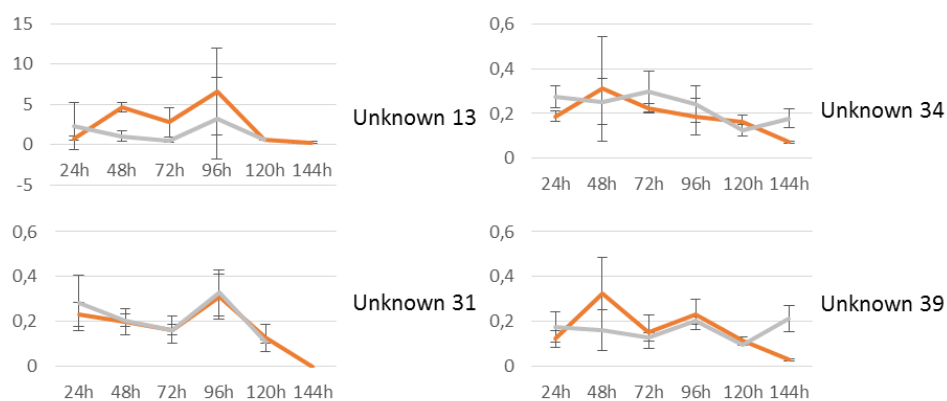
	Echantillons									
	24h	48h	72h	96h	120h	144h				
Polaire éthanol										
Proline	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	
Acide lactique	0,07 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,07 +/- 0,02	0,07 +/- 0,01	0,06 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,02
Glucose 3	0,09 +/- 0,01	0,10 +/- 0,01	0,13 +/- 0,02	0,10 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,01
L-Tryptophane	0,05 +/- 0,01	0,00	0,08 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01	0,01
Polaire acétone										
Glucose 2	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	0,05 +/- 0,03
Glucose	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	0,32 +/- 0,00
Isoléucine	Hors gamme	0,20 +/- 0,06	0,27 +/- 0,15	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,00
Apolaire éthanol										
Glucose 4	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	
Glucose 3	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	
Témoins										
Polaire éthanol										
Proline	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	
Acide lactique	0,06 +/- 0,01	0,06 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,08 +/- 0,02	0,07 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01	0,01
Glucose 3	0,08 +/- 0,01	0,10 +/- 0,01	0,13 +/- 0,02	0,06 +/- 0,01	0,08 +/- 0,02	0,08 +/- 0,02	0,08 +/- 0,02	0,08 +/- 0,02	0,08 +/- 0,02	0,00
L-Tryptophane	0,03 +/- 0,01	0,04 +/- 0,01	0,07 +/- 0,02	0,04 +/- 0,05	0,04 +/- 0,05	0,05 +/- 0,02	0,05 +/- 0,02	0,05 +/- 0,02	0,05 +/- 0,02	0,02
Polaire acétone										
Glucose 2	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	
Glucose	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	
Isoléucine	Hors gamme	0,16 +/- 0,05	0,13 +/- 0,05	0,16 +/- 0,05	0,17 +/- 0,03	0,17 +/- 0,03	0,17 +/- 0,03	0,17 +/- 0,03	0,17 +/- 0,03	
Apolaire éthanol										
Glucose 4	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	
Glucose 3	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	Hors gamme	

Annexe FF. Evolution de l'intensité relative des signaux pour les composés non identifiés lors de la prise d'empreinte par GC-MS aux temps d'analyse 24h, 48h, 72h, 96h et 120h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

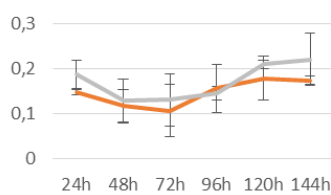
Polaire éthanol



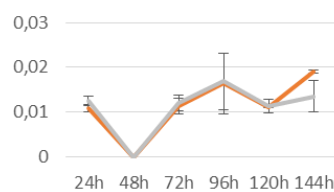
Polaire acétone



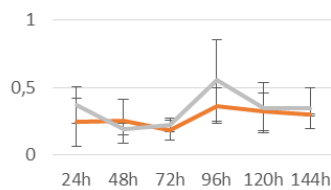
Polaire acétone



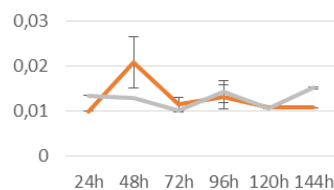
Unknown 44



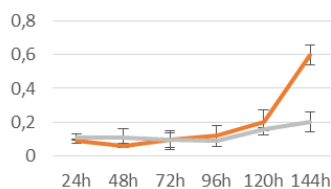
Unknown 88



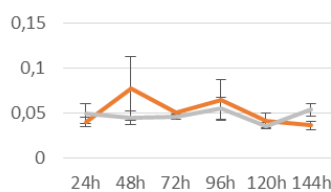
Unknown 47



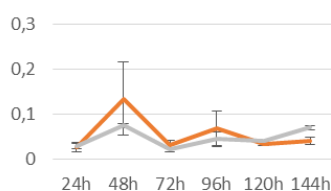
Unknown 98



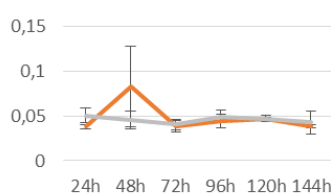
Unknown 52



Unknown 66

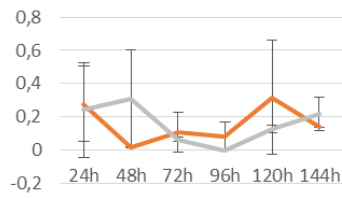


Unknown 67

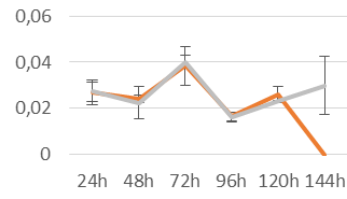


Unknown 71

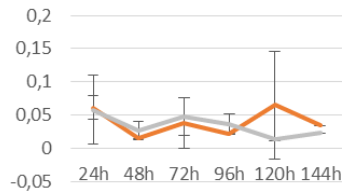
Apolaire éthanol



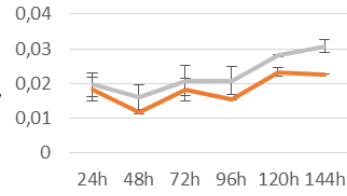
Unknown 8



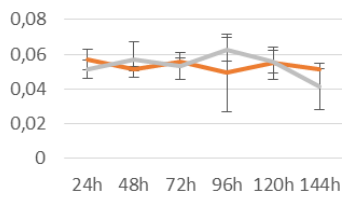
Unknown 35



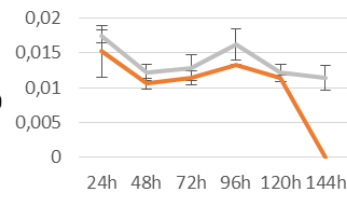
Unknown 17



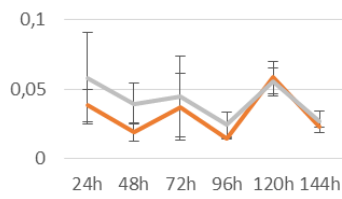
Unknown 40



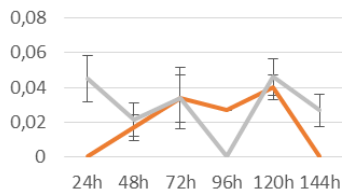
Unknown 20



Unknown 41

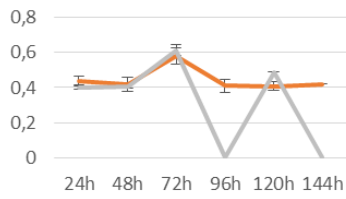


Unknown 29

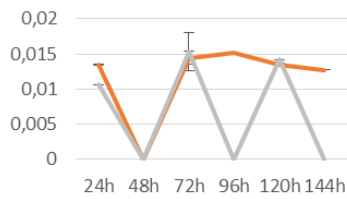


Unknown 33

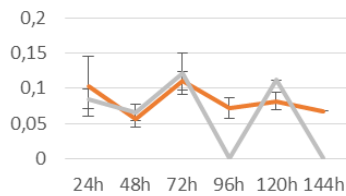
Apolaire acétone



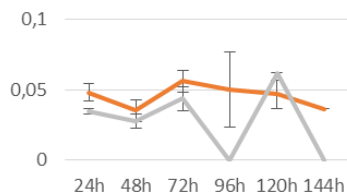
Unknown 8



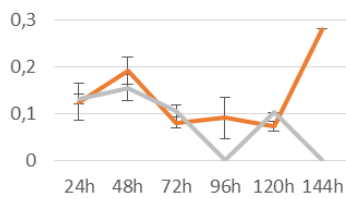
Unknown 27



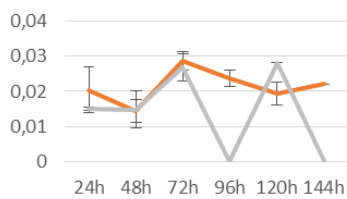
Unknown 13



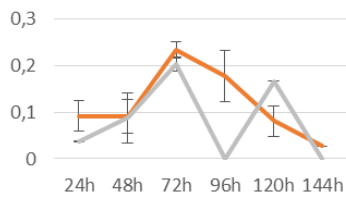
Unknown 35



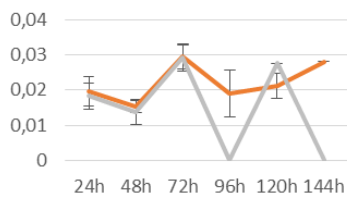
Unknown 16



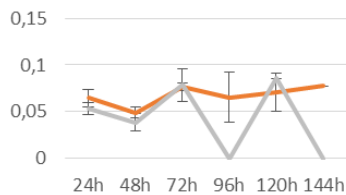
Unknown 39



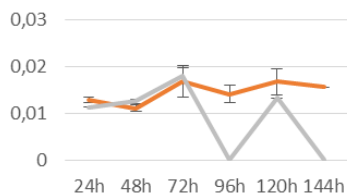
Unknown 19



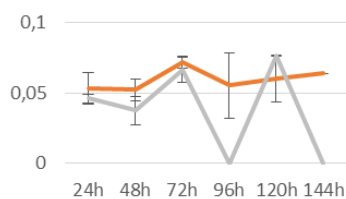
Unknown 43



Unknown 21



Unknown 59



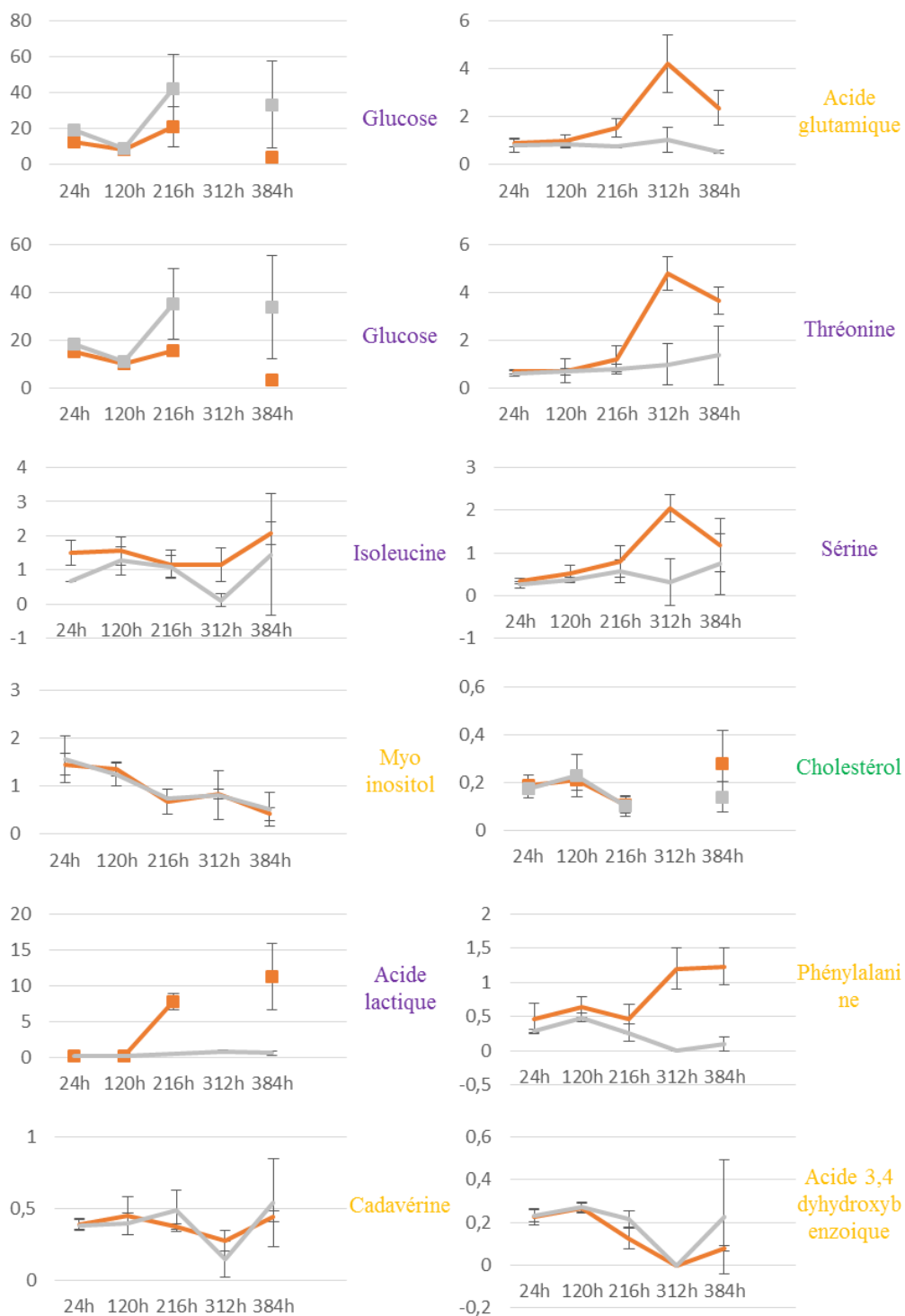
Unknown 26

Annexe GG. Analyse détaillée des données de quantification relative et absolue des marqueurs potentiels pour l'étude de l'altération avec la souche E.faecium – Jeu de données 2 – Analyse apr GCMS

- Quantification relative des marqueurs d'intérêt

Comme lors des analyses précédentes, la cinétique d'évolution de l'intensité de chacun des marqueurs retenus a été étudiée dans le but d'identifier parmi ces composés ceux dont la variation d'intensité intervient le plus tôt. L'évolution du signal de chacun de ces composés a donc été étudiée aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour les échantillons sains (témoins) et les échantillons altérés (Figure 168). Les mêmes données pour les signaux non identifiés sont présentées plus bas.

Polaire éthanol



Polaire éthanol

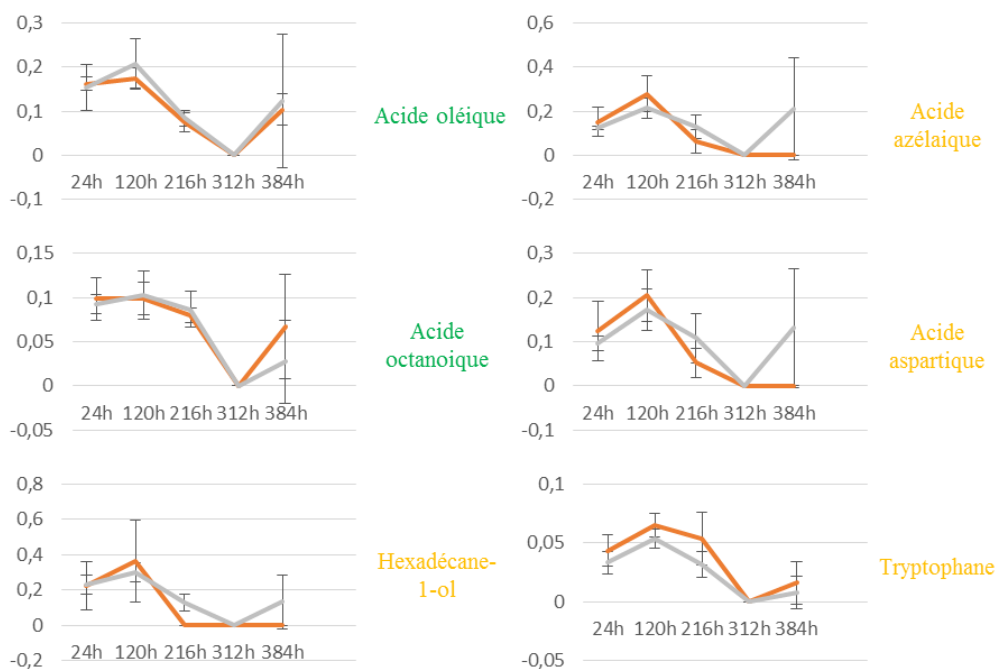
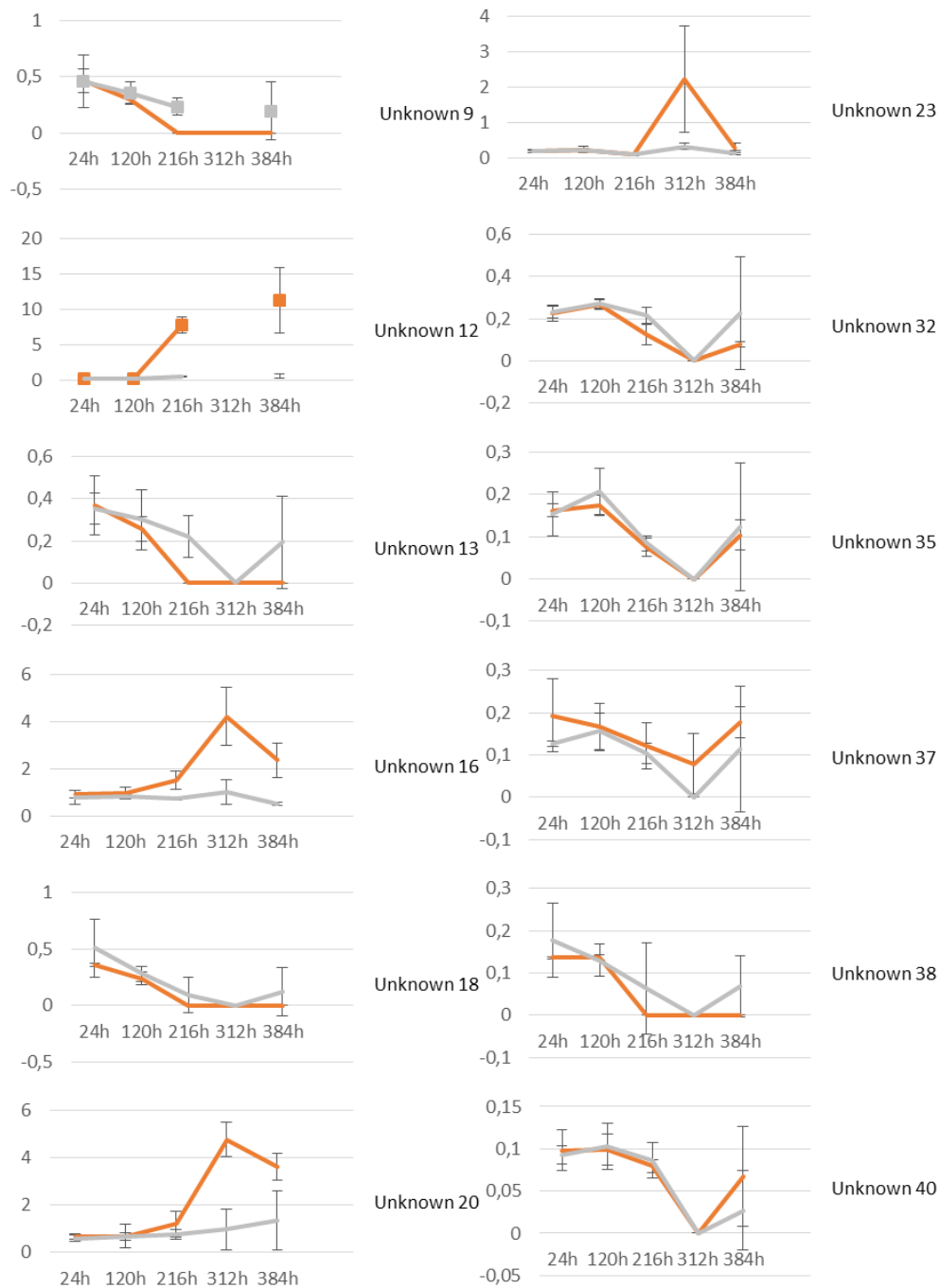
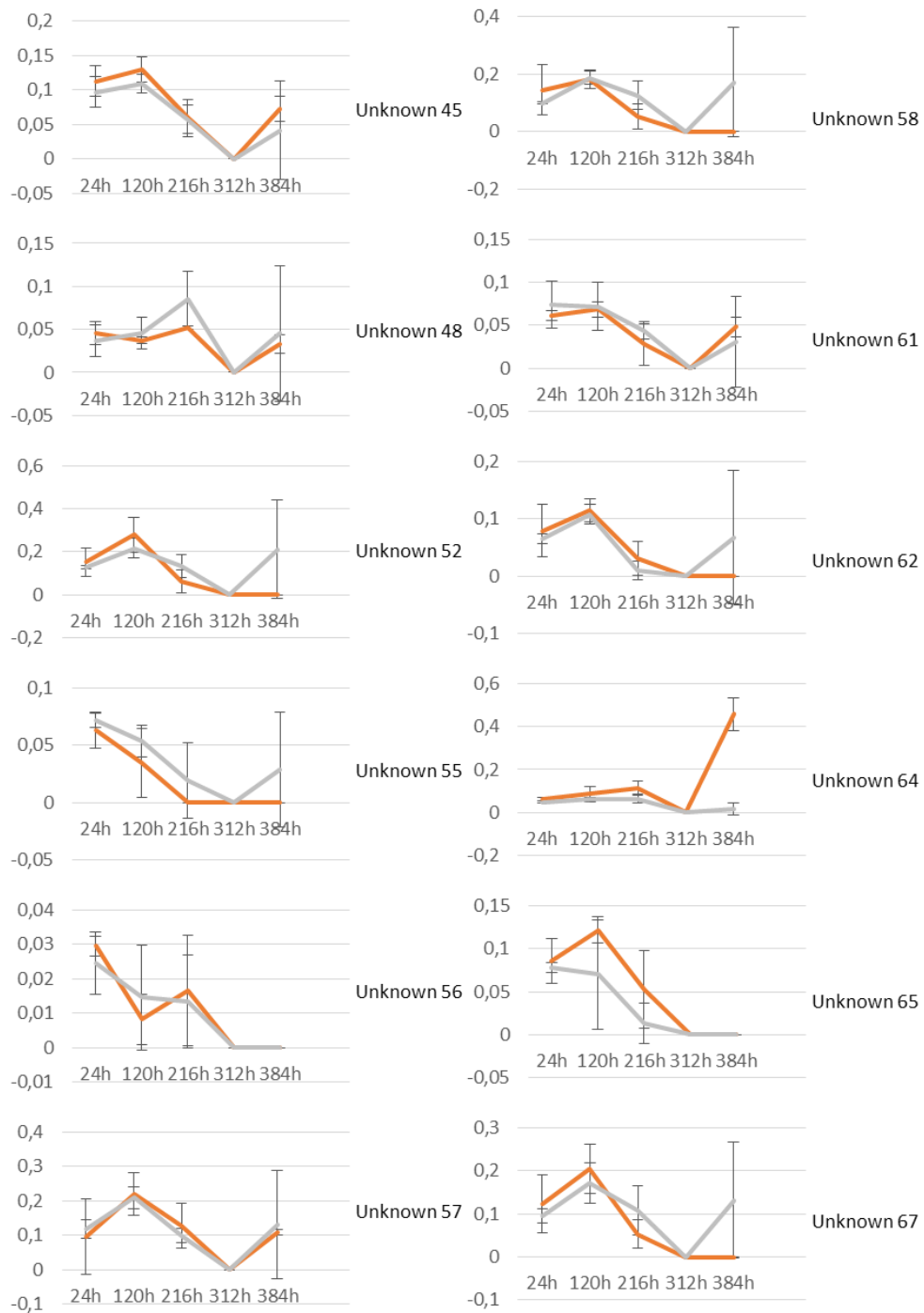


Figure 168. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés lors de la prise d'empreinte par GC-MS aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*. Les différents niveaux d'identifications sont indiqués par un code couleur (violet pour les composés identifiés, vert pour ceux annotés au niveau 1 et orange pour ceux annotés au niveau 2).

Polaire éthanol



Polaire éthanol



Polaire éthanol

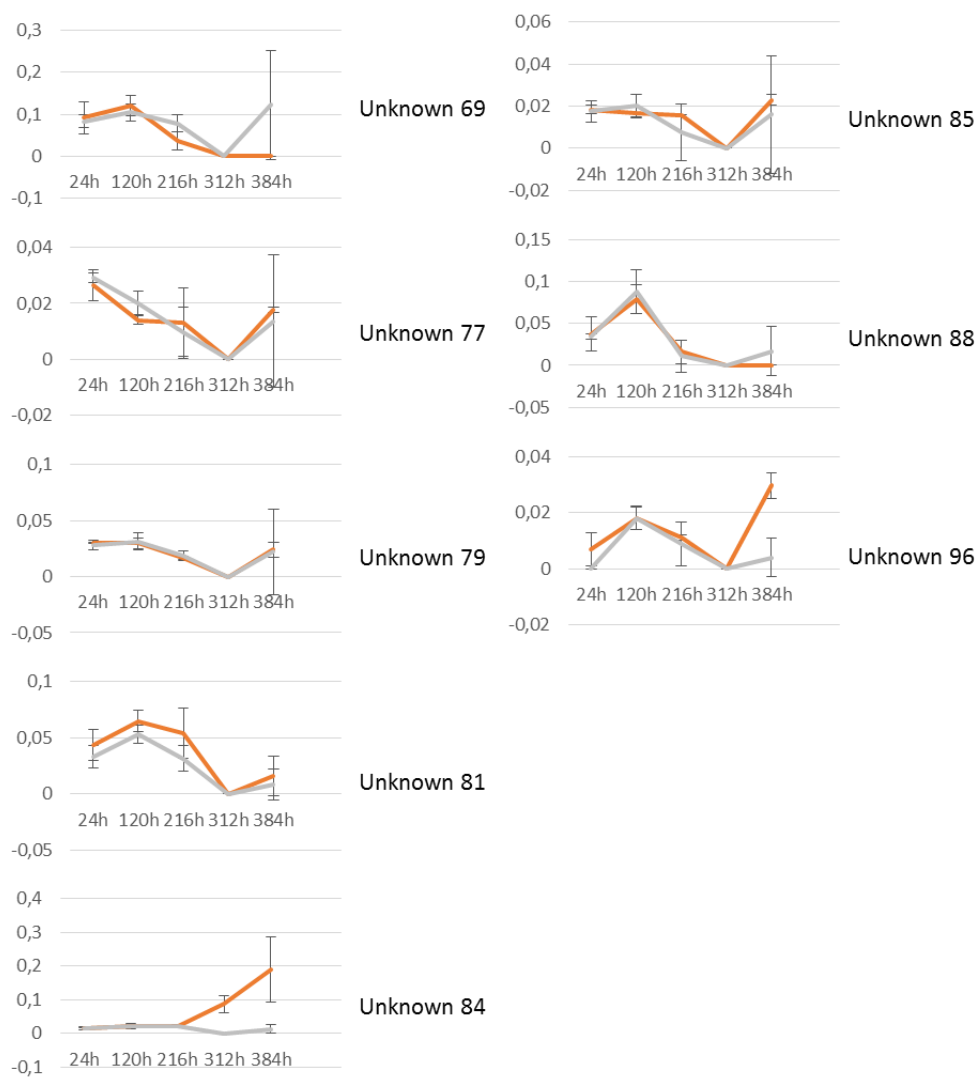


Figure 169. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés non identifiés lors de la prise d'empreinte par GC-MS aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

Un récapitulatif des données d'intensité relatives dans les échantillons sains et altérés à chaque point d'analyse pour les marqueurs d'altération identifiés est présenté ci-dessous.

Tableau 89. Données d'intensité relatives dans les échantillons sains (témoins) et altérés au cours de l'altération par la souche *E. faecium* pour chaque marqueur d'altération identifié dans les différentes fractions.

Echantillons	24h		120h		216h		312h		384h	
Glucose	12,676	+/- 1,3718	8,25244	+/- 2,8102	20,932	+/- 11,368	NA		3,9638	+/- 0,9341
Glucose	14,866	+/- 0,819	10,2179	+/- 3,1939	15,422	+/- 8,4892	NA		3,0073	+/- 0,9068
Isoleucine	1,4939	+/- 0,3608	1,55554	+/- 0,4243	1,1702	+/- 0,3996	1,14162	+/- 0,4929	2,0676	+/- 0,3374
Myo inositol	1,4562	+/- 0,2323	1,36008	+/- 0,1576	0,6736	+/- 0,2549	0,84508	+/- 0,1041	0,4183	+/- 0,1351
Acide lactique	0,1805	+/- 0,024	0,20579	+/- 0,0576	7,7266	+/- 1,1295	NA		11,266	+/- 4,6261
Cadaverine	0,3924	+/- 0,0361	0,45014	+/- 0,1351	0,3769	+/- 0,0188	0,27527	+/- 0,0697	0,4453	+/- 0,0374
Acide glutamique	0,9143	+/- 0,158	0,96922	+/- 0,2593	1,5299	+/- 0,373	4,2184	+/- 1,2244	2,3701	+/- 0,7143
Thrénine	0,6631	+/- 0,1088	0,69186	+/- 0,5011	1,1992	+/- 0,5535	4,77865	+/- 0,7179	3,6312	+/- 0,5581
Sérine	0,3476	+/- 0,0674	0,51461	+/- 0,1853	0,8085	+/- 0,3648	2,05773	+/- 0,3176	1,1853	+/- 0,6155
Cholesterol	0,1895	+/- 0,0413	0,21055	+/- 0,0413	0,1071	+/- 0,0335	NA		0,2798	+/- 0,1367
Phénylalanine	0,469	+/- 0,2257	0,63432	+/- 0,1468	0,4653	+/- 0,216	1,19919	+/- 0,298	1,2316	+/- 0,2689
Acide 3,4 dyhydroxybenzoïque	0,2267	+/- 0,0383	0,26888	+/- 0,0228	0,1263	+/- 0,0478	0		0,0775	+/- 0,0136
Acide oléique	0,1625	+/- 0,0154	0,17503	+/- 0,0241	0,0749	+/- 0,0212	0		0,1041	+/- 0,0362
Acide octanoïque	0,0984	+/- 0,0245	0,0994	+/- 0,0186	0,0798	+/- 0,0078	0		0,0673	+/- 0,0593
Hexadécane-1-ol	0,2214	+/- 0,1379	0,36284	+/- 0,2299	0		0		0	
Acide azélaïque	0,1514	+/- 0,0664	0,279	+/- 0,0819	0,0622	+/- 0,0543	0		0	
Acide aspartique	0,1234	+/- 0,0679	0,20489	+/- 0,0579	0,0528	+/- 0,0331	0		0	
Tryptophane	0,0434	+/- 0,0136	0,06489	+/- 0,0096	0,0536	+/- 0,0224	0		0,016	+/- 0,0179
Témoins	24h		120h		216h		312h		384h	
Glucose	19,448	+/- 1,4143	8,96291	+/- 2,2489	42,05	+/- 19,604	NA		33,338	+/- 24,255
Glucose	18,102	+/- 1,6076	11,0608	+/- 2,5261	35,108	+/- 14,861	NA		33,539	+/- 21,659
Isoleucine	0,6647	+/- 0,0022	1,26899	+/- 0,4133	1,1045	+/- 0,3281	0,11519	+/- 0,1995	1,4499	+/- 1,7798
Myo inositol	1,5729	+/- 0,4905	1,24484	+/- 0,2361	0,7405	+/- 0,0406	0,81283	+/- 0,5152	0,5094	+/- 0,3552
Acide lactique	0,1709	+/- 0,043	0,18515	+/- 0,0473	0,4363	+/- 0,0833	0,7887	+/- 0,2729	0,5766	+/- 0,3143
Cadaverine	0,3854	+/- 0,0375	0,39398	+/- 0,0726	0,4851	+/- 0,1417	0,14706	+/- 0,1274	0,5435	+/- 0,3055
Acide glutamique	0,7974	+/- 0,2899	0,82837	+/- 0,0864	0,7399	+/- 0,0338	1,02301	+/- 0,5286	0,5232	+/- 0,0554
Thrénine	0,5961	+/- 0,1279	0,66741	+/- 0,1474	0,7761	+/- 0,2081	0,97876	+/- 0,8619	1,3533	+/- 1,2298
Sérine	0,2561	+/- 0,0683	0,37418	+/- 0,0651	0,5755	+/- 0,271	0,31762	+/- 0,5501	0,7437	+/- 0,711
Cholesterol	0,1758	+/- 0,0382	0,22925	+/- 0,0906	0,1032	+/- 0,0427	NA		0,1395	+/- 0,0641
Phénylalanine	0,2854	+/- 0,0261	0,484	+/- 0,0674	0,2595	+/- 0,1242	0		0,0948	+/- 0,1015
Acide 3,4 dyhydroxybenzoïque	0,2319	+/- 0,029	0,27171	+/- 0,023	0,2155	+/- 0,0377	0		0,2271	+/- 0,2663
Acide oléique	0,1537	+/- 0,0513	0,2079	+/- 0,0555	0,0843	+/- 0,0172	0		0,1229	+/- 0,1507
Acide octanoïque	0,0924	+/- 0,0108	0,10288	+/- 0,027	0,0867	+/- 0,0208	0		0,0272	+/- 0,0472
Hexadécane-1-ol	0,2285	+/- 0,0552	0,29781	+/- 0,0555	0,1275	+/- 0,0469	0		0,1314	+/- 0,1515
Acide azélaïque	0,1263	+/- 0,0083	0,21579	+/- 0,0457	0,1307	+/- 0,0533	0		0,2106	+/- 0,2305
Acide aspartique	0,0962	+/- 0,0167	0,17156	+/- 0,0468	0,1077	+/- 0,0566	0		0,1315	+/- 0,1351
Tryptophane	0,033	+/- 0,0099	0,0533	+/- 0,0083	0,0315	+/- 0,0113	0		0,008	+/- 0,0139

- Profilage métabolique

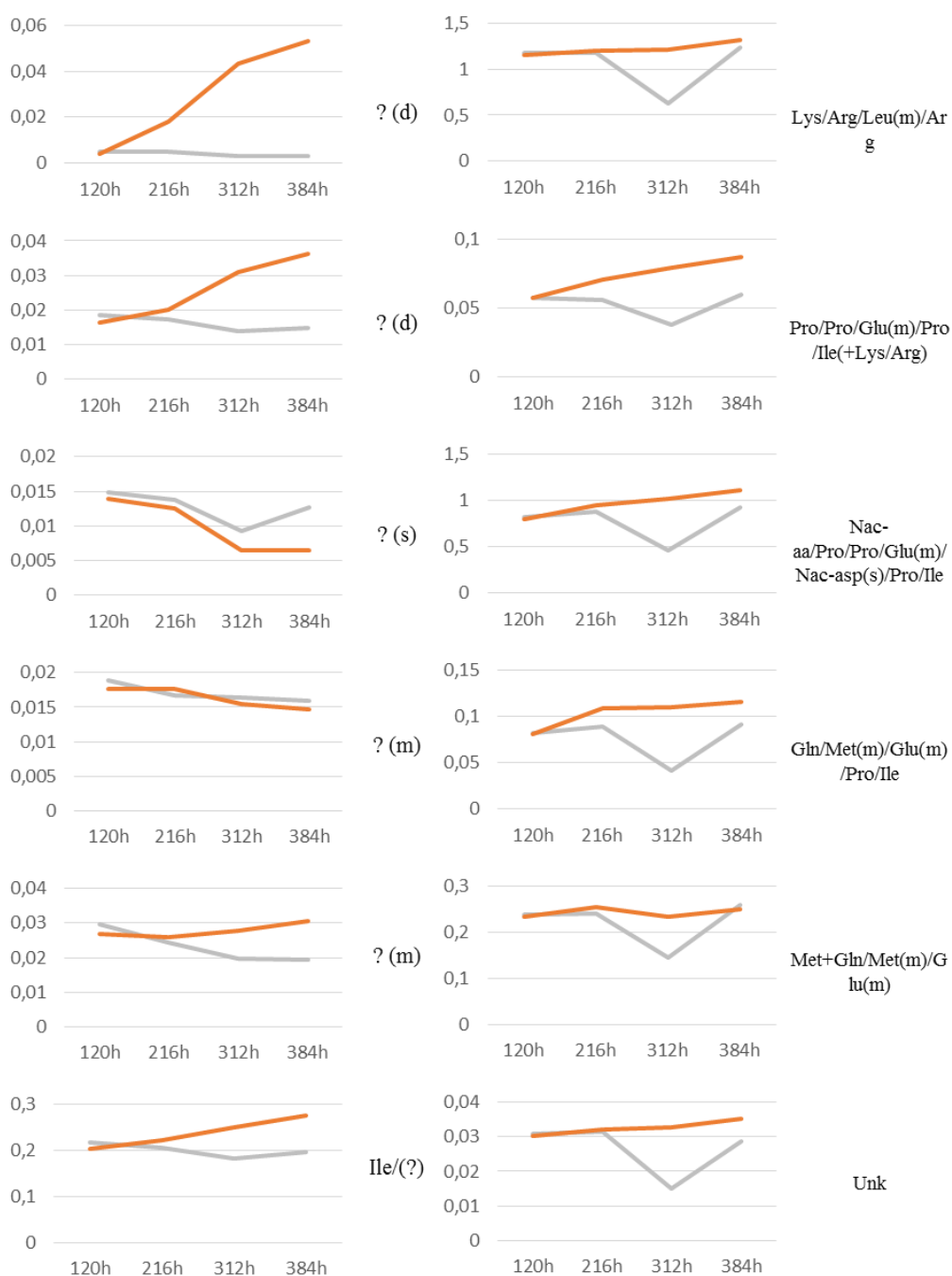
Comme précédemment, les composés quantifiables ont été analysés de manière quantitative en utilisant les courbes de calibration effectuées dans le cadre des développements méthodologiques. La liste des composés et leur concentration moyenne à chaque temps d'analyse sont présentées dans le Tableau 90.

Tableau 90. Concentration moyenne de chaque composé identifié quantifiable dans les données de prise d'empreinte par GC-MS aux temps d'analyse 24h, 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

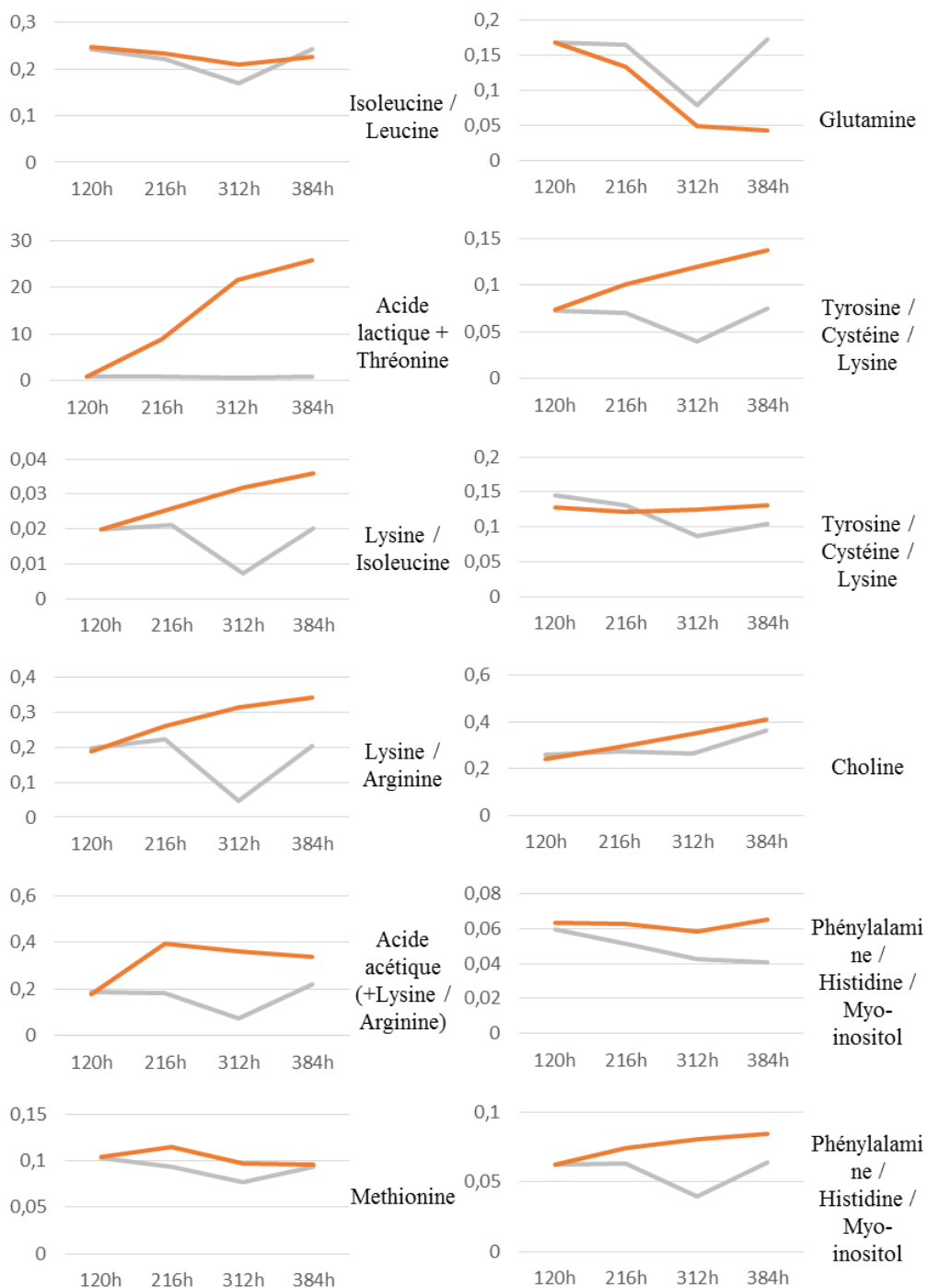
Echantillons															
	24h			120h			216h			312h			384h		
Glucose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Glucose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Isoleucine	0,28	+/-	0,01	0,28			0,27	+/-	0,06	0,22	+/-	0,03	Hors gamme		
Acide lactique	NQ			NQ			0,28	+/-	0,03	NA			0,31		
Thréonine	0,20	+/-	0,01	0,20	+/-	0,07	0,27	+/-	0,08	Hors gamme			Hors gamme		
Sérine	0,16	+/-	0,01	0,18	+/-	0,03	0,21	+/-	0,04	0,31	+/-	NA	0,26	+/-	0,08
Témoins															
	24h			120h			216h			312h			384h		
Glucose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Glucose	Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme			Hors gamme		
Isoleucine	0,19	+/-	0,00	0,24	+/-	0,02	0,26	+/-	0,05	0,05	+/-	0,08	0,11	+/-	0,16
Acide lactique	NQ			NQ			0,00	+/-	0,02	0,05	+/-	0,03	0,02	+/-	0,04
Thréonine	0,19	+/-	0,02	0,20	+/-	0,02	0,21	+/-	0,02	0,20	+/-	0,18	0,20	+/-	0,01
Sérine	0,14	+/-	0,02	0,16	+/-	0,01	0,18	+/-	0,04	0,08	+/-	0,13	0,16	+/-	0,14

Annexe HH. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés et non identifiés lors de la prise d'empreinte par RMN aux temps d'analyse 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

Polaire éthanol



Polaire éthanol



Polaire éthanol

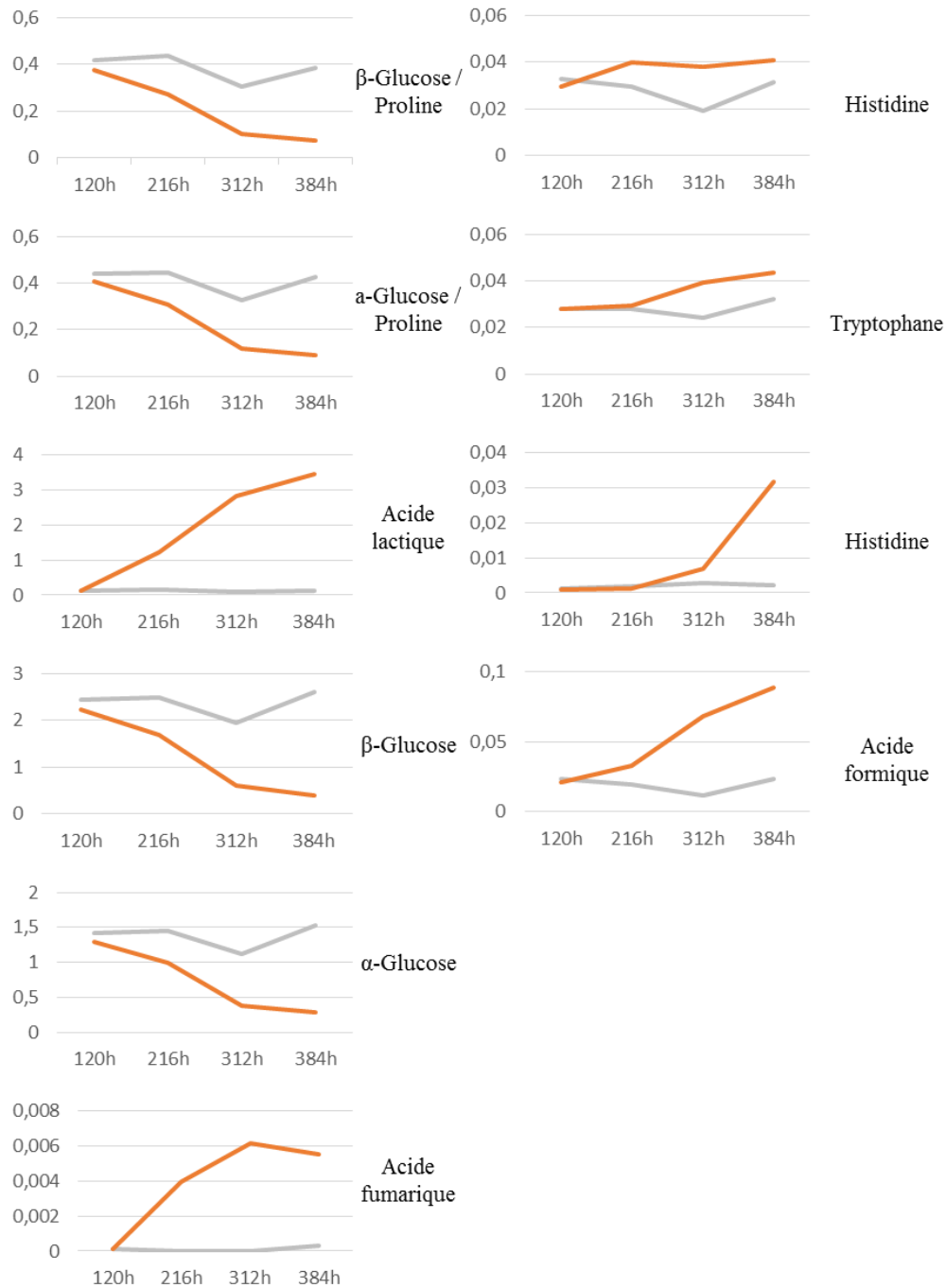
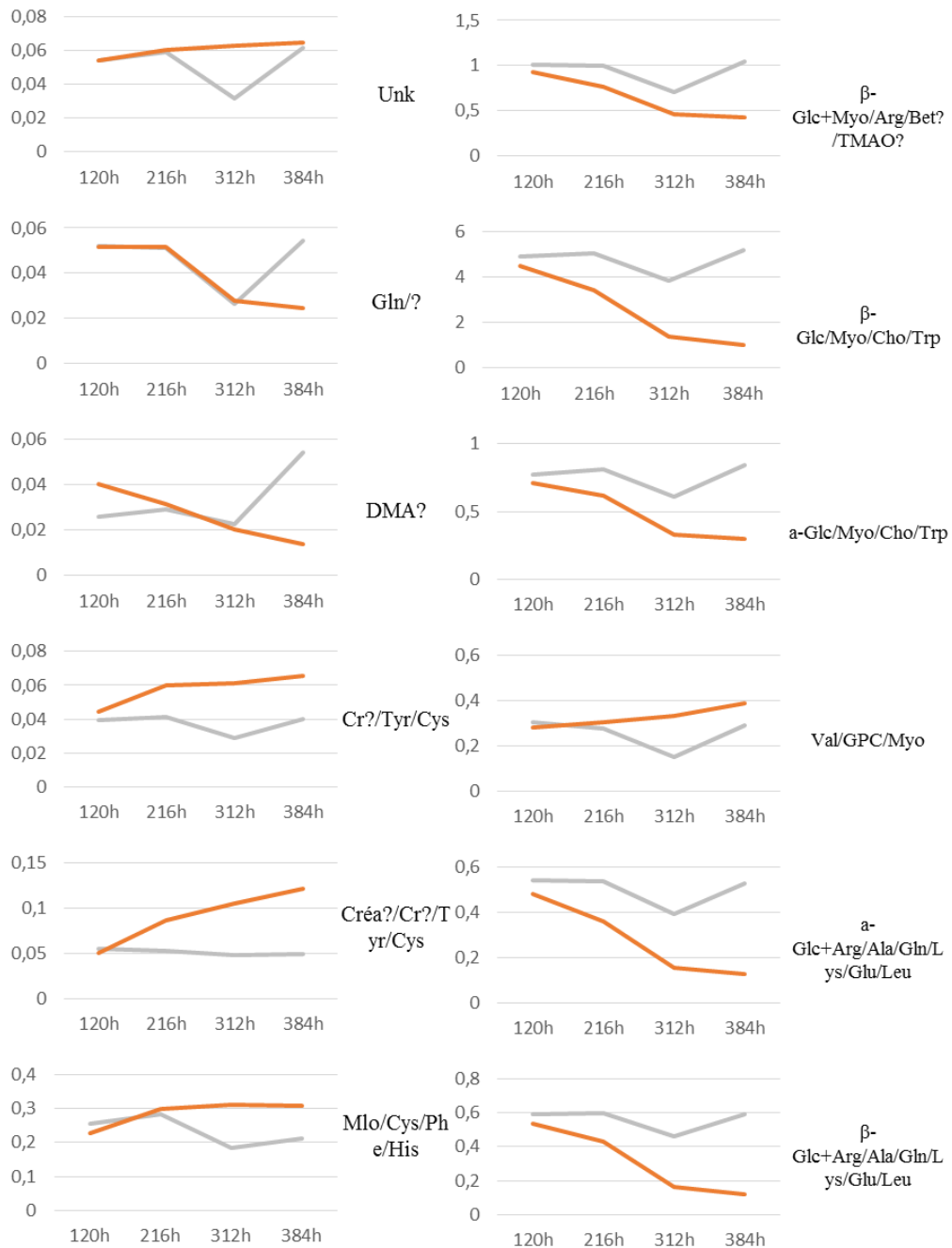
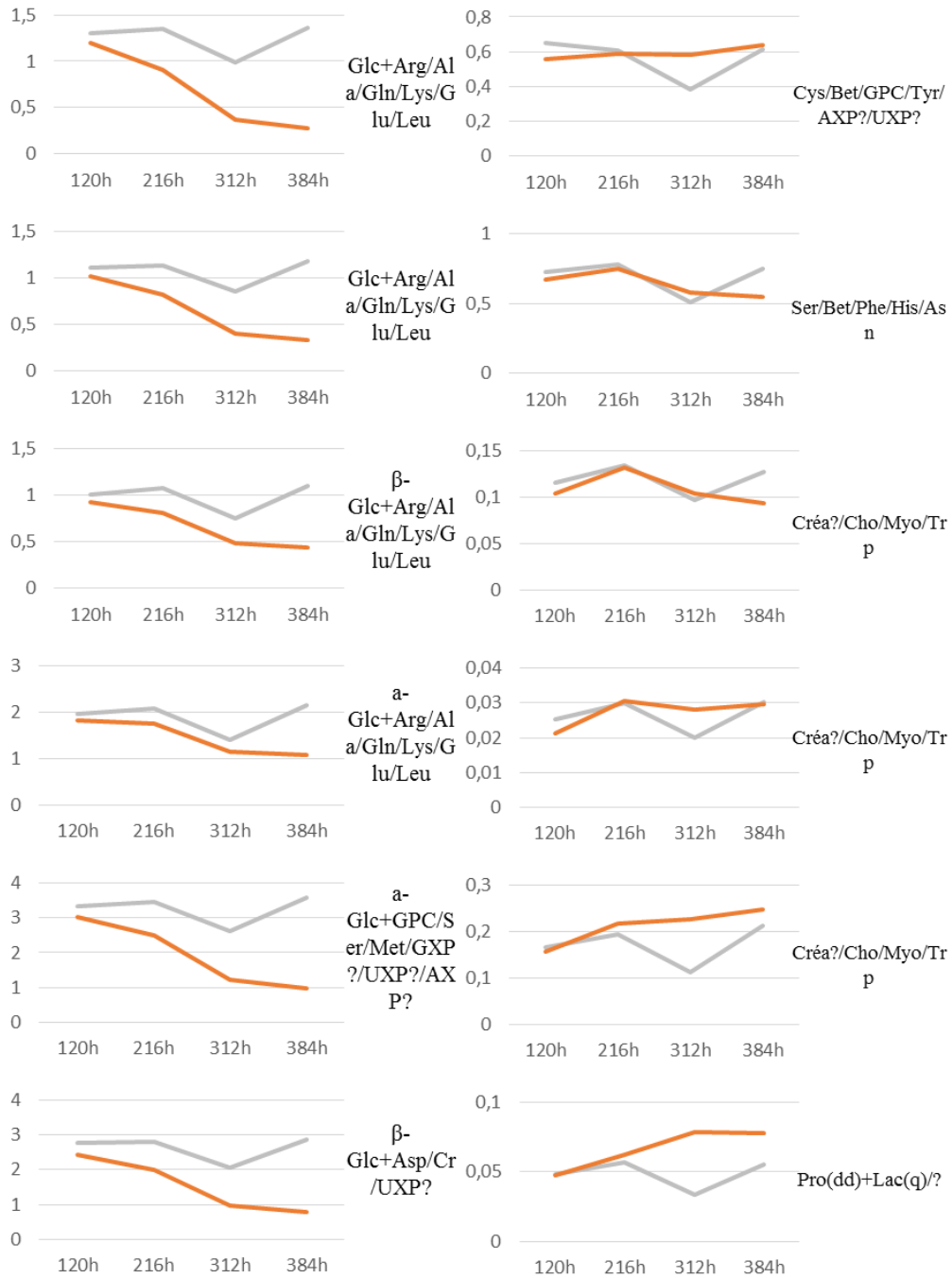


Figure 170. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés identifiés lors de la prise d'empreinte par RMN aux temps d'analyse 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

Polaire éthanol



Polaire éthanol



Polaire éthanol



Polaire éthanol

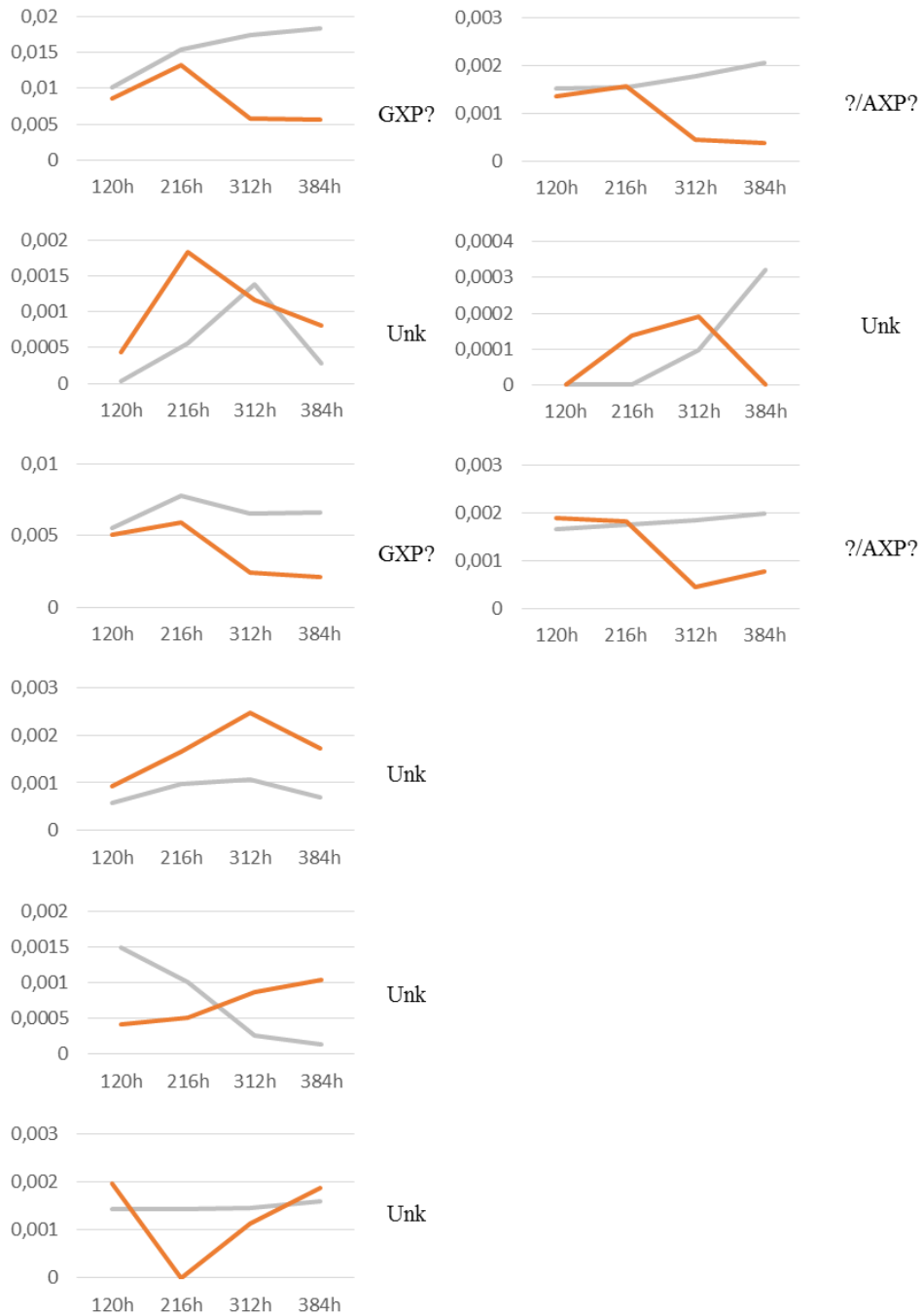


Figure 171. Evolution de l'intensité des signaux relatifs pour les composés non identifiés lors de la prise d'empreinte par RMN aux temps d'analyse 120h, 216h, 312h et 384h pour l'étude de l'altération avec la souche *E. faecium*.

Tableau 91. Données d'intensité relatives dans les échantillons sains (témoins) et altérés au cours de l'altération par la souche *E. faecium* pour chaque marqueur d'altération identifié dans la fraction polaire éthanol.

Echantillons	Echantillons				Témoins			
	120h	216h	312h	364h	120h	216h	312h	364h
Acide lactique + Thréonine	0,7843	8,8366	21,6207	25,8114	0,8133	0,8098	0,7020	0,9113
Lysine / Isoleucine	0,0197	0,0259	0,0320	0,0359	0,0198	0,0212	0,0073	0,0203
Lysine / Arginine	0,1895	0,2615	0,3133	0,3441	0,1985	0,2241	0,0473	0,2048
Acide acétique (+Lysine / Arginine)	0,1767	0,3935	0,3630	0,3401	0,1879	0,1844	0,0759	0,2222
Tyrosine / Cystéine / Lysine	0,0739	0,1006	0,1205	0,1380	0,0726	0,0705	0,0394	0,0750
Choline	0,2410	0,2929	0,3512	0,4118	0,2613	0,2739	0,2647	0,3631
Phénylalanine / Histidine / Myo-inositol	0,0632	0,0628	0,0585	0,0653	0,0598	0,0516	0,0427	0,0409
Phénylalanine / Histidine / Myo-inositol	0,0625	0,0739	0,0802	0,0846	0,0625	0,0632	0,0392	0,0638
Acide lactique	0,1168	1,2200	2,8420	3,4545	0,1267	0,1431	0,0993	0,1364
Acide fumarique	0,0001	0,0040	0,0062	0,0055	0,0001	0,0000	0,0000	0,0003
Histidine	0,0297	0,0397	0,0382	0,0411	0,0326	0,0295	0,0190	0,0314
Tryptophane	0,0279	0,0293	0,0394	0,0434	0,0280	0,0280	0,0242	0,0323
Histidine	0,0011	0,0014	0,0069	0,0316	0,0011	0,0019	0,0029	0,0023
Acide formique	0,0206	0,0328	0,0682	0,0887	0,0235	0,0194	0,0115	0,0231
Isoleucine / Leucine	0,2468	0,2324	0,2102	0,2262	0,2428	0,2217	0,1702	0,2430
Méthionine	0,1039	0,1143	0,0971	0,0961	0,1028	0,0937	0,0775	0,0931
β -Glucose / Proline	0,3768	0,2705	0,1014	0,0744	0,4182	0,4349	0,3027	0,3831
α -Glucose / Proline	0,4050	0,3085	0,1178	0,0904	0,4418	0,4433	0,3278	0,4273
β -Glucose	2,2254	1,6961	0,6083	0,4040	2,4407	2,4917	1,9403	2,6139
α -Glucose	1,2945	0,9928	0,3864	0,2823	1,4130	1,4562	1,1236	1,5222
Glutamine	0,1682	0,1342	0,0495	0,0423	0,1685	0,1651	0,0787	0,1730

Titre : Caractérisation des voies métaboliques et des marqueurs précoces de l'altération microbiologique des ovoproduits

Mots clés : Ovoproduits, altération, marqueurs précoces, profilage métabolique, prise d'empreinte métabolique, GC-MS, RMN

Résumé : L'ovoproduit est une matrice biologique complexe, constituée de protéines, lipoprotéines, lipides et de nombreux micronutriments (vitamines, minéraux, etc.). Cependant, une fois cassé et homogénéisé l'ovoproduit entier liquide perd une bonne part de ses propriétés de conservation, devenant ainsi pour certaines bactéries un excellent milieu de croissance. Ce développement bactérien non maîtrisé provoque en plus des risques sanitaires, des altérations biochimiques modifiant fortement les qualités organoleptiques de l'ovoproduit. On se propose dans cette thèse d'étudier les mécanismes biochimiques impliqués par des approches de métabolomique combinées (profilage métabolique par GC-MS et prise d'empreinte métabolique par GC-MS et RMN). Cette approche permettra de décrire et de comprendre de façon intégrée certains mécanismes jusqu'alors peu ou pas caractérisés et d'identifier in fine des marqueurs précoces de ces altérations microbiologiques.

Title : Microbiological alteration of egg products: Characterization of metabolic pathways and discovery of early prediction biomarkers

Keywords : Egg products, alteration, early prediction biomarkers, metabolic profiling, metabolic fingerprinting, GC-MS, NMR

Abstract : Egg products are complexes biological matrix constituted of proteins, lipoproteins, lipids and many micronutrient (vitamins, mineral, etc...). However, once broken and mixed, the liquid egg product loses a great deal of its keeping properties, thus becoming an excellent growth media for many bacteria. This uncontrolled bacterial development induces, beside the involved health risks, biochemical alterations which modify the product's organoleptic qualities.

This manuscript aims to study the involved biochemical mechanisms using combined metabolomics approaches (Metabolic profiling by GC-MS and metabolic fingerprinting by GC-MS and NMR). This approach will allow the description and understanding of certain mechanisms which characterization was previously absent or limited. It will also allow the identification of early prediction biomarkers of these biological alterations.