

## **Etude des composés organiques volatils responsables de l'odeur de verrat en vue du développement d'un capteur permettant la détection de cette odeur en abattoir**

**Auteur :** Vercruysse, Amélie

**Promoteur(s) :** Fauconnier, Marie-Laure

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2019-2020

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/10304>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**ÉTUDE DES COMPOSÉS ORGANIQUES VOLATILS  
RESPONSABLES DE L'ODEUR DE VERRAT EN VUE  
DU DÉVELOPPEMENT D'UN CAPTEUR  
PERMETTANT LA DÉTECTION DE CETTE ODEUR  
EN ABATTOIR**

**AMÉLIE VERCRUYSSÉ**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE  
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2019-2020**

**PROMOTEUR : PR MARIE-LAURE FAUCONNIER**



« Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique<sup>1</sup> de Gembloux Agro-Bio Tech. »

« Le présent document n'engage que son auteur. »

---

<sup>1</sup> Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT.

**ÉTUDE DES COMPOSÉS ORGANIQUES VOLATILS  
RESPONSABLES DE L'ODEUR DE VERRAT EN VUE  
DU DÉVELOPPEMENT D'UN CAPTEUR  
PERMETTANT LA DÉTECTION DE CETTE ODEUR  
EN ABATTOIR**

**AMÉLIE VERCRUYSSÉ**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE  
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2019-2020**

**PROMOTEUR : PR MARIE-LAURE FAUCONNIER**

Ce travail de fin d'études a été réalisé dans le Laboratoire de chimie des molécules naturelles à Gembloux Agro-Bio tech, ULiège.

Ce travail fait partie d'un consortium à l'initiative du pôle de compétitivité wallon pour le secteur agroalimentaire : Wagralim. Le projet vise au développement de capteurs dans le secteur agroalimentaire et s'appelle « Agrosensor ». Il est financé par la Région wallonne.

## 1. Remerciements

Au terme de ce travail de fin d'études, je souhaiterais exprimer ma gratitude à :

Madame le professeur et promoteur de ce travail : Pr Marie-Laure Fauconnier pour l'encadrement, ainsi que les relectures et conseils précieux.

Je souhaiterais également vivement remercier Clément Burgeon, mon encadrant, car c'est dans le cadre de son projet de doctorat que j'ai pu effectuer mon travail de fin d'études. Sans son aide, sa patience, sa bienveillance, ses connaissances, ses judicieux conseils et ses innombrables corrections, ce travail ne serait pas ce qu'il est.

Madame Syndic, Présidente du Jury, ainsi que tous les membres du Jury.

Enfin, ce travail n'aurait pu être réalisé sans les membres du laboratoire de chimie des molécules naturelles pour leur accueil et leur bonne humeur.

Je remercie donc tous les techniciens : Dany, Franck, Thomas et Saskia, de m'avoir épaulée tout au long de ce travail. Ainsi qu'à tous les autres assistants, doctorants, Tfistes pour leurs conseils, leur bonne humeur et leur enthousiasme à faire progresser la science.

Je tiens également à remercier le Professeur Yves Brostaux, du Laboratoire SIMa de la Faculté de Gembloux Agro-Bio tech, pour ses conseils dans l'analyse statistique de ce travail.

Enfin, mes vifs remerciements à toutes les personnes impliquées dans la réussite de ce travail et de mon cursus universitaire. Merci à toutes ces personnes présentes d'aider les étudiants et qui, grâce à leurs recommandations et conseils, m'ont permis de me sentir aiguillée et soutenue.

Et je tiens plus particulièrement à dire mille mercis à mes parents pour leur soutien et leur grande patience.

## 2. Résumé

De nos jours, le bien-être animal est de plus en plus plébiscité par la population. Le secteur agro-alimentaire s'adapte à ces tendances entre autres en réduisant le recours à la castration à vif des porcelets. Néanmoins, une odeur, appelée odeur de verrat, peut se développer chez une partie des porcs non castrés. Cette odeur, apparentée à une odeur d'urine et de fèces est relarguée lors de la cuisson de la viande par le consommateur. Aujourd'hui, les abattoirs déclassent les carcasses odorantes vers la filière de la charcuterie, en utilisant le nez humain comme discriminateur. Cependant, l'humain n'étant pas infaillible, le développement d'un capteur, capable de détecter cette odeur, est une solution plus sensée. Ce travail a donc pour objectif de contribuer aux premières étapes de développement de ce dit capteur.

Trois molécules sont principalement responsables de cette odeur : l'indole, le scatole et l'androsténone. Une méthode d'analyse de la teneur du gras en ces trois molécules devait être validée. Après une validation de plusieurs paramètres (linéarité, LOD et LOQ, effet de matrice, répétabilité et reproductibilité), il a été possible de faire une analyse d'un panel d'échantillons de gras de verrats. Trois groupes se sont dessinés: le premier avec un faible taux de ces molécules, un second avec un fort taux de molécules indoliques et un troisième, avec un taux élevé de scatole et d'androsténone prouvant la relation entre ces deux molécules.

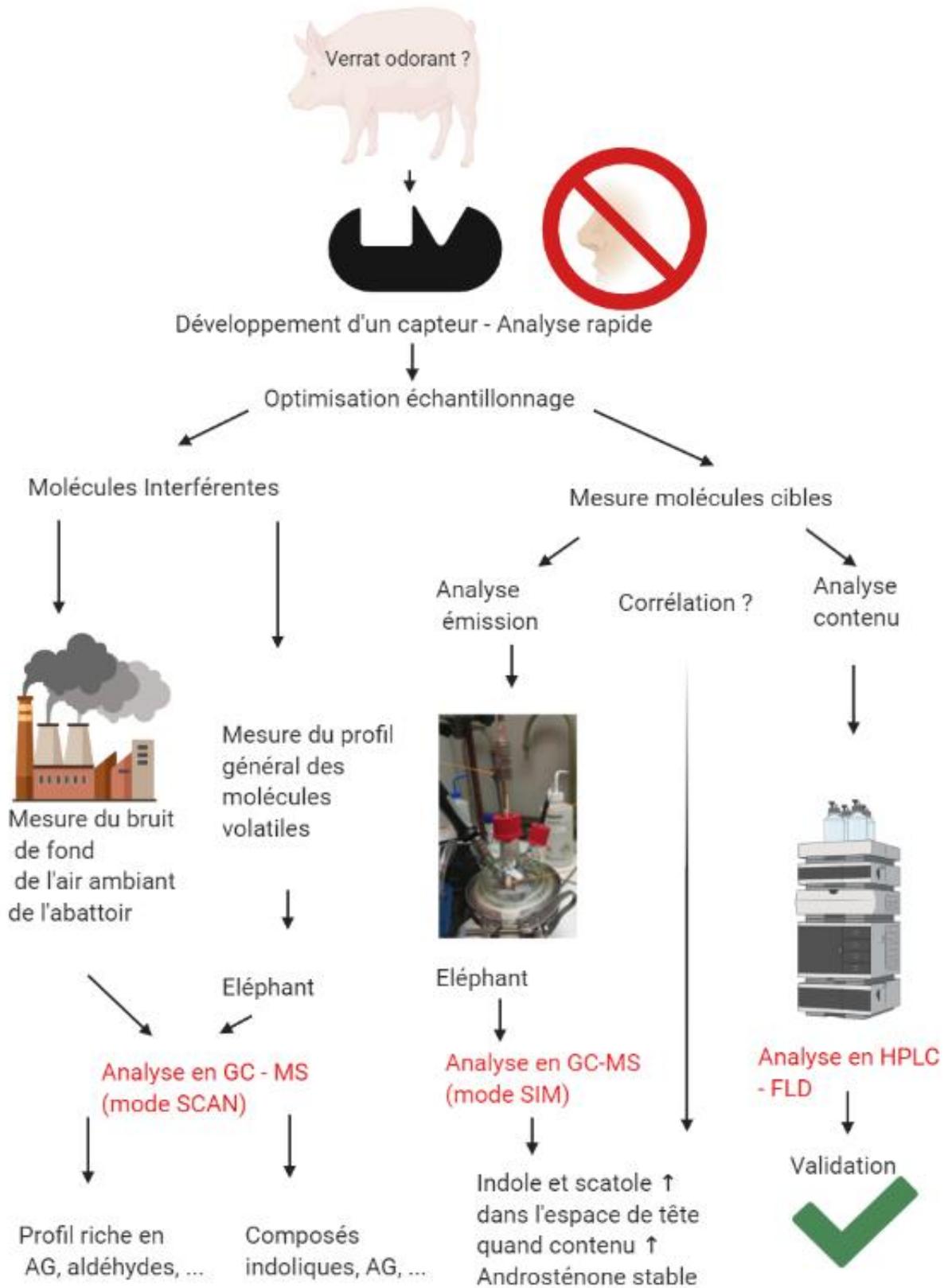
Une partie importante pour le développement du capteur est de connaître quels composés organiques volatils (COVs) sont retrouvés dans l'espace de tête du gras chauffé et à quelle concentration. Pour ce faire, un dispositif innovant a été créé et différents paramètres d'optimisation testés. Il en est ressorti que ce dispositif était en condition optimale lorsqu'il était fermé hermétiquement, que le morceau de gras était chauffé à 440°C pendant 30 secondes, et qu'un volume de 3750 mL/min était capturé sur des cartouches Tenax TA à un débit de 100 mL/min. Grâce à ce dispositif optimisé, une quantification en mode SIM des molécules d'indole, scatole et androsténone a pu être réalisée dans des échantillons de verrat odorant.

Une étude approfondie du profil aromatique sans à priori, en mode SCAN, a pu également être réalisée sur du gras de verrat odorant. A l'aide d'une analyse discriminante linéaire et par comparaison avec des profils aromatiques de truie et de verrat non-odorant, cette étude a permis de mettre en lumière des différences en termes de composés indoliques (indole et scatole) mais également pour des molécules moins attendues telles que : le tétradécane, l'acide undécanoïque, le décanone et l'heptadécanone dans le profil en COVs du verrat odorant.

Lors de l'élaboration du capteur, il est important de prendre en compte les potentielles interférences présentes dans l'air ambiant de l'abattoir. Ce profil a dès lors été étudié. Ce profil serait majoritairement composé de l'acide n-hexadécanoïque, du squalène, de l'acide 9-octadécénoïque, l'acide octadécénoïque et du nonanal.

Pour conclure, cette étude a permis d'effectuer une première analyse du profil aromatique de gras chauffé, de l'air ambiant en abattoir et, finalement, de développer un système de chauffe simulant des conditions proches de celles en abattoir.

MOTS CLES : odeur de verrat, indole, scatole, androsténone, COVs, capteur.



### 3. Abstract

In the past years, a drop in the number of piglets' surgical castration became apparent for animal welfare reasons. Nevertheless, an odor, called boar taint, can develop for some of pigs. This fecal- and urine-like odor is released when the meat is cooked by the consumer. Nowadays, slaughterhouses classify odorant and non-odorant carcasses using the human nose as a discriminator. However, human errors can lead to an incorrect classification. Developing a sensor capable of detecting this odor is hence a more sensible solution. This work therefore aims at contributing to the first stages of development of this sensor.

Three molecules are mainly responsible for this odor: indole, skatole and androstenone. A method allowing to quantify the boar fat's content in these three molecules had to be validated. After validation of several parameters (linearity, LOD and LOQ, matrix effect, repeatability and reproducibility), it was possible to analysis a batch of boar fat samples. Three groups were brought out: the first with a low level of these molecules, a second with a high level of indolic compounds and a third with a high level of skatole and androstenone, proving the relationship between these two molecules.

An important part for the development of the sensor is knowing which volatile organic compounds (VOCs) and at what concentration, are perceived in the headspace of the heated fat. To do this, an innovative device was created and various optimization parameters were tested. The optimal sampling conditions were, in a sealed environment, a heating temperature of 440°C for 30 seconds and a flow of 100 ml/min on the Tenax TA cartridges to capture a total volume of air of 3750 ml. Such device was used for two purposes. Firstly a quantification of the compounds of interest, indole, skatole and androstenone in SIM mode.

Secondly, an in-depth study of this aromatic profile was performed with data acquired in SCAN mode. This one was carried out through a qualitative study, complemented with a linear discriminant analysis. By comparison with the aromatic profiles of non-odorous and odorous boars, this analysis made it possible to highlight differences in terms of indolics compounds (indole and skatole) but also for less molecules such as: tetradecane, undecanoic acid, decanone, heptadecanone.

When developing the sensor, it is important to take account the potential interference present in the ambient air of the slaughterhouse. This profile has therefore been studied. This profile is mainly composed of n-hexadecanoic acid, squalene, 9-octadecenoic acid, octadecenoic acid, nonanal.

To conclude, this study made it possible to carry out a first analysis of the aromatic profile of heated fat, of the ambient air in the slaughterhouse and finally to develop a heating device simulating conditions similar to that used in slaughterhouses.

**KEYWORDS:** boar taint, indole, skatole, androstenone, VOCs, sensor.

## Sommaire

1.	Remerciements .....	A
2.	Résumé .....	B
3.	Abstract .....	D
4.	Liste des figures .....	G
5.	Liste des tableaux .....	H
6.	Table des abréviations .....	I
1.	Introduction au projet .....	1
2.	Bibliographie .....	2
2.1	Le porc .....	2
2.2	Molécules responsables de l'odeur de verrat .....	3
2.2.1	Introduction .....	3
2.2.2	L'androsténone .....	4
2.2.3	Le scatole et l'indole .....	7
2.2.4	Autres composés .....	10
2.2.5	Facteurs de variation – conduite d'élevage .....	10
2.2.6	Inhiber la production de ces molécules .....	15
2.3	Moyens de détection .....	17
2.3.1	Méthodes on-line – sur la ligne d'abattage .....	18
2.3.2	Méthodes en laboratoire .....	18
2.3.3	Méthodes off-line .....	26
2.4	Biocapteurs .....	26
3.	Objectifs et plan expérimental .....	31
4.	Matériels et méthodes .....	32
4.1	Matière première .....	32
4.2	Analyse quantitative du contenu par HPLC-FLD .....	32
4.2.1	Conditions d'analyse .....	33
4.2.2	Préparation des échantillons .....	34
4.2.3	Dérivatisation .....	34
4.2.4	Validation .....	34
4.3	Analyse quantitative des COVs émis lors de la chauffe du gras .....	35
4.3.1	Préparation de l'échantillon .....	35
4.3.2	Dispositif expérimental .....	35
4.3.3	Analyse par GC-MS .....	36

4.4	Analyse générale du profil en COVs de la graisse de truie, verrat non odorant et odorant.....	37
4.4.1	Échantillonnage.....	37
4.4.2	Analyse en GC-MS .....	37
4.4.3	Analyse statistique.....	38
4.5	Analyse du bruit de fond en abattoir .....	38
4.5.1	Échantillonnage de l'air .....	38
4.5.2	Analyse par GC-MS .....	38
5.	Résultats .....	39
5.1	Quantification de l'indole, scatole et androsténone contenus dans le gras via HPLC-FLD	39
5.1.1	Validation de la méthode.....	39
5.1.2	Quantification de l'indole, scatole et androsténone dans le gras de verrats odorants	45
5.2	Analyse des COVs.....	48
5.2.1	Bruit de fond en abattoir.....	48
5.2.2	Analyse des COVs par chauffe du gras de verrat.....	51
5.2.3	Étude du profil aromatique complet du gras .....	60
6.	Discussion générale.....	72
7.	Conclusion.....	73
8.	Perspectives.....	74
9.	Bibliographie.....	A

## 4. Liste des figures

Figure 1 : conformation moléculaire de l'androsténone (« PUB CHEM, » n.d.) .....	5
Figure 2 : chaîne de réaction formant l'androsténone dans les cellules de Leydig du porc (source conformation molécule : (« PUB CHEM, » n.d.)), d'après ( Parois et al., 2018). .....	6
Figure 3 : conformation moléculaire du scatole(a) et de l'indole(b) (« PUB CHEM, » n.d.)....	8
Figure 4 : Transformation du L-tryptophane en indole et scatole d'après (Deslandes, Gariépy and Houde, 2001) .....	8
Figure 5 : Métabolisme du scatole dans le foie (phase 1 et phase 2), d'après (Wesoly et al., 2012).....	9
Figure 6 : schéma réactionnel de la préparation générale de PEM (Cadinot, 2011).....	28
Figure 7 : fonctionnement d'un capteur à empreinte moléculaire d'après (Haupt et al., 2001) .....	30
Figure 8: schéma récapitulatif des objectifs .....	31
Figure 9 : processus de dérivation grâce au dansylhydrazine d'après (Hogard et al., 2017)...	33
Figure 10 : dispositif de scale down du capteur et une vue simplifiée de face du contact morceau de gras/fer à souder.....	36
Figure 11 : Chromatogrammes superposés d'un échantillon de truie (en rouge) et du même échantillon de truie dopés avec 500ng/g d'indole et scatole et 5000 ng/g d'androsténone (en bleu).....	40
Figure 12 : graphique général de la concentration en indole, scatole et androsténone des échantillons récoltés .....	46
Figure 13 : Comparaison des principaux COVs du verrat odorant et des COVs retrouvés en abattoir.....	50
Figure 14 : chromatogramme en GC-MS de l'injection de standard (indole, scatole et androsténone) et d'un standard interne (éthyle indole-2-carboxylate) dans le solvant, méthanol .....	51
Figure 15 : chromatogramme de l'injection de standard (indole, scatole et androsténone) et d'un standard interne (éthyle indole-2-carboxylate) dans la matrice grasse .....	52
Figure 16 : Graphique de l'aire relative des pics obtenus d'indole, scatole et androsténone par GC-MS par rapport au volume d'air pompé dans le dispositif dit de l'éléphant .....	55
Figure 17 : Aires relatives des pics d'indole, scatole et androsténone obtenus par GC-MS par le test 2 ; sans éléphant.....	56
Figure 18 : concentration d'indole et de scatole obtenue par GC-MS, avec éléphant et temps d'équilibrage.....	57
Figure 19 : Concentration en indole, scatole et androsténone par GC-MS en fonction du volume pompé sans temps d'équilibrage .....	58
Figure 20 : concentration en indole, scatole et androsténone par rapport au volume pompé obtenu par GC-MS .....	59
Figure 21 : Graphique de répartition de l'aire moyenne par molécule (seules les molécules avec une aire > 0,05% ont été prises en compte) dans l'analyse des échantillons de truie.....	67
Figure 22 : Graphique de répartition de l'aire moyenne par molécule (seules les molécules avec une aire > 0,05% ont été prises en compte) dans l'analyse des échantillons de verrat non odorant.....	67

Figure 23 : Graphique de répartition de l'aire moyenne par molécule (seules les molécules avec une aire > 0,05% ont été prises en compte) dans l'analyse des échantillons de verrat odorant.....	68
Figure 24 : Taux de reclassement des échantillons en classes suite à une ADL.....	69
Figure 25 : Graphique représentant la LD1 et LD2 découlant de l'ADL caractérisant les profils en COVs de truie (en bleu), verrat non odorant (en rouge) et odorant (en vert). .....	70

## 5. Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des méthodes d'analyse par chromatographie des molécules responsables de l'odeur de verrat (androsténone, scatole et indole) .....	22
Tableau 2 : Gradient d'élution en HPLC pour l'analyse des molécules responsables de l'odeur de verrat via détecteur à fluorescence .....	33
Tableau 3 : tableau des différents paramètres testés afin de déterminer le point de percée.....	36
Tableau 4 : Tableau des ions SIM se référant aux trois molécules d'intérêt (indole, scatole, et androsténone) .....	37
Tableau 5 : Tableau de données de calibration-linéarité de la méthode HPLC-FLD .....	40
Tableau 6 : Paramètres chimiques des molécules d'indole, scatole et androsténone .....	41
Tableau 7 : Rendement d'extraction de l'indole, du scatole et de l'androsténone en % .....	41
Tableau 8: Effet de matrice ; rapport des pentes des droites d'étalonnage dans le solvant et la matrice.....	42
Tableau 9 : Limite de détection et de quantification dans la matrice de gras pour l'indole, le scatole et l'androsténone .....	43
Tableau 10 : Précision de la méthode ; répétabilité et reproductibilité de l'indole, scatole et androsténone.....	44
Tableau 11 : facteur de correction appliqué aux échantillons lors de l'analyse par HPLC-FLD .....	45
Tableau 12 : Liste des molécules présentes lors du prélèvement d'air en abattoir (Nom de la molécule, son numéro CAS, l'index de rétention calculé et de la littérature ainsi que le pourcentage moyen de l'aire).....	48
Tableau 13 : Tableau récapitulatif des ions quantitatifs et qualitatifs de l'indole, scatole, éthyle indole-2-carboxylate et androsténone.....	52
Tableau 14 : Données de calibration de la méthode développée en GC-MS.....	53
Tableau 15 : Différents paramètres des cinq tests effectués afin de déterminer le point de percée .....	54
Tableau 16 : Paramètres finaux optimisés pour l'échantillonnage des COVs pour l'analyse en GC-MS .....	59
Tableau 17 : Concentration en indole, scatole et androsténone des échantillons odorants testés .....	60
Tableau 18 : Liste des COVs présents dans trois échantillons de truie, de verrat non odorant et de verrat odorant. (Nom de la molécule, son numéro CAS, l'indice de rétention calculé et de la littérature ainsi que le pourcentage moyen de l'aire) .....	61
Tableau 19 : Corrélation entre les concentrations obtenues en indole, scatole et androsténone via HPLC-FLD et GC-MS .....	65
Tableau 20 : Tableau des principales molécules caractérisant le LD1 et LD2 .....	69

## 6. Table des abréviations

Abréviations	Significations
MIP*	Polymères à empreinte moléculaire
LH *	Hormone lutéinisante
FSH*	Hormone folliculo-stimulante
GnRH*	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
LC*	Chromatographie liquide
HPLC*	Chromatographie liquide à haute performance
GC*	Chromatographie gazeuse
MS	Détecteur à spectromètre de masse
FID*	Détecteur à ionisation de flamme
NPD *	Détecteur azote – phosphore
FLD	Détecteur à fluorescence
ECD*	Détecteur à capture d'électron
UV	Détecteur à ultra-violet
SPME*	Micro-extraction sur phase solide
DHS*	Espace de tête dynamique
SHS*	Espace de tête statique
AND	Androsténone
SKA*	Scatole
IND	Indole
2- MID	2-méthylindole
COV	Composés organiques volatils
SIM*	Détection d'ion unique
TDU *	Unité thermique de désorption
CIS*	Système d'injection refroidi
ADL	Analyse discriminante linéaire

\* : Les abréviations sont gardées en anglais, forme courante dans la littérature scientifique.

## 1. Introduction au projet

Aujourd'hui, la consommation de viande de porc est la plus importante au niveau mondial. La maîtrise de toute la chaîne de sa fabrication est donc primordiale, tant de l'élevage à la commercialisation qu'à la phase l'abattage.

La population, dans un souci de bien-être animal grandissant, ne voit plus d'un bon œil la castration à vif des porcelets.

De ce fait, depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2018, de nombreux élevages en Europe ont décidé, sur base volontaire actuellement, de ne plus castrer les porcelets (The Commission of the European Communities, 2010). Cela a notamment, pour conséquence négative, une production potentielle de molécules odorantes. Les principales molécules responsables sont l'androsténone, le scatole et l'indole. Celles-ci libèrent une odeur désagréable, assimilable à des odeurs d'urine ou de fèces, lors de la cuisson de la viande, et entraînent le rejet de celle-ci par le consommateur. Un règlement européen (CE) n° 854/2004, rend impropres à la vente ces viandes contaminées notamment par une odeur sexuelle prononcée. De ce fait, les abattoirs écartent ces viandes « fétides » et peuvent les renvoyer vers la production de produits charcutiers.

La discrimination des carcasses sur les lignes d'abattage se fait par l'intermédiaire de l'homme. Ces opérateurs chauffent avec un fer à souder un morceau de graisse sur la carcasse (souvent le gras du cou) et hument l'odeur qui s'en dégage. Cette opération ne présente pas une précision sans failles et pérenne pour l'opérateur. De ce fait, une méthode infaillible doit être développée, elle doit être fiable et pratique pour les abattoirs. De plus, à ce jour, les alternatives mécaniques ne sont pas encore au point, suffisamment efficaces ou réalistes pour suivre la cadence élevée des chaînes d'abattage.

Le projet AGROSENSOR, projet du « pôle de compétitivité WAGRALIM », dont Gembloux Agro-Bio Tech – ULiège est partenaire avec, l'UMons, l'UCL, Matéria Nova, Unisensor, Walagri et Lovenfosse, vise à résoudre ce problème de détection des odeurs désagréables du porc (Boar taint, en anglais).

Une solution serait de mettre au point des capteurs de gaz composés de polymères à empreinte moléculaire (PEM ou MIP, en anglais). La détection de ces composés organiques volatils cibles (l'androsténone, le scatole et l'indole, en l'occurrence) permettrait, grâce à des capteurs, de détecter plus rapidement les carcasses positives, sans passer par des analyses plus complexes et coûteuses en laboratoire.

## 2. Bibliographie

### 2.1 Le porc

La viande la plus consommée mondialement est encore aujourd'hui celle de porc. Grâce aux changements des habitudes de consommation de certains pays émergents, la demande en viande porcine ne cesse de croître. Le secteur porcin ainsi que le secteur avicole subissent la croissance la plus forte dans le secteur de l'élevage. La production se répartit un peu partout dans le monde, sauf dans les régions où le porc n'est pas consommé pour des raisons culturelles ou religieuses (FAO, 2016).

La production de viande de porc en 2018 a été estimée à 120,5 millions de tonnes, le premier producteur étant la Chine (FAO, 2019). Le cheptel porcin européen, en 2018, était de plus ou moins 148 000 bêtes avec une production de 23 846 mille tonnes de viande. La Belgique représente 4,5% de cette production européenne de viande de porc (Eurostat, 2018). La production est très disparate entre la Flandre et la Wallonie. En effet, la Flandre produit 94,5% de la viande belge, tandis que la Wallonie n'en produit que 5,5%. Cette discrimination ne cesse de croître avec la diminution des petits éleveurs wallons au profit des grandes exploitations en Wallonie (APAQ-W, 2018).

Plusieurs races porcines sont élevées pour leur viande. Legault (1978) a classé les races en trois catégories :

- les races mixtes, elles améliorent la reproduction et la croissance ;
- les races spécialisées, tournées vers la production de viande ;
- les races rustiques.

L'élevage européen est dominé par la présence de trois races (APAQ-W, 2015), malgré quelques élevages mineurs de races rustiques telles que les IGP (porc du Sud-ouest et porc d'Auvergne).

Ces trois races sont :

- la Large White, porc d'origine anglaise, il est blanc à oreille droite. Il est notamment apprécié pour ses performances de reproduction et la qualité de sa viande ;
- le Landrace est un porc blanc à oreilles tombantes, au corps long et fuselé. Les truies sont surtout appréciées pour leur instinct maternel ;
- le Piétrain est un porc d'origine belge. Il tire son nom du petit village du Brabant Wallon où il est élevé depuis 1920. C'est un porc blanc tacheté de noir à oreilles droites. Il est très apprécié pour ses qualités culardes (musculature exceptionnelle et son excellent rendement carcasse (de 83%).

Cette capacité à produire plus de viande s'explique par la présence d'un gène particulier : le IGF2. Il explique 25% de différence entre la production du Piétrain et du Large White pour les principaux caractères conformationnels (Nezer *et al.*, 1999).

Ces races peuvent être élevées dans trois systèmes d'élevages commerciaux différents. Dans le monde et en Europe est des bâtiments sur caillebotis sont ceux que l'on rencontre le plus fréquemment. Les porcs y sont élevés sur un sol couvert de caillebotis permettant ainsi l'évacuation des excréments et de l'urine. Ce système est plus facile d'utilisation pour les fermiers afin de soigner, surveiller et nourrir leurs bêtes.

Le deuxième système est un bâtiment recouvert de litière. Le sol est couvert par de la sciure, de la paille... qui absorbent les excréments et urines.

Enfin, le dernier est un élevage en plein air, où les porcs sont élevés à l'extérieur muni d'un abri qui les protège du froid.

Chaque fermier peut décider de se spécialiser en tant que naisseur. Il élèvera alors les truies, les verrats et mettra au monde les porcelets afin de les élever jusqu'au sevrage. Il les enverra ensuite chez un second éleveur qui s'occupera de les engraisser en vue de les mener à l'abattoir. Enfin, certains fermiers décident d'exercer en cycle complet, de la naissance à l'abattage des animaux.

L'abattage des porcs, du porcelet au porc charcutier en passant par la truie de réforme, se fait dans un abattoir respectant un certain nombre de règles afin de garantir le bien-être animal et l'hygiène de la viande (exception des abattages à domicile). Les porcs, après une phase d'attente, seront étourdis, selon un des quatre systèmes européens autorisés : pistolet à tige perforante ou captive, percussion, électronarcose ou une exposition au dioxyde de carbone. Les porcs seront ensuite saignés afin de garantir une mort rapide, avant d'être accrochés à la ligne de préparation, échaudés, épilés, lavés, flambés et grattés. Les porcs seront alors acheminés dans le « secteur propre ». Ils y seront éviscérés, les carcasses fendues. Ils feront également l'objet de tests *post-mortem*, dont un afin de vérifier si la carcasse ne libère pas d'odeurs nauséabondes. Enfin, on procédera à un marquage de la viande, avant que celle-ci ne soit refroidie (Korsak, 2006).

## 2.2 Molécules responsables de l'odeur de verrat

### 2.2.1 Introduction

La castration des porcs est une pratique antique, la plupart du temps réalisée pour limiter les comportements agressifs et sexuels des jeunes porcs dans le but de faciliter leur manipulation (Chevillon et al., 2014 ; Parois, 2016). La castration est généralement réalisée par le fermier lui-même avant le septième jour du porcelet, comme l'autorise la directive européenne 2008/120/CE établissant les normes minimales relatives à la protection des porcs (European Union, 2008). Cette castration est pratiquée sans analgésique ou anesthésie.

Cependant, à l'heure actuelle, le bien-être animal fait de plus en plus partie des causes défendues par les consommateurs. Effectivement, la castration à vif du porcelet est reconnue comme douloureuse et entraîne régulièrement des complications (EFSA, 2004 ; Lefebvre, 2007). Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2018, une « Déclaration européenne sur les alternatives à la castration chirurgicale des porcs » propose aux signataires européens d'abandonner la castration chirurgicale chez le porcelet (The Commission of the European Communities, 2010).

De plus, la viande maigre est nouvellement privilégiée par le consommateur européen. Les porcs entiers génèrent des carcasses moins grasses et sont donc plus avantageux pour ce marché. Ils présentent en outre différents avantages : ils ont un meilleur taux de conversion (de 10%) et une croissance plus rapide des porcs est observée (EFSA, 2004 ; Zamaratskaia *et al.*, 2009 ;

Parois, 2016). Les porcs non castrés ont un taux d'acide gras polyinsaturé plus élevé dans la graisse et les muscles, ainsi qu'un taux de protéines également plus important dans leurs carcasses (Zamaratskaia *et al.*, 2009).

Toutefois, en dépit de ces avantages, cela pose malheureusement quelques inconvénients. Notamment, le développement de comportements agonistiques des porcs et des montes sur les congénères fréquentes. Ces comportements entraîneraient des lésions corporelles qui dévalorisent les carcasses (Parois, 2016). L'inconvénient majeur est le risque, pour les mâles non castrés, de développer des odeurs nauséabondes lors de la cuisson du gras ou de la viande. Ce risque est évalué entre 5 à 10% chez les porcs conventionnels, en fonction du seuil de tolérance retenu (Mathur *et al.*, 2012 ; Sørensen *et al.*, 2014 ; Parois, 2016), et ce chiffre peut être encore plus élevé chez les porcs bio (Sørensen *et al.*, 2015). Cette odeur caractéristique de verrat (appelé *Boar taint* en anglais) est principalement causée par trois molécules : l'androsténone, le scatole et l'indole (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Heyrman *et al.*, 2018 ; Parois *et al.*, 2018). L'indole est impliqué dans ce dégagement d'odeur, mais à un moindre degré, car le consommateur semble moins sensible à cette molécule. Ces trois composés sont lipophiles et s'accumulent donc particulièrement dans le gras du porc (Sørensen *et al.*, 2015 ; Parois *et al.*, 2018).

Lerche (1936), a été le premier scientifique à tenter d'expliquer l'origine de cette odeur déplaisante que dégageaient certains verrats. Il a réussi à mettre en évidence que celle-ci émergeait à la puberté et que la castration des porcs permettait de l'inhiber.

Craig, Pearson and Webb (1962) ont continué à identifier ces molécules responsables de cette odeur sexuelle et ont mis en évidence qu'elles se trouvaient dans la fraction non saponifiable du tissu adipeux animal. Patterson (1968) a été le premier à détecter et identifier la molécule d'androsténone, issue du testicule du porc. Deux ans plus tard, c'est Vold (1970) qui découvrit la molécule du scatole ; cette dernière provenait de la dégradation du tryptophane dans le côlon. Enfin, différents scientifiques ont mis en évidence que ces odeurs sexuelles ne provenaient pas totalement de ces deux molécules, mais également d'autres composés (Moss *et al.*, 1993 ; Babol *et al.*, 1995 ; Xue *et al.*, 1996). Seulement 50% de cette odeur s'explique par la présence de l'androsténone et du scatole (Parois, 2016).

La détection de ces carcasses positives des verrats les entraîne vers une chaîne de revalorisation de la viande en viande charcutière qui sera intégrée dans des saucisses, saucissons... (Meier-Dinkel *et al.*, 2016). Cependant, si une trop grande quantité de ces carcasses doivent être revalorisées, l'avantage économique de l'élevage de porcs non castrés s'effondre (Parois, 2016).

Il est à noter que ce problème d'odeurs peut également toucher les mâles castrés et les femelles en raison d'une teneur élevée en scatole et toucherait environ 5% des effectifs (EFSA, 2004).

### 2.2.2 L'androsténone

L'androsténone (*5 $\alpha$ -andros-16-en-3-one*) fait partie de la famille des stéroïdes (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Parois, 2016). Il peut se retrouver dans la sueur et l'urine des mammifères (Figure 1). Cette molécule se retrouve également dans la salive des porcins.

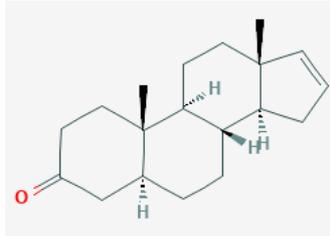


Figure 1 : conformation moléculaire de l'androsténone (« PUB CHEM, » n.d.)

Elle développe une odeur musquée (Sørensen *et al.*, 2015). Le taux de détection de cette molécule par le consommateur est de l'ordre de 0,5 à 50 ppm, mais la limite d'acceptation des carcasses fixée par les industriels est de 1 ppm (Zamaratskaia *et al.*, 2008 ; Sørensen *et al.*, 2015).

L'androsténone a une demi-vie dans la graisse de porc de quatre jours après castration (Parois *et al.*, 2018).

Le taux final d'androsténone dans le corps du porc est dû à la balance entre le stade de maturité de l'animal, sa capacité de stockage dans son gras, la biosynthèse, le catabolisme hépatique de cette molécule et son excrétion (Parois, 2016).

### 2.2.2.1 Synthèse

L'androsténone est biosynthétisée dans les cellules de Leydig des testicules du porc (Zamaratskaia *et al.*, 2008, 2009 ; Bekaert, 2012 ; Sørensen *et al.*, 2015). Il serait également produit par le cortex surrénal et l'ovaire, car une faible quantité a été détectée dans le plasma de la truie (Zamaratskaia *et al.*, 2009).

Le système neuroendocrinien contrôle la production de l'androsténone et des autres stéroïdes testiculaires. La régulation de production se fait sous l'influence de l'hormone lutéinisante (LH) et folliculo-stimulante (FSH) qui sont elles-mêmes sous le contrôle de l'hormone hypothalamique GnRH (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Bekaert, 2012 ; Parois *et al.*, 2018).

L'androsténone est une molécule résultant de nombreuses réactions (Figure 2). Son produit de départ est le cholestérol sanguin, qui passe dans les cellules de Leydig. De là, de nombreuses enzymes vont le transformer en cascade. La première enzyme à agir est le P450CC (codée par le gène CYP11A1). Cette enzyme transforme le cholestérol en prégnénolone, substrat pour d'autres hormones stéroïdiennes : les œstrogènes et les androgènes. La prégnénolone sera à son tour transformée par l'enzyme P450C17 (codée par le gène CYP17) en androstadiénol, elle-même convertie en androstadiénone sous l'action du 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes (codé par le gène HSD3B). La transformation finale en androsténone se fait via l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase (codée par le gène 5RD5A). L'androsténone va alors sortir de la cellule de Leydig et passer dans le sang.

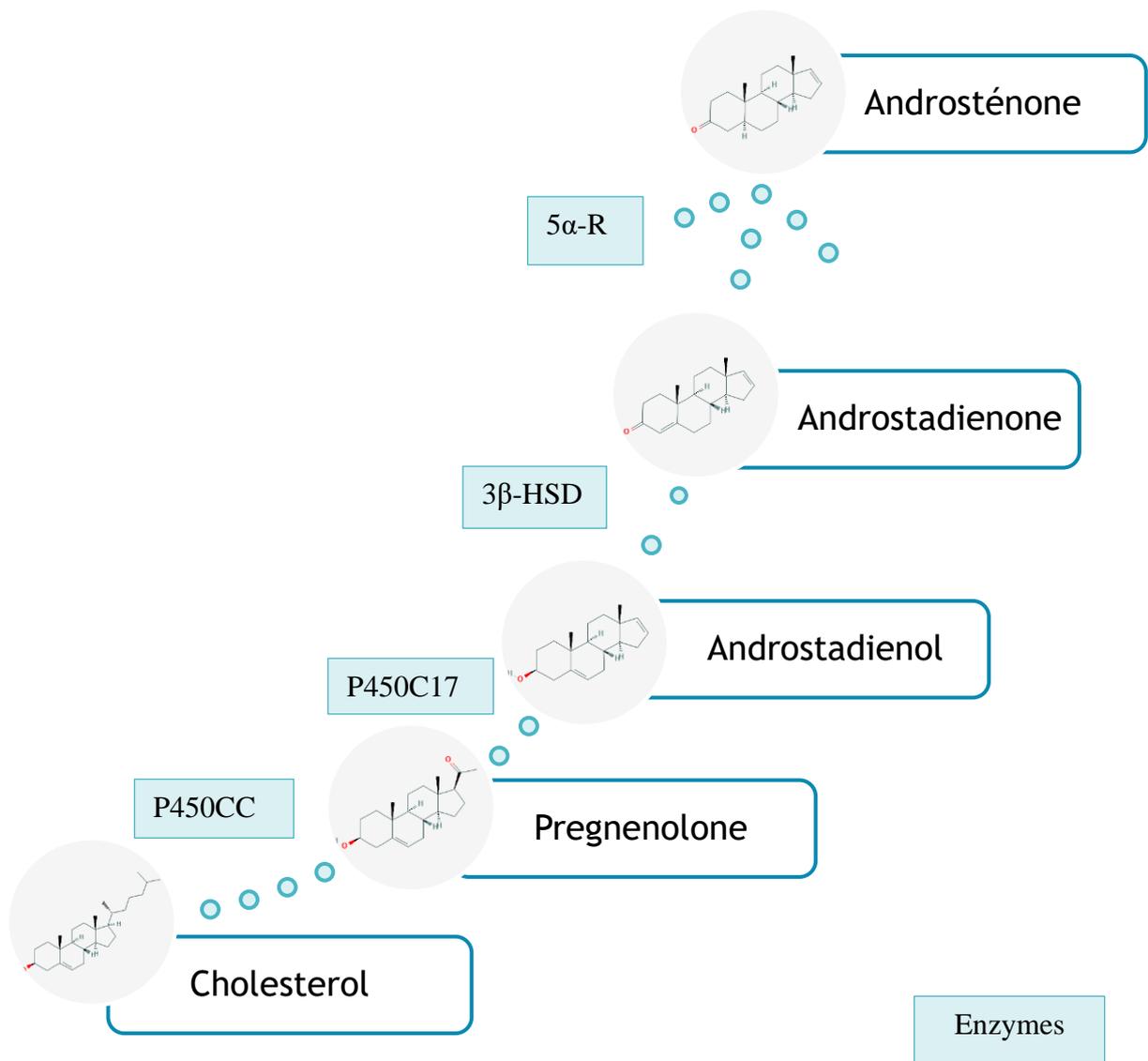


Figure 2 : chaîne de réaction formant l'androsténone dans les cellules de Leydig du porc (source conformation moléculaire : (« PUB CHEM, » n.d.)), d'après ( Parois *et al.*, 2018).

Une corrélation existe entre la synthèse de l'androsténone et l'œstrogène. Celle-ci est beaucoup moins importante avec la synthèse de la testostérone. Cependant, la synthèse de l'œstrogène et de l'androsténone n'a pas de lien de cause à effet. Effectivement, l'inhibition de la synthèse d'œstrogènes n'a aucun effet sur celle de l'androsténone (Parois *et al.*, 2018).

La biosynthèse de ces hormones stéroïdiennes est infime à la naissance du porcelet et est croissante jusqu'à la maturité sexuelle du cochon. Elle dépend donc du stade sexuel de l'animal (Zamaratskaia *et al.*, 2008, 2009). La synthèse de l'androsténone se décline en deux vagues. La première se déroule aux alentours de la deuxième à la quatrième semaine de

l'animal. La deuxième, plus élevée, se déroule à la quatorzième semaine de l'animal et l'intensité de production est très variable selon les individus (Bekaert, 2012 ; Parois, 2016).

L'androsténone circule dans le sang sous forme libre. Une partie sera captée par les glandes salivaires et excrétée à l'extérieur de la bouche pour jouer un rôle de phéromone sexuelle attractive (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Bekaert, 2012 ; Parois *et al.*, 2018). L'androsténone est liée dans cette salive du porc via la protéine phéromaxéine qui augmente sa solubilité (Parois *et al.*, 2018).

Une seconde partie de l'androsténone sera stockée dans les tissus gras intramusculaires, intra-abdominaux et sous-cutanés, et enfin, une dernière partie sera métabolisée dans le foie (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Parois *et al.*, 2018).

Le taux d'androsténone accumulé dans la graisse peut varier d'un porc à l'autre selon sa génétique. Un faible taux d'androsténone dans la graisse de l'animal peut notamment être expliqué par un polymorphisme mononucléotidique du gène cytochrome b5 de l'animal (Zamaratskaia *et al.*, 2008).

### 2.2.2.2 Métabolisme

Dans le testicule et dans le foie, l'androsténone est métabolisée en deux phases, mais de manière quasi immédiate (Bekaert, 2012).

La première, l'étape d'inactivation, fait intervenir les enzymes 3 $\beta$ - et 3 $\alpha$ -hydroxystéroïdes. La seconde phase, l'étape de conjugaison, fait appel aux enzymes conjuguées : hydroxystéroïdes sulfotransférases (SULT2A1 et SULT2B1) et UDP-glucuronoxyltransférases (UGTs). Cette étape permet d'ajouter un groupement phosphate ou glucuronyl, ce qui augmente ses propriétés hydrophiles et augmente l'élimination urinaire des métabolites (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Parois *et al.*, 2018).

L'androsténone va alors être métabolisée en 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol (3 $\alpha$ -androsténol) et en 5 $\alpha$ -androst-16-3 $\beta$ -ol (3 $\beta$ -androsténol). Ces androsténols seront ensuite métabolisés pour produire davantage de stéroïdes polaires (Zamaratskaia *et al.*, 2009).

Après métabolisation de l'androsténone, celle-ci sera excrétée hors de l'animal (Zamaratskaia *et al.*, 2009)

### 2.2.3 Le scatole et l'indole

Le scatole (3-méthylindole) et l'indole (2,3-benzopyrrole) (Figure 3) sont deux métabolites du tryptophane obtenus dans le tube digestif des mammifères. Tant le scatole que l'indole ont une odeur animale et fécale, l'indole en moindre mesure (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Bekaert, 2012 ; Sørensen *et al.*, 2015 ; Verplanken, Wauters, Durme *et al.*, 2016). À faible concentration, ces composés ont même une odeur florale et agréable. Ils sont d'ailleurs souvent utilisés dans l'industrie du parfum.

Dans la viande de porc, le taux de détection de scatole par l'humain serait de l'ordre de 0,15 à 0,25 ppm. (Zamaratskaia *et al.*, 2008 ; Sørensen *et al.*, 2015).

La demi-vie du scatole est beaucoup plus courte que celle de l'androsténone (Parois *et al.*, 2018), une heure dans le sang (Wesoly *et al.*, 2012).

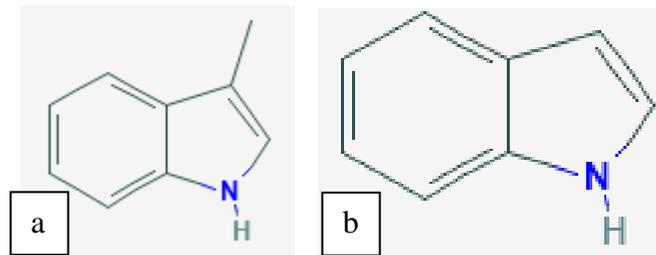


Figure 3 : conformation moléculaire du scatole(a) et de l'indole(b) (« PUB CHEM, » n.d.)

À l'heure actuelle, aucun rôle biologique n'a encore été trouvé pour le scatole porcin (Bekaert, 2012 ; Parois *et al.*, 2018).

Le taux final des composés indoliques dans le corps du porc est dû à la balance entre la biosynthèse et le métabolisme de cette molécule.

### 2.2.3.1 Biosynthèse

La production du scatole va être influencée par la nutrition de l'animal, sa génétique (le polymorphisme de l'enzyme thermostable phénolsulphotransférase), les conditions d'élevage et sa maturité sexuelle (Zamaratskaia *et al.*, 2008).

L'origine du scatole et de l'indole est due à l'acide aminé L-tryptophane. Cette transformation a lieu dans l'intestin, et plus particulièrement dans l'intestin des porcs (Zamaratskaia *et al.*, 2008, 2009). La formation de scatole est prédominante dans le rectum, tandis que l'indole est principalement produit dans le cæcum (Bekaert, 2012).

La transformation de l'indole se fait via la production d'un produit intermédiaire : l'indole pyruvate (Parois, 2016).

La transformation du scatole s'effectue en deux étapes. Le tryptophane sera d'abord transformé en acide 3-indolacétique, grâce aux bactéries *Escherichia coli* et *Clostridium spp.* Cet acide 3-indolacétique sera ensuite transformé par les bactéries *Lactobacillus* et *Clostridium* en scatole (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Bekaert, 2012). De ce fait, la production en scatole est limitée par la disponibilité en tryptophane dans l'intestin. L'origine et la quantité disponible du tryptophane proviennent notamment de la fraction indigestible des aliments et sont en partie endogènes ; cela est dû au renouvellement des cellules intestinales et du recyclage du tryptophane bactérien (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Parois *et al.*, 2018).



Figure 4 : Transformation du L-tryptophane en indole et scatole d'après (Deslandes, Gariépy and Houde, 2001)

La synthèse du scatole est similaire chez le porc entier, le porc castré et la truie, malgré une composition bactérienne intestinale différente (Bekaert *et al.*, 2012 ; Parois *et al.*, 2018), mais à des taux différents selon que l'on observe des porcs entiers, des truies et des porcs castrés

(Parois, 2016). La synthèse de l'indole est également produite par d'autres monogastriques ainsi que par les bovins et les espèces caprines (Bekaert, 2012).

Après synthèse, le scatole et l'indole seront en grande partie éliminés par les fèces et l'urine. L'autre fraction sera absorbée par la muqueuse intestinale et circulera dans le sang.

La circulation sanguine va transporter le scatole et l'indole jusqu'aux tissus adipeux afin d'en stocker une partie (Parois *et al.*, 2018). La teneur en scatole dans les tissus adipeux va dépendre du genre (mâles entiers, cochettes, mâles castrés) de l'animal (Bekaert *et al.*, 2012). L'autre partie du scatole sanguin va passer par la veine porte afin d'être métabolisé dans le foie (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Bekaert, 2012 ; Parois *et al.*, 2018).

### 2.2.3.2 Métabolisme

Le métabolisme va dès lors principalement se dérouler dans le foie de l'animal en deux phases.

La première est l'ajout d'un groupement hydroxyle, principalement via les cytochromes P450 (CYP). Le métabolisme oxydatif se fait donc via deux isoformes, enzymes majeures : le CYP2E1 et le CYP2A6 et via l'aldéhyde oxydase (Zamaratskaia, Chen, *et al.*, 2006 ; Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Bekaert, 2012). Sept métabolites sont ainsi produits, majoritairement avec 45%, c'est le 3-hydroxy-3-méthylindolémine. Les six autres sont : 3-hydroxy-3-méthylindole, 5-hydroxy-3-méthylindole, 6-hydroxy-3-méthylindole, 3-méthylindole, indole-3-carbinal et 2-aminoacétophénone (Zamaratskaia *et al.*, 2009).

Pour la deuxième phase, certains de ces métabolites serviront de substrats pour la conjugaison avec l'uridine-di-phosphate-glucuronosyltransférase (UGT). L'enzyme principalement responsable est le phenolsulphotransférase thermostable (SULT1A1). Plusieurs métabolites sont également formés, majoritairement le 5-sulphatoxyscatole et deux autres : le 6-sulphatoxyscatole et le 5-hydroxy-scatoleglucuronide (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Wesoly *et al.*, 2012).

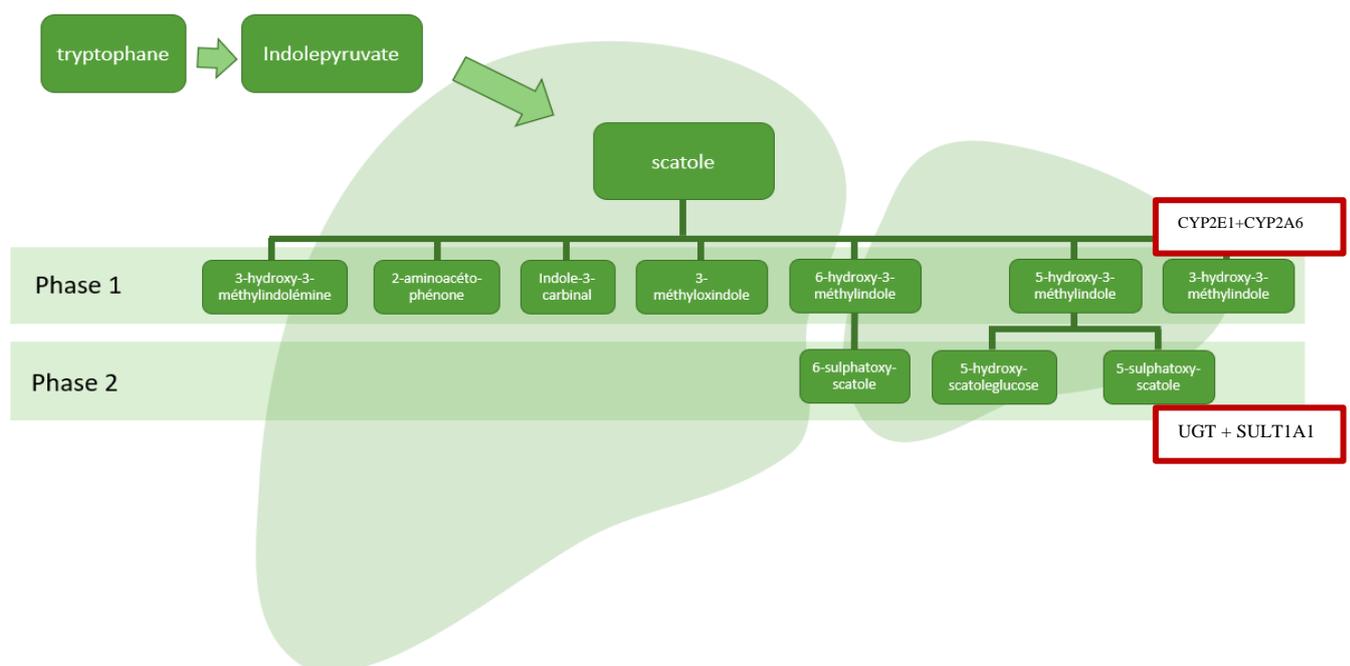


Figure 5 : Métabolisme du scatole dans le foie (phase 1 et phase 2), d'après (Wesoly *et al.*, 2012)

Le taux d'androsténone et d'autres hormones stéroïdiennes, contrôlées par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, augmentent lors de la puberté de l'animal, tout comme le taux de scatole. Le lien entre ces deux taux de molécules serait la régulation hépatique du scatole par ces stéroïdes testiculaires. En effet, les stéroïdes auraient une influence négative sur la production d'enzymes impliquées dans le catabolisme du scatole, et en particulier CYP2E1 et CYP2A. L'androsténone entrerait en compétition vis-à-vis du CYP2E1 par rapport au scatole et entraînerait une diminution du métabolisme de ce dernier (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Parois, 2016).

#### 2.2.4 Autres composés

D'autres composés, en moindre mesure, seraient également responsables de l'odeur caractéristique des verrats non castrés. Les autres molécules qui y contribuent sont les stéroïdes C16, les androsténols, le 4-phenyl-3-buten-2-one, le styrène et le 1,4-dichlorobenzène (Babol *et al.*, 1995 ; Rius *et al.*, 2005 ; Bekaert, 2012). Le P-crésol et le 4-éthylphénol, composés phénoliques, contribuent également à l'aspect caractéristique de ces odeurs désagréables (Patterson, 1968 ; Bekaert, 2012).

Les aldéhydes et les acides gras à courte chaîne sont également influents. Soit ils favorisent la perception du scatole et de l'androsténone, soit ils contribuent eux-mêmes à cette mauvaise odeur (Xue *et al.*, 1996 ; Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Serra *et al.*, 2014). Le 2-aminoacétophénone serait également un contributeur de l'odeur de verroat (Fischer, Gerlach, *et al.*, 2014) ainsi que le 4,16-androstadien -3-one et l'acide isovalérique (Bekaert, 2012).

#### 2.2.5 Facteurs de variation - conduite d'élevage

La production d'androsténone, de scatole et d'indole est très variable d'un animal à l'autre. Plusieurs facteurs de variation de cette production entrent en jeu. Ils peuvent être intrinsèques (p.ex. le génotype) ou extrinsèques (p.ex. l'alimentation et l'environnement social).

##### 2.2.5.1 Âge, poids vif et maturité sexuelle

Le taux d'androsténone dans le corps du porc a tendance à croître avec l'âge. Effectivement, la production de cette hormone sexuelle augmente avec le stade de puberté, tout comme la testostérone et l'œstradiol (Babol *et al.*, 2004 ; Parois, 2016). La maturité sexuelle dépend elle-même de composantes environnementales et génétiques, donc la production d'androsténone testiculaire, le métabolisme et la capacité à stocker le gras varient entre les porcs. (Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Parois *et al.*, 2018). La date d'abattage est souvent proche du début du stade de puberté du porc. C'est dans ce cadre que les porcs à forte teneur en androsténone et ayant une maturité précoce posent problème.

La maturité sexuelle influence le taux d'androsténone et de testostérone. Les porcs qui ont donc une maturité précoce atteindront donc plus rapidement un taux important en androsténone (Parois, 2016).

La synthèse du scatole est, quant à elle, moins reliée au facteur de l'âge ou de la maturité sexuelle du porc (Parois *et al.*, 2018).

Le poids vif de l'animal est également lié à l'âge de l'animal, et donc aussi à la concentration en hormones sexuelles. Pour minimiser les risques d'odeur de verrat, l'abattage devrait s'effectuer avant que la bête n'atteigne les 120 kg. (Heyrman *et al.*, 2018 ; Parois *et al.*, 2018).

Plus le porc est gros, plus la teneur en androsténone dans sa graisse sera élevée, mais la teneur en scatole et indole n'est pas affectée par le poids vif de la bête (Chen *et al.*, 2007 ; Heyrman *et al.*, 2018).

### 2.2.5.2 Génotype

La teneur en androsténone et scatole dépend de la race de l'animal à poids égaux.

Les porcs non castrés issus des races Landrace et Yorkshire, typiquement utilisées en lignée maternelle, ont une concentration en androsténone plus élevée que la race Piétrain, typiquement utilisée en lignée paternelle. Les mâles de la race Duroc et Large white semblent, quant à eux, avoir une concentration encore plus élevée en androsténone (Babol *et al.*, 2004 ; Parois, 2016 ; Parois *et al.*, 2018).

Quelques locus responsables de la concentration en androsténone et/ou scatole semblent se trouver sur les chromosomes 6,7,10 et 14. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, aucune mutation ne semble produire un effet direct sur les taux de ces deux molécules (Parois *et al.*, 2018).

L'héritabilité du scatole et de l'androsténone peut être évaluée. Le facteur d'héritabilité<sup>2</sup> du scatole est estimé de 0,19 à 0,55. L'héritabilité de l'androsténone est, quant à elle, évaluée entre 0,25 et 0,88 selon les races (Tajet *et al.*, 2006 ; Merks *et al.*, 2009 ; Aluwé, Millet, *et al.*, 2011 ; Baes *et al.*, 2013). L'héritabilité de l'androsténone peut être diminuée de génération en génération grâce à la sélection. Toutefois, cette sélection orientée peut générer des conséquences négatives sur la reproduction, le gain quotidien et la perte en graisse intramusculaire (Parois, 2016 ; Heyrman *et al.*, 2018).

### 2.2.5.3 Facteur nutritionnel - conduite alimentaire

La synthèse du scatole se fait à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane, dans l'appareil digestif de l'animal. De ce fait, il est possible d'agir sur la synthèse du scatole via l'alimentation fournie à l'animal (Chen *et al.*, 2007 ; Parois, 2016). Il y a moyen d'agir sur trois axes : le premier est la disponibilité du tryptophane dans le côlon, le second porte sur l'orientation des fermentations bactériennes, et enfin, le troisième sur l'élimination (fécale) du scatole produit.

Une solution est de favoriser les bactéries consommatrices de tryptophane (autres que celles qui favorisent la production de scatole).

---

<sup>2</sup> Définition : L'**héritabilité** est une statistique estimant le degré d'influence probable des facteurs génétiques pour un phénotype donné, dans une population donnée. Les héritabilités sont sans dimension ; ce sont des proportions, qui varient donc de 0 à 1 (ou de 0 à 100 %, si on les exprime en pourcentage) (Marmion, 2008).

Plusieurs modifications de la nourriture peuvent également être apportées pour diminuer la concentration en scatole (Lefebvre, 2007 ; Parois, 2016).

Une diminution de la source en protéines telles que les tourteaux diminuerait de fait la fraction indigestible. Cependant, il faut veiller à compléter l'alimentation avec des acides aminés de synthèse pour satisfaire les besoins du porc (Parois *et al.*, 2018).

Une augmentation de la ration en fibres fermentescibles, telles que la fécule de pommes de terre crue (Zamaratskaia, Chen, *et al.*, 2006), conduit à une stimulation bactérienne. Le tryptophane est alors incorporé dans les protéines bactériennes et n'est dès lors plus disponible pour la production de scatole. De plus, la fermentation de ces fibres a également pour effet d'augmenter la production de butyrate. Le butyrate inhibe l'apoptose<sup>3</sup> des colonocytes, et réduit donc la disponibilité des débris cellulaires, et en conséquence, du tryptophane endogène, nécessaire à la production de scatole (Claus *et al.*, 2003 ; Parois *et al.*, 2018). Enfin, le troisième aspect positif est l'accélération du transit, ce qui favorise l'élimination fécale du scatole (Gaudré, 2011 ; Parois, 2016).

Cependant, les fibres apportent un effet « barrière » à l'action des enzymes digestives (pepsines et peptidases) sur les polypeptides et augmentent d'autant plus la fraction indigestible, substrat à la production de scatole (Parois, 2016).

Il est également possible de jouer sur des compléments afin de diminuer la production de ces molécules. Par exemple, un apport d'amidon cru de pommes de terre (20%), ou de chicorée (15%) ou de lupin (25%), riche en inuline, permettrait de diminuer la teneur en scatole, mais produirait néanmoins un effet négatif sur la croissance (Loesel *et al.*, 2006 ; Chen, 2007 ; Gaudré, 2011 ; Parois *et al.*, 2018). Un pourcentage de 10 % de lupin n'aurait quant à lui aucune influence sur la teneur en scatole ou sur la croissance du porc (Parois *et al.*, 2018).

Étant donné la courte demi-vie du scatole, une mise à jeun des porcs suffisamment longtemps avant l'abattage permettrait de réduire le taux de scatole ainsi que de faciliter l'abattage des porcs (Wagenberg *et al.*, 2013).

Il faut toutefois aussi veiller à ne pas trop augmenter le pH afin de ne pas favoriser le développement de bactéries tel que *Lactobacillus sp. 11201*, grande productrice de scatole chez le porc (Parois, 2016).

La nutrition n'influence pas la production d'androsténone (Zamaratskaia, Chen, *et al.*, 2006) et d'indole (Chen *et al.*, 2007).

Il est donc important de porter une attention toute particulière à la nourriture du porc et de son microbiote pour évaluer une potentielle augmentation ou diminution de production du scatole par le porc. Il s'avérera en outre nécessaire d'étudier le rapport bénéfice-risque de tout changement d'aliments, afin d'éviter un surcoût de production sans produire d'effet sur la production de scatole.

---

<sup>3</sup> Définition : L'**apoptose** (ou **mort cellulaire programmée**) est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées par l'organisme à la suite d'un signal.

#### 2.2.5.4 Environnement physique

Au changement de la photopériode de la fin d'été/début d'automne, le taux de testostérone et d'androsténone est au maximum (Claus *et al.*, 1983 ; Parois, 2016 ; Heyrman *et al.*, 2018). Cependant, il est difficile de le mettre en lumière, car d'autres paramètres peuvent également influencer : la propreté, le renouvellement d'air... Le maintien d'une photopériode artificielle mimant les jours courts aurait pour conséquence d'accélérer la maturité sexuelle, mais surtout d'augmenter le taux d'androsténone et de scatole dans la masse grasseuse (Parois, 2016).

Un autre paramètre d'influence de la production est la température dans la porcherie. Si la température atteint un seuil critique, de 17° à 22°C, le porc, ayant trop chaud, aura tendance, dans le but de réguler sa température, à se rouler dans ses excréments. Ce qui a pour conséquence une absorption dermique du scatole présent dans les excréments (Lefebvre, 2007 ; Parois *et al.*, 2018). Une température élevée a également pour conséquence de produire une volatilisation des molécules, et donc une absorption par les voies respiratoires du scatole, également présent initialement dans les déjections (Parois *et al.*, 2018).

Des loges sales constituent donc un facteur d'augmentation de taux de scatole dans le corps des porcs. Ce phénomène se déroule essentiellement dans les élevages avec caillebotis partiel.

Aluwé, Bekaert, *et al.* (2011), ont réalisé une expérience pendant cinq semaines avec deux groupes de porc. Le premier était lavé tous les jours, et les porcs de l'autre groupe ont été frictionnés tous les jours avec des excréments. Aucune différence au niveau de la concentration des molécules odorantes entre les porcs n'est apparue. Tandis qu'un test sensoriel avec des consommateurs a démontré que ces derniers émettaient un avis défavorable sur la viande provenant des porcs « sales ».

De plus, les cochons sont des animaux fouisseurs, ils ont donc tendance à fouiller les excréments et, de ce fait, à réabsorber le scatole et à modifier leur microbiote intestinal.

En conclusion, si l'on désire maintenir des taux bas en molécules odorantes, il est préférable de maintenir les loges propres, de bien ventiler et de réguler la température de la porcherie (EFSA, 2004).

Une autre cause de l'augmentation de sécrétion d'androsténone, scatole et indole par l'organisme est le temps passé et les conditions de transport des animaux vers l'abattoir. Les animaux doivent passer le temps le plus court et serein possible lors du transport (Heyrman *et al.*, 2018).

#### 2.2.5.5 Environnement social

L'environnement social du porc peut également influencer son taux de molécules responsables de l'odeur de verrat. Effectivement, les interactions sociales entre porcs, les agressions, les comportements de monte etc. modifieront le développement sexuel du porc et, en conséquence, augmenteront les niveaux d'androsténone et de scatole (EFSA, 2004). Trois paramètres sociaux peuvent déterminer une variation de synthèse de ces molécules : la dominance, la taille du groupe et la mixité du groupe.

La cohorte porcine est régie par des relations de dominants–dominés. Le rang de dominance correspond à la place de l’individu dans la hiérarchie de ce groupe (Drews, 1993). La hiérarchie complète d’un groupe de porcs est établie 48h après le premier contact, et les remises en cause de cet ordre établi sont moyennes à faibles. Chez le porc, il existe une corrélation entre dominance, comportement agressif et la concentration en androgènes, particulièrement la testostérone. La testostérone est une composante du comportement agressif et influence l’établissement de la hiérarchie porcine. L’androsténone est sécrétée en parallèle de la testostérone. *In fine*, le rang de dominance semble influencer la teneur en androsténone des porcs, sans incidence sur les performances de croissance et le comportement alimentaire (Parois, 2016).

La concentration en androsténone chez le porc dominant est plus élevée que chez le porc dominé. De plus, la concentration élevée chez un porc entraîne une augmentation d’androsténone également chez les porcs du même groupe. Toutefois, élever les porcs en loge individuelle ne semble pas apporter de bénéfices sur la concentration en androsténone dans le plasma et le flux sanguin. De plus, la sociabilisation diminue les comportements indésirables et augmente le bien-être animal (Parois *et al.*, 2018).

La taille du groupe influence également la production d’androsténone et de scatole. Des groupes plus petits, de moins de dix individus auraient une incidence positive sur une production moindre de ces molécules chez ces porcs (Wagenberg *et al.*, 2013).

Les avantages de la mixité dans les groupes de porcs d’un point de vue de la production d’androsténone et de scatole ne sont pas encore clairement mis en avant. Les études actuelles sont contradictoires. Certaines prédisent une diminution de production, alors que d’autres prévoient une augmentation de cette production (Parois, 2016).

#### 2.2.5.6 État de stress et santé

Le stress module le développement sexuel de l’animal, la composition de son microbiote ainsi que l’activité hépatique de CYP2E1 (Parois *et al.*, 2018). Vu le lien entre le stress et les fonctions digestives chez le porc, la production en scatole est influencée indirectement par le stress de l’animal (Lefebvre, 2007).

Merlot, Thomas and Prunier (2013) ont démontré que la santé du porc est liée à la concentration des molécules odorantes chez le porc. Effectivement, le nombre de lymphocytes circulants et une diminution du poids du thymus sont observés chez le porc castré en comparaison au porc entier. Il y a donc un effet positif des stéroïdes sexuels sur le fonctionnement du système immunitaire du porc.

Si le porc a un état de santé dégradé en étant victime d’une infection, son corps développera une réponse inflammatoire. Cela perturbera le métabolisme, ce qui a pour conséquence de réquisitionner les acides aminés pour la synthèse des protéines de la phase aiguë dans le foie. Cela a pour conséquence de diminuer le taux de croissance et le développement testiculaire de l’animal (Parois, 2016).

Lors d’une réaction inflammatoire de l’organisme, l’axe corticotrope du porc va être stimulé, les cytokines seront alors synthétisées, ce qui va provoquer une action inhibitrice sur

l'axe gonadotrope, et donc une baisse de synthèse des stéroïdes sexuels (Diemer *et al.*, 2003 ; Parois, 2016)

Plus particulièrement, les infections digestives provoquent une variation de la concentration en scatole dans les tissus adipeux chez le porc entier due à la modification du microbiote intestinal. Cela est donc lié à l'augmentation de la synthèse ou à la diminution du catabolisme du scatole. Cette infection peut être à l'origine de lésions de la muqueuse intestinale. Celles-ci vont provoquer une augmentation de la teneur en tryptophane disponible pour la transformation et donc, *in fine*, augmenter la synthèse de scatole. Cette infection intestinale engendre également une diminution de l'expression du gène cytochrome hépatique P450, impliqué dans le catabolisme du scatole et provoque donc une diminution de la dégradation du scatole déjà produit (Skrlep *et al.*, 2012 ; Parois, 2016 ; Parois *et al.*, 2018)

### 2.2.6 Inhiber la production de ces molécules.

La solution la plus connue et la plus utilisée à ce jour pour réduire les risques de développement d'odeur de verrat reste encore la castration physique des porcelets.

Cette castration consiste à l'extirpation des testicules, en les libérant des tissus périphériques et en coupant nettement le cordon spermatique. Cela provoque l'inhibition des fonctions testiculaires (Mainau *et al.*, 2013) .

Les avantages de la castration sont : une diminution des comportements agressifs et de monte chez les verrats, ainsi qu'une qualité supérieure de la viande et du gras. Cependant, des effets négatifs sont présents à l'occasion d'une castration. Le castrat aura un gain journalier moins élevé, une excrétion d'azote supérieur et une teneur élevée en graisse, ce qui influe sur le coût de la carcasse (Bonneau *et al.*, 2019). Enfin, cette castration physique provoque une douleur et un stress immédiats chez le porcelet, ainsi qu'une douleur postopératoire de cinq jours et, occasionnellement, des infections (Mainau *et al.*, 2013 ; Bonneau *et al.*, 2019). Cette douleur est illustrée par des cris déchirants, une résistance comportementale, une augmentation de la fréquence cardiaque, une augmentation du taux d'adrénaline, de noradrénaline et de cortisol chez le porcelet (Bonneau *et al.*, 2019) et entraîne même, à plus long terme, une fragilisation du système immunitaire, des modifications hormonales et du stress (Lefebvre, 2007).

La douleur est induite par la castration chez les porcelets, quel que soit leur âge. Cependant, il semblerait qu'elle soit moins importante avant les dix jours de l'animal (Mainau *et al.*, 2013). Toutefois, il convient de se rappeler que la directive européenne 2008/120/CE interdit la castration des porcelets de plus de sept jours sans anesthésie ou analgésie. Après cette date anniversaire, la castration doit être effectuée par un vétérinaire sous anesthésie et/ou analgésie (European Union, 2008). De plus, des acteurs européens de la filière porcine se sont engagés en date du 1<sup>er</sup> janvier 2018 à abandonner la castration chirurgicale (The Commission of the European Communities, 2010).

Afin de réduire les douleurs de l'animal et de penser à son bien-être, diverses solutions parallèles existent. Ces différentes solutions sont évoquées par l'EFSA : la production de mâles entiers, l'anesthésie, l'immunocastration, le sexage du sperme, la castration chimique et une administration d'hormone afin d'inhiber l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Cependant, ces trois dernières alternatives sont actuellement impossibles, trop chères, illégales ou entraînent des douleurs (EFSA, 2004).

Tout d'abord, la production de mâles entiers permettrait de ne pas provoquer de stress et de douleurs chez le porcelet, car on n'effectue pas de castration. Cependant, le principal problème reste la production de l'odeur de verrat (Bonneau *et al.*, 2019). L'abattage des porcs à faible poids reste dans ce cas une possibilité de solution.

Deuxièmement, afin de diminuer ou de supprimer la douleur lors de la castration, celle-ci peut être complémentée par une anesthésie et/ou analgésie, ce qui permettra de minimiser et de contrôler la douleur du porcelet.

Plusieurs options sont possibles. La première est l'anesthésie générale. Elle permet une absence de douleur au cours de l'opération, mais entraîne des complications ultérieures telles qu'une mortalité plus importante (Mainau *et al.*, 2013). L'anesthésie générale peut se faire par inhalation (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, Isoflurane). Cette méthode est peu coûteuse, mais est douloureuse pour le porcelet. L'anesthésie peut également se faire par injection intramusculaire (Kétamine), le temps de récupération sera plus long et, de ce fait, il existe un risque accru d'hypothermie ou d'écrasement du porcelet. Cette technique d'anesthésie générale sera donc difficilement applicable en élevage, car elle demande du temps, présente un risque pour l'humain et nécessite l'intervention d'un vétérinaire (EFSA, 2004).

L'anesthésie peut également être locale via un anesthésique, la lidocaïne par exemple, dans les testicules ou le cordon spermatique (Bonneau *et al.*, 2019). L'anesthésie locale est susceptible d'être stressante, mais ce stress provient principalement de la castration (EFSA, 2004 ; Lefebvre, 2007). Haga and Ranheim (2005) et Zols, Ritzmann and Heinritzi (2006) ont confirmé qu'une anesthésie locale réduisait significativement la douleur due à l'opération.

L'analgésie est l'abolition de la sensibilité à la douleur (Larousse, 2019). Cette option peut représenter une bonne solution pour soulager la douleur. Des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou des dérivés de pyrazolone non opioïdes seront dans ce cas directement injectés dans le testicule ou, en sous-cutané, dans le scrotum (Mainau *et al.*, 2013 ; Bonneau *et al.*, 2019). L'analgésie peut être administrée par le vétérinaire ou le fermier. Lorsque l'analgésie est administrée avant l'anesthésie, elle augmente l'efficacité de la diminution de la douleur lors de la chirurgie ainsi que sa durée post-chirurgie (Bonneau *et al.*, 2019).

En bref, l'anesthésie prévient la douleur, mais ne la soulage pas après l'opération, tandis que l'analgésie est efficace après l'opération, mais pas pendant. La meilleure solution serait une combinaison des deux, mais cela reviendrait beaucoup trop cher au fermier.

L'immunocastration est une troisième alternative à la castration des porcs afin de réduire la production des molécules responsables de l'odeur de verrat. Cela se traduit par un vaccin qui a pour but d'inhiber la cascade hormonale responsable du développement testiculaire et de la production des stéroïdes dans les cellules de Leydig (EFSA, 2004 ; Mainau *et al.*, 2013). La GnRH, l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires, est un neuropeptide libéré par l'hypothalamus afin de stimuler la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) et folliculo-stimulante (FSH) par l'antéhypophyse (ou adénohypophyse). Ces différentes hormones contrôlent la production des stéroïdes testiculaires (Zamaratskaia *et al.*, 2008 ; Mainau *et al.*, 2013 ; Bonneau *et al.*, 2019). Les vaccins d'immunocastration, tels que l'Improvac<sup>TM</sup>, basés sur la production d'anticorps anti-GnRH, vont stopper cette réaction en chaîne d'hormones et

provoquer ainsi une réduction de la concentration des stéroïdes testiculaires, de la taille des organes de reproduction, du nombre de spermatozoïdes et du comportement agressif des bêtes (Zamaratskaia *et al.*, 2008 ; Bonneau *et al.*, 2019). Cela n'induit toutefois pas une castration complète et entière de l'animal (Lefebvre, 2007). L'immunisation est dirigée contre la GnRH, car celle-ci se révèle plus efficace que contre la LH (EFSA, 2004 ; Lefebvre, 2007).

Le vaccin nécessite deux injections, l'une vers l'âge de huit à douze semaines, et la seconde, quatre à six semaines avant l'abattage. Il sera donc nécessaire de prêter attention au délai avant abattage (Lefebvre, 2007 ; Bonneau *et al.*, 2019).

L'immunocastration présente des avantages comme des inconvénients. Examinons d'abord les différents avantages : un comportement calme, un bien-être augmenté grâce à la diminution de l'agressivité présente après le deuxième rappel et une qualité de gras intramusculaire proche des castrats. Elles vont contenir moins d'eau, plus d'acides gras saturés que de polyinsaturés, malgré un moins bon apport nutritionnel des acides gras. Ceux-ci apportent toutefois une texture plus ferme et une propension à la rancidité moins importante. Les désavantages sont : une production (très faible) de scatole et d'androsténone, le temps de croissance-finition plus long, des effets douloureux indésirables, le coût des vaccins et de la main-d'œuvre (pour la vaccination et la surveillance des non-répondants) (Bonneau *et al.*, 2019).

Plusieurs facteurs influencent la présence et la concentration des composés odorants dans la graisse de porc. La concentration en androsténone est fortement dépendante de l'aspect génétique (Robic *et al.*, 2007). Une voie de réduction possible est la sélection génétique. L'une des clés d'action est la sélection d'animaux avec une puberté retardée, mais qui n'en altère pas le potentiel de reproduction à l'âge adulte (voir section ci-dessus 2.2.5.2) (Parois *et al.*, 2018).

La sélection spermatique permet d'obtenir un élevage exclusivement féminin grâce à l'insémination des truies avec du sperme sélectionné de manière à ce que la descendance soit également exclusivement féminine (Mainau *et al.*, 2013). Aujourd'hui, cette pratique n'est pas encore en application, car des problématiques pratiques se posent : la quantité de sperme obtenue est insuffisante pour inséminer toutes les truies, et les machines de cytométrie en flux, qui trient les spermatozoïdes en fonction de leur quantité d'ADN, ne s'avèrent pas rentables. De plus, les conditions de stockage, de transport et d'insémination ne sont pas encore au point (Lefebvre, 2007).

La castration chimique est théoriquement possible. Elle consiste en une injection dans les testicules d'une solution d'acide lactique ou de sel de zinc, par exemple, ce qui provoque une destruction locale des tissus (Mainau *et al.*, 2013).

### 2.3 Moyens de détection

La détection des trois molécules (androsténone, scatole et indole) provoquant l'odeur de verrat peut se faire de nombreuses manières différentes. Elle peut être réalisée en abattoir sur la ligne de découpe des carcasses (on-line), en laboratoire, avec une quantification des molécules et en dehors de la ligne d'abattage, mais dans l'enceinte de l'abattoir (off-line).

Il existe pas moins de trente méthodes chromatographiques et dix méthodes immunologiques (Haugen *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Méthodes on-line - sur la ligne d'abattage

La méthode la plus commune, pratiquée en Belgique et au Pays-Bas, est la chauffe d'un bout de graisse dorsal sur la carcasse du porc. Un homme va alors renifler la flaveur dégagée et la jugera comme acceptable ou non. La chauffe peut être réalisée au moyen d'un fer à souder ou d'un brûleur à gaz. Le brûleur à gaz est peu utilisé, car la chaleur de la flamme se révèle trop importante. Cela peut poser des problèmes de fiabilité à long terme, de faux positifs et négatifs (fatigue, variation inter-nez...). De plus, il est impossible de distinguer quelles molécules sont en présence ainsi que leur concentration (Bekaert *et al.*, 2013). Pour que cette analyse reste performante, il est nécessaire de respecter les conseils d'utilisation : bien nettoyer le fer à souder entre chaque échantillon et faire attention à ne pas chauffer à trop haute température et trop longtemps le morceau de gras avec le fer à souder, au risque de masquer les odeurs de verrat par des odeurs de brûlé (Bekaert, 2012).

Les abattoirs danois utilisent une méthode colorimétrique pour détecter les composés indoliques dans les carcasses (Vahlun, 1993). Cependant, ce n'est pas spécifique à la détection du scatole, le résultat est donné en équivalent scatole, et l'androsténone n'est, quant à elle, pas du tout détectée (Bekaert, 2012 ; Haugen *et al.*, 2012 ; Bekaert *et al.*, 2013). De plus, cette méthode est limitée à une analyse de 180 échantillons par heure (EFSA, 2004).

### 2.3.2 Méthodes en laboratoire

Pour pouvoir quantifier, déterminer et analyser les molécules en présence, il est nécessaire de passer par des analyses chimiques en laboratoire.

Les molécules de scatole et d'indole sont analysées via LC, GC et méthodes spectrophotométriques, et la molécule d'androsténone par LC, GC et méthodes immunologiques.

#### 2.3.2.1 Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques reposent sur la réaction d'un analyte, qui agit comme un antigène en complément d'un anticorps. Cette réaction d'interaction peut être monitorée par des compléments, tels qu'un isotope radioactif (radioimmunoassay–RIA), une enzyme (Immunoassay–EIA) ou un composé fluorescent (fluoroimmunoassay–FIA).

Ces méthodes présentent une faible sélectivité, une précision peu accrue lors de la mesure de l'androsténone (à faible concentration), et cela est dû à la réactivité croisée (Bekaert *et al.*, 2013). Ces processus sont très limités pour l'analyse du scatole en raison de son faible poids moléculaire ainsi que d'une non-disponibilité d'anticorps spécifiques (Haugen *et al.*, 2012 ; Bekaert *et al.*, 2013).

#### 2.3.2.2 Méthodes chromatographiques

La graisse de porc étant une matrice complexe, il est souvent recommandé d'effectuer une étape d'extraction de ces molécules comme prétraitement. Cela permettra de limiter le bruit de fond et, en conséquence, de mener à une augmentation de la sensibilité et à une quantification plus aisée de l'indole, scatole et androsténone (Bekaert *et al.*, 2013).

L'extraction la plus courante est l'extraction liquide-liquide. La graisse est chauffée. Une fois devenue liquide, elle est mélangée à un solvant (Dehnhard *et al.*, 1993 ; Fischer, Elsinghorst, Mark, *et al.*, 2011). L'extraction solide liquide représente une autre option. La graisse de porc est coupée en petits morceaux et mise en contact avec le solvant (Hansen-Møller, 1994 ; Verheyden *et al.*, 2007). Il a été démontré que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction simultanée de l'androsténone, du scatole et de l'indole (Hansen-Møller, 1994 ; Chen *et al.*, 2007). L'extraction par fluide supercritique peut également être utilisée (Bekaert *et al.*, 2012 ; Haugen *et al.*, 2012). L'androsténone étant très lipophile – davantage que l'indole et le scatole –, son extraction est plus compliquée. Une étape supplémentaire peut alors être effectuée : la saponification. Effectivement, l'androsténone se trouve dans la fraction insaponifiable de la graisse (De Brabander *et al.*, 1986).

Un autre prétraitement supplémentaire, qu'il est également nécessaire d'appliquer à l'androsténone pour certaines techniques chromatographiques, telle que l'HPLC-FL, est une dérivation. La dérivation, dans ce cas-ci, permet le greffage d'un composé fluorochrome (De Brabander *et al.*, 1986).

Dans le cas de l'extraction des molécules responsables de l'odeur de verrat, différentes façons de procéder au nettoyage en fin d'extraction sont possibles : avec des colonnes (Garcia-Regueiro *et al.*, 1986 ; Hansen-Møller, 1992) ou filtration (Hansen-Møller, 1994 ; Rius *et al.*, 1998 ; Verheyden *et al.*, 2007).

Bien que des détecteurs tels que ceux à capture d'électron (ECD), à détection thermoionique (TSD ou NPD) ou à ondes acoustiques de surface (SAW) aient été utilisés en chromatographie gazeuse, les plus fréquemment utilisés demeurent néanmoins le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le spectromètre de masse (MS).

Les détecteurs surtout utilisés en chromatographie liquide sont à ultra-violet (UV), à spectromètre de masse (MS) et à fluorescence (FLD) (Haugen *et al.*, 2012).

#### 2.3.2.2.1 Chromatographie en phase gazeuse (GC)

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est un type de chromatographie où la phase mobile lors de l'analyse est gazeuse. Le gaz utilisé est souvent de l'hélium, mais l'on peut avoir recours à trois autres : le dihydrogène, le diazote et l'argon (Burgot *et al.*, 2011). La technique de GC est simple, automatisable et ne nécessite pas de solvant (Ochiai *et al.*, 2014).

Plusieurs extractions sont possibles pour les molécules volatiles de l'espace de tête.

Deux grandes catégories existent : soit une technique dynamique (avec injection de gaz et pompage d'un volume déterminé de gaz), le DHS ; soit une technique statique (SHS), où un équilibre va se former entre les molécules en présence dans l'espace de tête et celles adsorbées sur la fibre. L'utilisation de fibres est connue sous l'abréviation SPME signifiant « Solid Phase MicroExtraction ».

Les trois molécules cibles ne présentent pas les mêmes caractéristiques, notamment en matière de polarité. Le scatole et l'indole, tous deux composés indoliques, possèdent des caractéristiques proches, et il est donc plus aisé de les analyser en même temps.

Vold (1970) a été le premier à détecter la molécule de scatole en GC, avec un détecteur FID.

Le détecteur de spectrométrie masse (MS) est l'un des plus populaires pour la détection en GC des molécules de scatole et d'indole (Garcia-Regueiro *et al.*, 1995 ; Schreurs *et al.*, 2007). Les composés seront ionisés afin de générer des fragments de molécules chargés ; ils seront ensuite triés et identifiés, en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ), ainsi qu'en mesurant l'abondance. Mais une faible sensibilité peut être à déplorer pour cette méthode, cette dernière étant due à la coextraction des composants de la matrice du gras de porc qui mène à un effet de matrice important (Verheyden *et al.*, 2007 ; Bekaert *et al.*, 2013).

D'autres méthodes ont également été développées ultérieurement au moyen d'autres détecteurs, dont le NPD (Peleran *et al.*, 1985 ; Zabolotsky *et al.*, 1995 ; Annor-Frempong *et al.*, 1997) et le FID (Hansson *et al.*, 1980 ; Porter *et al.*, 1989).

La molécule d'androsténone, étant un stéroïde, présente des caractéristiques différentes en comparaison avec les deux autres molécules. Elle peut donc être analysée et mesurée distinctement. L'androsténone a été détectée la première fois dans les tissus gras du porc par Williams et Pearson (1965). Plus tard, d'autres méthodes ont été développées, telle que celle de García-Regueiro et Diaz (1989) qui ont mis au point une technique pour détecter l'androsténone par chromatographie en phase gazeuse avec des détecteurs à spectromètre de masse (MS) et à ionisation de flamme (FID), ces deux détecteurs étant les principaux pour l'analyse de l'androsténone. La détection de l'androsténone avec un détecteur MS a été la plus examinée et utilisée (Schilt *et al.*, 1989 ; Mågård *et al.*, 1995 ; Rius *et al.*, 1998)

Bien que cela ne constitue pas la majorité des méthodes, des méthodes d'analyse des trois molécules simultanément ont été mises au point, telle celle de (Fischer, Elsinghorst, Mark, *et al.*, 2011 ; Verplanken, Wauters, Durme, *et al.*, 2016) qui utilise la SPME pour prélever les molécules se trouvant dans le solvant d'extraction, ou encore celle de (Fischer, Haas *et al.*, 2014) qui développe une méthode ne faisant pas appel à une extraction préalable et qui prélève les molécules de l'espace de tête de l'échantillon préalablement chauffé grâce à une technique DHS.

Les désavantages d'utiliser la GC pour l'analyse des odeurs de verrat sont que les équipements sont onéreux et que l'analyse de l'androsténone prend un temps assez long, tandis que, pour l'analyse du scatole, le temps est relativement court (Aluwé *et al.*, 2012 ; Haugen *et al.*, 2012).

#### 2.3.2.2.2 Chromatographie en phase liquide (LC)

La chromatographie en phase liquide, contrairement à la GC, utilise une phase mobile liquide afin de séparer et d'analyser qualitativement et quantitativement les analytes de l'échantillon.

Plusieurs méthodes ont été développées pour analyser ces trois molécules.

Premièrement, L'HPLC-UV. Elle fut d'ailleurs la première développée pour l'analyse des composés indoliques (Garcia-Regueiro *et al.*, 1986). Les composés indoliques, comme le scatole, sont solubles dans plusieurs solvants organiques grâce à leurs propriétés polaires et apolaires. De ce fait, ils peuvent se séparer dans des phases normales ou inverses (Haugen *et al.*, 2012).

Un second détecteur utilisé est le détecteur à fluorescence. Ce détecteur fut le premier à analyser simultanément les trois molécules : indole, scatole et androsténone (Hansen-Møller, 1994). Le détecteur à fluorescence repose sur le principe d'un rayon de lumière qui va venir exciter les électrons des molécules de certains composés et les fait émettre de la lumière de plus basse énergie. L'androsténone n'étant pas fluorescente, il est nécessaire d'ajouter un fluorochrome, via dérivatisation, afin de la rendre détectable (Haugen *et al.*, 2012)

Une méthode d'analyse des trois composés en simultané est possible sans dérivatisation, mais avec un autre détecteur : le détecteur MS (Verheyden *et al.*, 2007 ; Bekaert *et al.*, 2012 ; Verplanken, Wauters, Vercruysse, *et al.*, 2016a)

Aujourd'hui, on tend davantage vers des méthodes UPLC, car les analyses sont plus rapides, avec une meilleure résolution, une sensibilité augmentée et un effet de matrice moindre (Bekaert *et al.*, 2012 ; Wille *et al.*, 2012).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des méthodes d'analyse par chromatographie des molécules responsables de l'odeur de verrat (androsténone, scatole et indole)

Extraction	Chromatographie <sup>4</sup>	Détecteur	Molécule(s) <sup>5</sup>	Colonne <sup>6</sup>	Standard interne	Référence
Saponification, Hexane	GC	FID	AND	Colonne de verre : 400 x 0,3 cm.	Cholestane	(Kaufmann et al., 1976)
Saponification, Hexane	GC	FID	AND	Colonne capillaire de silice : 30 m x 0,25 mm , (remplie de SE-30)	5 $\alpha$ -androstan-3,17-dione	(Brennan et al., 1986)
Hexane	GC	FID/ MS	AND, SKA et IND	colonne FSOT RSL-300 : 25 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m	/	(García-Regueiro et al., 1989)
Petroleum/cyclohexane	GC	ECD	AND	Colonne capillaire de silice : 50 m x 0,23 mm (remplie de CP Sil 5)	Androstanone	(De Brabander et al., 1986)
Propylène carbonate	GC	NPD	SKA et IND	Colonne de verre : 1.5 m x 2 mm I.D. (remplie de 3% SP 2250 on Chromosorb W)	/	(Peleran et al., 1985)
SFE <sup>7</sup> (CO <sub>2</sub> )	GC	NPD	AND et SKA	Colonne de verre : 1.83 m X 2 mm (remplie de 3% SP-2100 on 80/100 Sunelconort)	/	(Zabolotsky et al., 1995)
Hexane	GC	FID/ MS	AND, SKA, IND	colonne FSOT RSL-300 : 25 m x 0,25 mmx 0,25 $\mu$ m	/	(García-Regueiro et al., 1989)
SHS – SPME (PDMS/DVB)	GC	Ion trap- MS	AND,SKA et IND	Colonne capillaire Varian VF-5 ms : 30 m X 0,25mmX 0,25 $\mu$ m	3 $\beta$ - androstenol - d3, d3- androsténone, d3-skatole et d6-indole	(Fischer, Elsinghorst, Mark, et al., 2011 ; Mo et al., 2016)
SHS – SPME (PDMS/DVB)	GC	TOFMS	AND et SKA	Colonne capillaire Varian VF-5 ms : 30 m X 0,25mmX 0,25 $\mu$ m	3 $\beta$ - androstenol - d3, d3-	(Trautmann et al., 2016)

<sup>4</sup> GC = chromatographie gazeuse ; LC = Chromatographie liquide (HPLC = chromatographie liquide à haute performance).

<sup>5</sup> AND = Androsténone ; SKA = Scatole et IND = Indole.

<sup>6</sup> Longueur, diamètre interne (et porosité de la phase).

<sup>7</sup> Super critical fluid extraction (= extraction avec fluide super critique).

					androsténone, d3-skatole et d6- indole	
<b>SHS – SPME (DVB/PDMS)</b>	GC	MS	AND,SKA et IND	Colonne zebron-semivolatiles : 30 m×0.25 mm × 0,25µm (remplie de 5% phenyl-arylene phase)	2- methylindole (2-MID) et androstadienedio ne (1,4 - androstadiene - 3,17 - dione)	(Verplanken, Wauters, Durme, et al., 2016)
<b>DHS (Tenax)</b>	GC	TOFMS	AND, SKA et IND	Colonne capillaire Im FS-Supreme- 5 ms : 15 m X 0.25 mmx 0,25µm (5% phenyl/95% methyl silicone)	d3-androsténone, d3-skatole et d6- indole	(Fischer, Haas, et al., 2014)
<b>DHS (Tenax)</b>	GC	MS	SKA	Colonne capillaire de silice : 30m×0.25mm x 0,25 µm (remplie de polyethylene glycol (ZB-WAX))	d3-skatole	(Schreurs et al., 2007)
<b>DHS (Tenax)</b>	GC	MS	AND, SKA et IND	Colonne capillaire de faible polarité Phenomenex Zebron ZB- 5MSi : 30 m × 0.25 mm × 0,25 µm		(Sørensen et al., 2014)
<b>Multi- dimension</b>	GC	FID- MS/O	SKA, IND et VOC	2 colonnes en série : -précolonne non polaire : 12m, 0,53mm X 1µm (remplie de 5% phenyl methylpolysiloxane stationary phase (SGE BP5)). -colonne analytique de silice polaire : 25m×0.53mm	/	(Zhang et al., 2010)

<b>Acétone / tris</b>	HPLC	FLD	SKA et IND	Précolonne (LiChroCART), Colonne LiChrospher (RP-Select B (5µm) : 250 mm x 4 mm x 5µm	2-MID <sup>8</sup>	(Hansen-Møller, 1992)
<b>Méthanol</b>	HPLC	FLD	AND, SKA et IND	Colonne Hypersil ODS : 60 x 4,6 mm x 3 µm	2-MID et androstanone	(Hansen-Møller, 1994 ; Aaslyng et al., 2016)
<b>Méthanol</b>	HPLC	FLD	SKA et IND	Colonne Phenomenex Kinetix C18 : 150 x 2,1 mm x 2,6 µm	2-MID	(Busmann, 2015)
<b>Méthanol</b>	HPLC	FLD	SKA et IND	Colonne C18 Hypersil ODS C18 : 150 mm x 4,6 mm x 5µm	3β - androstenol - d3, d3- androsténone, d3-skatole et d6- indole	(Fischer, Elsinghorst, Bücking, et al., 2011)
<b>Lyophilisation</b>	HPLC	FLD	AND, SKA et IND	Colonne Hypersil ODS : 60 x 4,6 mm x 3µm	2-MID et androstanone	(Meinert et al., 2017)
<b>Hexane/ 2- propanol</b>	HPLC	FLD	SKA et IND	Colonne Hypersil aminopropylsilica (APS 2) : 250 x 4,6 mm x 5µm	7-Ethylindole	(Rius et al., 1998, 2005 ; Solé et al., 2001)
<b>Chloroforme/ méthanol (2/1)</b>	HPLC	FLD	SKA et IND	Colonne Hypersil aminopropylsilica (APS 2) : 250 x 4,6 mm x 5µm	7-Ethylindole	(Rius et al., 2001)
<b>Méthanol</b>	HPLC	UV	SKA et IND	Colonne Spherisorb-amino : 250 x 4 mm x 10µm	/	(García-Regueiro et al., 1989)
<b>Hexane</b>	LC	MS	SKA et IND	Colonne C18 : 4,6 x 150 mm x 4 µm	/	(Zamaratskaia & Jastrebova, 2006)

<sup>8</sup> 2- MID = 2- méthylindole.

<b>SEC<sup>9</sup></b>	LC	MS/MS	AND, SKA et IND	Colonne C18 phase reverse sub-2- µm	d4-androsténone, d3-skatole et d7- indole	(Buttinger et al., 2014)
<b>Méthanol</b>	(U)PLC	Orbitrap- MS	AND, SKA et IND	Colonne Hypersil Gold : 50 mm × 2,1 mm x 1,9 µm	2-MID et 1,4 - androstadiene - 3,17 – dione	(Bekaert et al., 2012 ; Verplanken, Wauters, Vercruysse, et al., 2016b)
<b>Méthanol</b>	HPLC	Ion trap - MS	AND, SKA et IND	Colonne C18 Symmetry : 150mm × 2,1 mm x 5µm	2-MID	(Verheyden et al., 2007)
<b>Méthanol</b>	HPLC	QQQ- MS/MS	AND	Colonne C18 Phenomenex Kinetix : 150 x 2,1 mm x 2,6µm	2-MID	(Bussmann, 2015)

---

<sup>9</sup> Size exclusion chromatography (= chromatographie d'exclusion stérique).

### 2.3.3 Méthodes off-line

Les méthodes off-line sont utilisées pour détecter les molécules d'androsténone, scatole et indole sur les échantillons des carcasses, mais pas directement sur la ligne de découpe.

Beaucoup d'abattoirs utilisent une analyse sensorielle par un jury d'experts pour déterminer rapidement la validité des carcasses de porc. Effectivement, si un panel d'experts juge la viande recevable, le consommateur ne détectera également aucun souci (Dolores *et al.*, 2016). Cela se fait grâce à un panel d'experts qualifiés et formés (Bekaert, 2012). Beaucoup de paramètres différents entrent en jeu pour cette analyse : la sélection et formation de ces experts, la méthode de chauffage de l'échantillon, les paramètres de préparation de l'échantillon (temps et température de chauffe), et enfin, le type d'échantillon (Bekaert, 2012).

Premièrement, la formation et la sélection des experts sont essentielles. Ils sont choisis sur leur capacité à détecter l'androsténone et le scatole. Ils sont formés à détecter les molécules en combinaison à divers pourcentages afin de simuler les conditions des concentrations dans la graisse de porc. Ils sont évalués régulièrement sur leur capacité d'analyse (Dolores *et al.*, 2016).

Deuxièmement, la méthode de chauffe de l'échantillon revêt son importance. Différentes techniques de préparation de l'échantillon sont utilisées : fer à souder chaud, méthode avec de l'eau bouillante, cuisson par micro-ondes et par fusion (Bekaert *et al.*, 2013). Les méthodes de chauffe par un fer à souder ou par micro-ondes s'avèrent les plus performantes et les plus répétables, notamment pour la concentration des trois molécules odorantes (Bekaert, 2012).

Les tests sensoriels révèlent également une disparité dans la perception des odeurs entre les différentes personnes. Cela dépend du profil du consommateur : son genre, son âge, son pays d'origine et son acuité olfactive (Wauters *et al.*, 2017)

La sensibilité à l'androsténone est en partie déterminée génétiquement. Une part de la population est anosmique<sup>10</sup> à cette molécule, par manque ou par présence de capteurs défectueux (Bekaert, 2012 ; Parois, 2016).

Gilbert and Wysocki (1987) ont démontré qu'en Europe, 15,8% des femmes et 24,1% des hommes étaient anosmiques à l'androsténone. Aux USA, on avait respectivement une proportion de 29,5% des femmes et 37,2% des hommes, et en Asie, 17,2% des femmes et 25,5% des hommes étaient également anosmiques à cette molécule. Par contre, ce chiffre semble avoir évolué au fil des années, et aujourd'hui, Bekaert (2012) a démontré que 48,9% des femmes et 61,7% des hommes en Flandre, Belgique, sont anosmiques à l'androsténone. L'âge influence également la perception de cette molécule : plus on vieillit, moins on est sensible à la molécule.

Par ailleurs, la majorité de la population est sensible au scatole (Bekaert, 2012).

## 2.4 Biocapteurs

Les molécules semi-volatiles responsables de l'odeur de porc, telles que l'androsténone, le scatole et l'indole doivent être facilement détectables par les opérateurs sur la ligne d'abattage, afin de discriminer rapidement les carcasses positives. Les méthodes on-line

---

<sup>10</sup> Définition : Perte partielle ou totale du sens de l'odorat (Font-i-Furnols, 2012).

actuelles ne sont soit pas performantes pour détecter et analyser précisément toutes ces molécules, soit sujettes à des erreurs humaines (faux positifs ou faux négatifs). Chacune de ces erreurs est économiquement inacceptable pour les abattoirs. Par conséquent une méthode précise et fiable doit être mise en place.

Ce nouveau dispositif doit être facile d'utilisation, présenter un temps d'analyse réduit, avoir la possibilité de plusieurs unités d'équipement afin d'analyser plusieurs carcasses en parallèle, ainsi qu'un coût de production réduit afin de ne pas impacter le coût final de commercialisation de la viande de porc.

Des biocapteurs ont déjà été développés pour détecter l'odeur de verrat. Les dispositifs actuels sont basés sur une variété de principe de détection chimique : adsorption et désorption chimique, adsorption optique ou réactions chimiques (Haugen, 2006). Plusieurs catégories de capteurs existent : détecteur à gaz, biocapteur électrochimique, capteur basé sur des nanoparticules, biocapteur optique, biocapteur basé sur des bactéries bioluminescentes, et d'autres basés sur l'usage d'insectes (Felix *et al.*, n.d. ; Doran, 2012). Une méthode basée sur la discrimination de l'odeur des verrats (indole, scatole et androsténone) par les guêpes (*Microplitis croceipes*) est toujours en développement (Olson *et al.*, 2012).

Plusieurs capteurs ayant recours à des techniques différentes ont été développés pour analyser la composition en composés organiques volatils dans la partie gazeuse de l'échantillon :

- un capteur à résonance à quartz revêtu de porphyrine, qui permet de discriminer les échantillons avec un fort taux d'androsténone (Haugen, 2006) ;
- un nez électronique (E-nose) a été élaboré avec des capteurs et un polymère conducteur. Le fonctionnement de ce capteur est basé sur la spectrométrie de mobilité ionique. L'avantage est qu'il ne faut pas extraire via un solvant organique. Le temps et les coûts d'analyse sont donc moindres. Cependant, seule l'odeur totale est prise en compte, et pas spécifiquement les molécules de scatole, indole ou androsténone. De plus, la sensibilité de l'appareil n'est pas optimale (Vestergaard *et al.*, 2006 ; Chen, 2007) ;
- la résonance plasmonique de surface (SPR) a déjà été également investiguée afin de développer un capteur. Cette technologie en temps réel est souvent utilisée pour surveiller les interactions réversibles entre les molécules. Cependant, ce capteur ne peut être utilisé sur la ligne d'abattage, car il nécessite une extraction préalable (Chen, 2007) ;
- un capteur breveté, EP 2966441 B1 (Hart *et al.*, 2017), biocapteur « Screen-printed électrodes » (SPE) est un capteur rapide. Il permet l'analyse des différentes molécules et la fabrication est bon marché (Doran, 2012). Il mesure la variation du taux de NADH ou NADPH provoquée par le métabolisme de l'androsténone détecté par une électrode ou par un dispositif optique. Le scatole est également détecté par l'électrode. Il y a une détection simultanée et en parallèle du scatole et l'androsténone en niveau de valeur absolue (Westmacott *et al.*, 2019) ;
- le développement d'un capteur à base d'aptamère utilisant des nanoparticules d'or avec une mesure optique de la détection de l'androsténone et du scatole est également en développement. Les nanoparticules d'or vont s'agréger dans un milieu salin afin que la liaison entre l'aptamère et nos molécules cibles puissent se réaliser. Les aptamères d'ADN choisis (SKT1 et SKT2) ont une affinité et une sélectivité particulières avec le scatole et l'androsténone. La détection s'effectue par un changement de couleur (à 660 nm). Le détecteur n'est par contre pas encore au point (Frimpong *et al.*, 2017).

Au vu des problèmes rencontrés avec la majorité des capteurs présentés ci-dessus et afin de répondre à tous les critères d'usage et de développement du capteur, la technologie de polymères à empreinte moléculaire semble avantageuse.

Les premiers polymères à empreinte moléculaire (PEM) ont commencé à être conçus il y a plus de vingt-cinq ans. Le premier polymère était conçu avec des récepteurs pour les sucres dérivatisés. L'avantage est que cette technologie est valable pour presque tous les types de substances (ions inorganiques, médicaments, acide nucléique, protéines et même les cellules) (Piletsky *et al.*, 2002 ; Debliquy *et al.*, 2017).

Les trois principaux capteurs PEM sont les capteurs d'affinité, les capteurs récepteurs et les capteurs catalytiques (Piletsky *et al.*, 2002)

Les PEM reposent sur le principe de formation d'un complexe entre un monomère et une molécule cible (Template) ainsi qu'un réticulant. Le polymère est une image complémentaire en termes de structure et de fonctionnalité chimique d'une molécule cible, au sens d'un polymère synthétique (Hugon-chapuis *et al.*, 2007).

La synthèse (Figure 6) des PEM se matérialise par une molécule modèle (aussi appelée molécule empreinte ou Template) qui est mise en présence de monomères et qui a une grande affinité avec la molécule empreinte, dans un solvant de synthèse. La seconde étape est la phase de polymérisation, après une initiation thermique ou photochimique. Les monomères vont se polymériser autour de la molécule empreinte. Il va y avoir création de cavités avec une complémentarité structurale de la molécule empreinte. Lorsque la polymérisation est terminée, la molécule empreinte est enlevée de la matrice ; le polymère ainsi formé sera rigide et renfermera les sites de reconnaissances spécifiques (Piletsky *et al.*, 2002 ; Hugon-chapuis *et al.*, 2007 ; Whitcombe *et al.*, 2014 ; Debliquy *et al.*, 2017).

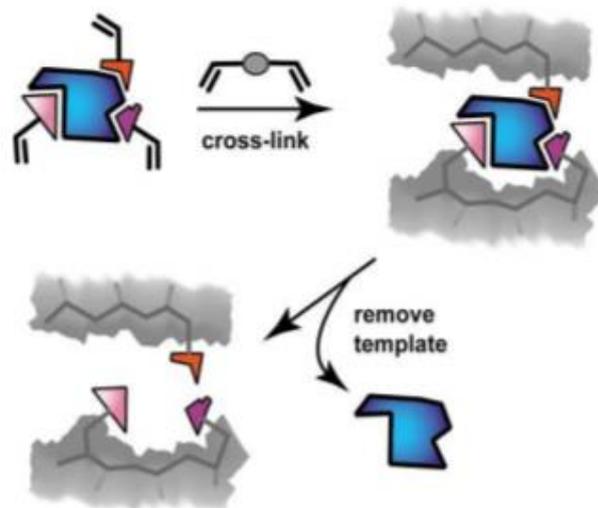


Figure 6 : schéma réactionnel de la préparation générale de PEM (Cadinot, 2011).

Les molécules empreintes peuvent poser un problème de surestimation de l'analyte. En effet, il existe un risque de libération tardive de la molécule empreinte, car l'élimination de la

molécule empreinte après polymérisation s'avère souvent difficile. La solution est de prendre un analogue du composé cible comme molécule empreinte (Hugon-Chapuis *et al.*, 2007).

Le choix des monomères est également important. Ils doivent développer une forte interaction avec la molécule empreinte, être stables et solubles dans le solvant de polymérisation. L'agent de réticulation le plus courant est le diméthacrylate d'éthylène glycol (EDMA) et le triméthylpropane triméthacrylate (TRIM). L'initiateur le plus courant est le 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN) (Hugon-Chapuis *et al.*, 2007).

Enfin, le solvant, porogène, va conférer une structure poreuse au PEM. Il va donc exercer une influence sur la qualité de la structure méso ou macroporeuse du polymère, et donc de l'élimination de la molécule cible (Haupt *et al.*, 2001 ; Cadinot, 2011)

La création du polymère peut se faire soit sous forme de monolithe ou de particules sphériques poly- ou mono-dispersées. La polymérisation peut se faire de manière covalente ou non covalente.

La méthode covalente consiste en la synthèse de monomères liés de manière covalente à la molécule cible. Après, ils sont copolymérisés avec un monomère réticulant. Enfin, un clivage chimique des liaisons entre les monomères et la molécule cible est réalisé (souvent par hydrolyse) (Haupt *et al.*, 2001 ; Cadinot, 2011).

La méthode non covalente consiste en un autoassemblage entre la molécule cible et le monomère fonctionnel. Ils sont ensuite réticulés par un monomère multifonctionnel. Dans ce cas-ci, la molécule cible est ôtée au moyen d'un solvant chimique. Le polymère est basé sur des liaisons non covalentes : liaisons hydrogène, ioniques ou des interactions dipôle-dipôle (Haupt *et al.*, 2001 ; Hugon-Chapuis *et al.*, 2007 ; Cadinot, 2011). Ce type de polymérisation est très souple d'utilisation, peu dépendant de la nature de la molécule cible et proche du système biologique (Haupt *et al.*, 2001).

Les polymères formés peuvent également retenir les composés en dehors des cavités ; cela s'appelle des interactions non spécifiques. L'énergie de rétention sera plus faible par rapport à celle dans les cavités (Hugon-Chapuis *et al.*, 2007).

Les capteurs composés de PEM sont constitués de différents éléments afin de pouvoir traduire la composition chimique de l'analyte en un signal quantifiable et perceptible (Figure 7). Premièrement, il est constitué d'un élément de reconnaissance qui va absorber sélectivement l'analyte. Il est en contact avec un transducteur qui va traduire ce signal chimique en un signal quantifiable (Hugon-Chapuis *et al.*, 2007). Ce signal peut s'exprimer de trois façons :

- soit un changement physico-chimique du système doit être détecté et quantifié, comme une accumulation de matière, une chaleur d'absorption ou une capacité électrique ;
- soit un analyte possède une propriété facilement détectable et quantifiable (fluorescence, activité électrochimique) ou peut être dosé par compétition avec un analyte marqué ;
- ou soit un signal généré par le polymère. Un groupement change de propriété lors de l'adsorption de l'analyte dans les sites caractéristiques (exemple : monomère fonctionnel fluorescent) (Hugon-Chapuis *et al.*, 2007).



Figure 7 : fonctionnement d'un capteur à empreinte moléculaire d'après (Haupt *et al.*, 2001)

Un élément essentiel dans les capteurs à PEM est les transducteurs. Ils peuvent reposer sur le principe de conductimétrie, fluorescence, ampérométrie... (Haupt *et al.*, 2001). La détection va se faire via un signal électrochimique, piézoélectrique et optique. Le transducteur électrochimique est le plus simple et facile de production (Piletsky *et al.*, 2002).

Différents capteurs avec PEM existent déjà pour analyser diverses molécules : détecteurs optiques pour le chloramphénicol, détecteur conductimétrique pour l'atrazine, détecteur fluorescence pour le triazine et l'acide sialique (Yano *et al.*, 1999).

Les capteurs à PEM à gaz sont simples et bon marché. Ils sont constitués d'une paire d'électrodes interdigitées déposées sur un substrat isolant et recouvert d'une couche sensible semi-conductrice. Les polymères conducteurs sont des capteurs de gaz fonctionnant à température ambiante avec une bonne sélectivité (Debliqy *et al.*, 2017).

Enfin, le développement d'un capteur à PEM pour l'analyse des trois molécules (androsténone, scatole et indole) responsables de l'odeur de verrat. Trois critères importants doivent être respectés lors du développement de ce capteur :

- le développement d'un transducteur très sensible et capable de suivre le processus de détection et transformer en signal traitable ;
- PEM capable d'interagir avec la molécule cible et l'analyte dans les conditions d'affinités et spécificités requises ;
- intégration du PEM avec le transducteur (Piletsky *et al.*, 2002).

Les différents paramètres doivent également être optimisés tels que les monomères, le solvant, la température, la pression. Aujourd'hui, le design d'un nouveau capteur se réalise préalablement virtuellement. Un screening dans une bibliothèque virtuelle se réalise pour choisir le complexe avec les meilleures liaisons entre le monomère et la molécule cible (Piletsky *et al.*, 2002).

### 3. Objectifs et plan expérimental

Afin de développer un capteur opérationnel de détection d'odeur de verrat dans les abattoirs, quelques étapes d'optimisation pour l'échantillonnage des molécules cibles sont nécessaires au préalable. Le présent travail portera sur ce domaine, et non sur le développement ultérieur du capteur par empreinte moléculaire.

Une première partie consistera à optimiser le processus d'échantillonnage des COVs lors de la chauffe d'un morceau de gras. Cela sera effectué via un processus d'essai-erreur et de réflexion afin de rendre le dispositif le plus performant possible.

Une deuxième partie consiste à analyser le contenu du gras en ces trois molécules cibles afin d'établir la corrélation entre les concentrations dans l'espace de tête lors de la chauffe et le contenu de ces mêmes échantillons. Un objectif sous-jacent sera donc de valider *a minima* la méthode d'analyse utilisée.

Troisièmement, toujours dans une optique de développement du capteur, l'analyse du bruit de fond odorant dans les abattoirs est importante. Effectivement, une présence des molécules responsables de l'odeur de verrat dans les abattoirs pourrait biaiser la réponse du capteur.

Finalement, une étude des COVs émis lors de la chauffe du gras est essentielle. Cela permettra de détecter les COVs majoritaires de ce profil, qui peuvent donc gêner la détection des molécules cibles par le capteur. En outre, d'autres molécules pouvant influencer cette odeur de verrat peuvent être mises en lumière.

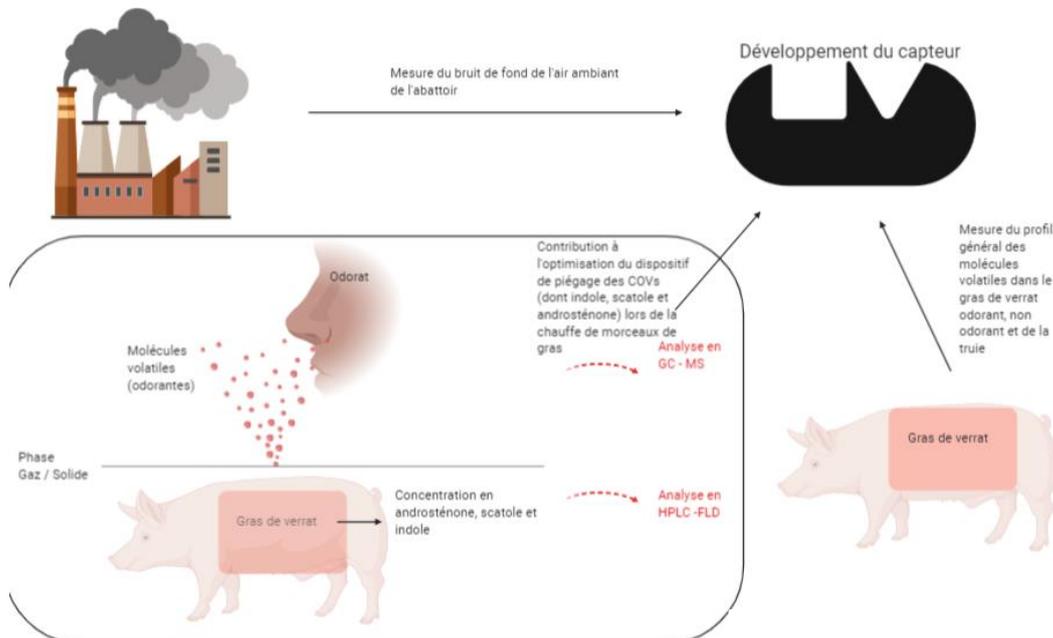


Figure 8: schéma récapitulatif des objectifs

## 4. Matériels et méthodes

Afin de répondre aux objectifs précités, cette section sera structurée en quatre parties :

- Analyse quantitative du contenu du gras de verrat odorant des trois molécules cibles par HPLC-FLD
- Optimisation du dispositif en vue de l'analyse des COVs émis lors de la chauffe du gras
- Analyse générale du profil en COV de la graisse de truie, porc non odorant et de porc odorant
- Analyse du bruit de fond en COV en abattoir

### 4.1 Matière première

La matière première est du gras de cochon provenant du coude l'animal. Les échantillons ont été récoltés à l'abattoir Lovenfosse (rue de Merckof 44, B-4880 Aubel). Les échantillons proviennent de trois origines : des mâles non castrés odorants<sup>11</sup>, des mâles non odorants et des truies. Les références et le détail des échantillons se trouvent en annexe.

Les échantillons ont été transportés dans une glacière et directement congelés (-20 °C)

### 4.2 Analyse quantitative du contenu par HPLC-FLD

Une analyse par HPLC a été effectuée afin de déterminer la concentration précise des trois molécules d'intérêt (androsténone, scatole et indole) dans chaque échantillon. Par la suite, une corrélation avec la quantité des molécules émises après cuisson du gras a été réalisée.

La détection et quantification des trois molécules a été accomplie à l'aide d'un détecteur à fluorescence couplé à l'HPLC. Le scatole et l'indole disposent de bonnes propriétés fluorescentes, et il est, par ailleurs, possible facilement de dériver l'androsténone.

La dérivatisation de certaines molécules est en effet parfois nécessaire afin d'obtenir une détection optimale par un instrument d'analyse. L'androsténone n'est pas fluorescente naturellement. Afin de pouvoir la détecter grâce à un détecteur à fluorescence, il est nécessaire de lui ajouter un fluorochrome. Ceci est possible grâce au danzylhydrazine (Figure 9).

---

<sup>11</sup> Sur base de l'évaluation par sniffing (= chauffe du gras et reniflement des COVs émis) des carcasses par du personnel entraîné.

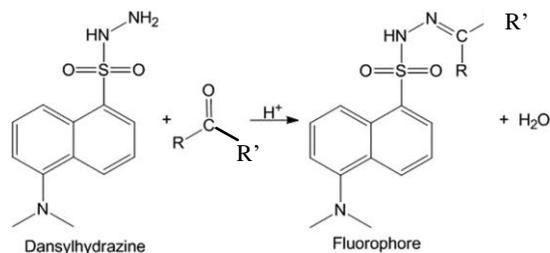


Figure 9 : processus de dérivation grâce au dansylhydrazine d'après (Hogard *et al.*, 2017)

Le détecteur à fluorescence repose sur le principe élémentaire de la fluorescence, c'est-à-dire de l'émission de lumière par une molécule. La molécule, après avoir été excitée voit son niveau d'énergie augmenter, retourne ensuite à son état fondamental en émettant cette énergie sous forme de lumière. Pour être fluorescente (et non en phosphorescence), la molécule doit émettre de la lumière entre  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  secondes après avoir été excitée.

Les conditions d'analyse ont été inspirées de Hansen-Møller (1994) et Aaslyng *et al.* (2016). Des modifications afin d'optimiser le protocole ont été apportées (temps plus long pour revenir aux conditions initiales à la fin de la méthode).

#### 4.2.1 Conditions d'analyse

La phase mobile est composée de 3 solvants :

1. Eau désionisée/ $H_3PO_4$  (0,1% V/V) (CAS n° 7664-38-2, Sigma-Aldrich)
2. Acétonitrile (CAS n° 75-05-8, HPLC grade, Supelco)
3. THF/Eau désionisée (99/1 V/V) (CAS n° 109-99-9, HPLC grade, Supelco)

Le gradient d'élution se présente comme suit :

Tableau 2 : Gradient d'élution en HPLC pour l'analyse des molécules responsables de l'odeur de verrat via détecteur à fluorescence

Temps (en min)	Eau- $H_3PO_4$ (0,1%)	Acétonitrile	THF-eau (99 :1)
0	73	0	27
5,3	73	0	27
7,3	42	24	34
13	42	24	34
13,3	10	0	90
18	10	0	90
24	73	0	27
28	73	0	27

L'analyse a été effectuée grâce à un HPLC (1260 Infinity, Agilent Technologies) et une colonne kinetex EVO C18 100 A (150 x 3.0 mm x 5  $\mu$ m, phenomenex) et une précolonne : AJO- 9297, EVO C18.

La détection des trois molécules se réalise grâce à un détecteur à fluorescence (Agilent Infinity 1260). Les longueurs d'onde d'excitation de 285 nm et d'émission de 340 nm sont fixées pour l'indole et le scatole. Elles sont changées après douze minutes pour la détection des dérivés fluorescents de l'androsténone. Elles sont fixées à 346 nm pour l'excitation et 521 nm pour l'émission pour ce troisième composé.

#### 4.2.2 Préparation des échantillons

Le protocole optimisé est le suivant.

Dans une première étape : 2 mL de méthanol (CAS n° 67-56-1, HPLC grade, Sigma-Aldrich) sont mélangés avec 0,5 g d'échantillon coupé en morceaux d'un calibre standard (0,5 cm de côté). Le mélange a ensuite été homogénéisé à l'aide d'un Ultra-Turrax (T25) pendant trente secondes à 13 500 rpm, 500 µL de méthanol ont été versés sur la tête de l'Ultra-Turrax afin de récupérer tous les morceaux<sup>12</sup>. Après avoir effectué cette étape d'homogénéisation et l'ajout de solvant une deuxième fois, la solution a été homogénéisée à nouveau pendant une minute à 13 500 rpm. Puis l'échantillon est passé cinq minutes au bain à ultra-son (Bandelin, type : RK 514 H) et ensuite quinze minutes dans un bain de glace. Après ce temps, l'échantillon est centrifugé cinq minutes à 4000 g à 5°C (Eppendorf, Minispin 22331). Le surnageant est récupéré, filtré (Whatmann, 0.45 µm) et mis en vial.

#### 4.2.3 Dérivatisation

Afin de rendre l'androsténone fluorescente, une étape de dérivation est nécessaire. L'autosampler a été programmé pour mélanger 30 µL de dansylhydrazine à 2% dans du méthanol (CAS n° 67-56-1, Sigma-Aldrich), 4,4 µL d'eau et 10 µL de BF<sub>3</sub> à 20% v/v (CAS n° 373-57-9, VWR) dans 140 µL d'échantillon. Un temps de réaction de cinq minutes a été observé, ensuite 20 µL de l'échantillon incubé est injecté en HPLC.

#### 4.2.4 Validation

Afin de pouvoir être certains de l'efficacité du protocole d'extraction ainsi que de la méthode utilisée, les limites (LOD et LOQ), les courbes d'étalonnages, l'effet de matrice, le rendement d'extraction, la répétabilité et la reproductibilité ont été déterminés.

Les solutions de standard : le scatole (CAS n° 83-34-1, Analytical standard, Supelco), l'indole (CAS n° 120-72-9, Analytical standard, Supelco) et l'androsténone (CAS n° 18339-16-7, Sigma-Aldrich) sont préparés dans une solution de méthanol/eau (95/5, v/v).

##### 4.2.4.1 Limites

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été calculées sur base du rapport du signal sur bruit de fond. La LOD correspondant à un signal trois fois supérieur au bruit de fond, et la LOQ à un signal dix fois supérieur à ce dernier.

---

<sup>12</sup> La vitesse d'homogénéisation ainsi que le temps n'étant pas clairement explicités dans les articles de référence, ils ont donc été déterminés par des tests préliminaires.

#### 4.2.4.2 Courbes d'étalonnages

Les courbes d'étalonnages ont été établies pour chacune des molécules devant être quantifiées à l'issue des analyses : le scatole, l'indole et l'androsténone. Trois répétitions de chaque droite ont été effectuées. Elles ont été premièrement réalisées dans un solvant (méthanol/eau à 95/5 v/v), et ensuite dans une matrice de graisse de truie<sup>13</sup>.

Le schéma de dilution pour l'indole et le scatole est le suivant : 0–25–50–100–200–300–400–500 ng/g et celui de l'androsténone est 0–250–500–1000–2000–3000–4000–5000 ng/g .

#### 4.2.4.3 Effet de matrice

Étant donné que la graisse de porc est une matrice complexe, elle peut apporter des interférences à la quantification exacte des molécules de scatole, indole et androsténone par HPLC. Il est donc nécessaire de connaître l'effet de cette matrice. Pour ce faire, la pente de la droite de calibration dans le solvant et dans la matrice a été comparée.

$$\text{ME (\%)} = \frac{\text{pente de la droite dans la matrice}}{\text{pente de la droite dans le solvant}} * 100$$

#### 4.2.4.4 Rendement d'extraction (recovery)

Le *recovery* ou rendement d'extraction permet de voir si la méthode d'extraction des molécules de l'échantillon est acceptable. Pour ce faire, la même matrice de graisse de truie a été ajoutée (avec les mêmes concentrations) avant et après l'extraction (voir 4.2.2 Préparation des échantillons pour la méthode d'extraction).

$$\% \text{ récupération} = \frac{C}{B} * 100$$

- C = teneur mesurée = aire moyenne du pic avant extraction
- B = niveau de renforcement = aire moyenne du pic après extraction

### 4.3 Analyse quantitative des COVs émis lors de la chauffe du gras

#### 4.3.1 Préparation de l'échantillon

Afin de pouvoir réaliser le dispositif expérimental de chauffe, des morceaux calibrés d'environ 2 g ont été préparés. Le morceau de gras est paré de sa peau. Ensuite, des tranches de 1 cm d'épaisseur sont découpées au moyen d'un emporte-pièce rond de 2 cm de diamètre. Les morceaux sont découpés afin d'être tous identiques.

#### 4.3.2 Dispositif expérimental

Afin d'optimiser le dispositif expérimental de piégeage des COVs, différentes combinaisons de paramètres ont été testées.

La partie constante du dispositif est la mise en place d'un fer à souder thermorégulé ainsi qu'une cuisson directe du morceau de gras. Le fer à souder thermorégulé (Ersa, Type RDS80) est donc en contact direct avec un morceau de gras de 0,5 g. Il est également composé d'un système de

---

<sup>13</sup> L'indole et le scatole se trouvent à faible concentration, et l'androsténone est absent dans celle-ci.

pompage de l'air via une pompe Gillian (GillianAir Plus). Cet air passe par des cartouches Tenax TA (Camsco,USA) afin de capturer les COVs émis.

Deux configurations différentes ont été expérimentées :

Une sans une enceinte hermétique, c'est-à-dire, le dispositif de piégeage avec la cartouche juste au-dessus du morceau de gras en train d'être chauffé a été testé.

La deuxième configuration est composée d'une enceinte totalement hermétique, un corps de réacteurs de 100 mL et une tête à quatre sorties (référence : 0.943.353, marque Witeg) adaptable, dans lequel se trouve l'échantillon chauffé ( Figure 10).

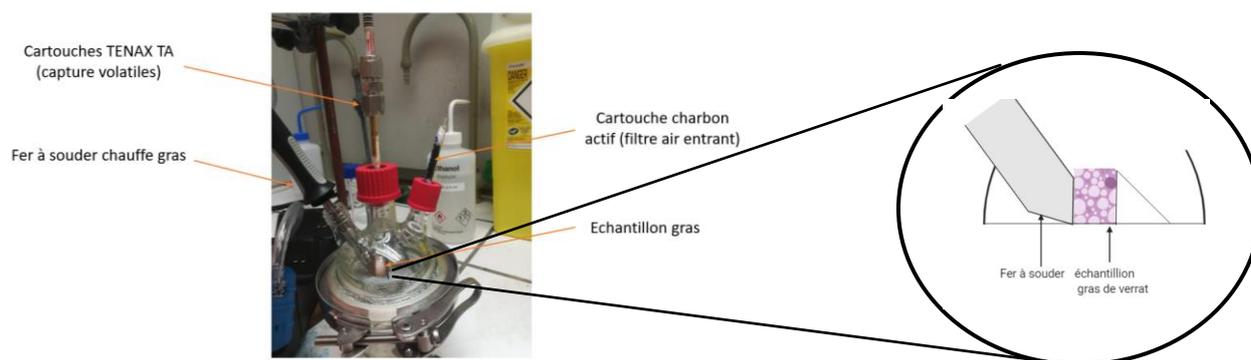


Figure 10 : dispositif de scale down du capteur et une vue simplifiée de face du contact morceau de gras/fer à souder

Des tests ont été effectués afin de terminer le point de percée pour les composés ciblés afin de prélever un maximum d'indole, de scatole et d'androsténone. Plusieurs paramètres ont été testés afin d'optimiser ce dispositif (Tableau 3).

Tableau 3 : tableau des différents paramètres testés afin de déterminer le point de percée

**Dispositif :** Avec éléphant (**Figure 10**) ou sans éléphant

<b>Température et temps de chauffe</b>	440°C, 10 ou 30 secondes
<b>Temps d'« équilibrage »</b>	0 ou 10 minutes
<b>Débit :</b>	100 et 200 ml/min
<b>Volume total d'air</b>	60 à 4500 ml

Les différents paramètres testés, les meilleures conditions et la détermination du point de percée se sont faites avec le dispositif de l'éléphant, à 440°C pendant trente secondes, sans temps d'équilibrage et avec un volume de 3 750 ml pompé à 100 ml/min.

#### 4.3.3 Analyse par GC-MS

Afin de mesurer la teneur et la concentration en COVs piégés sur les cartouches, elles sont analysées en GC-MS afin de déterminer la quantité en COV des trois molécules (androsténone, scatole et indole).

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'une unité TDU (unité de désorption thermique)/CIS (système d'injection refroidi) couplée à un système GC-MS (7890A-5975C, Agilent Technologies Inc.) équipé d'une colonne capillaire HP-5 MS (30 mx 250 µm x 0,25 µm, Agilent Technologies Inc.). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 0,3 ml/min<sup>1</sup>.

Le programme de température de l'unité de désorption thermique (TDU) était le suivant : 45°C pendant 0,20 min, suivi d'une augmentation une vitesse de 35°C min<sup>-1</sup> et d'un maintien à 300°C pendant 12 min.

Le système d'injection refroidi (CIS) respectait le programme de température suivant : - 10°C pendant 0,20 min, puis une augmentation à 300°C à une vitesse de 12°C s<sup>-1</sup>, et enfin, maintenu pendant 5 min.

Le programme du four GC d'autre part était : 70°C pendant 10 min, suivi d'une augmentation de 20°C min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 135°C, suivi d'une augmentation de 5°C min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 150°C, suivi d'une augmentation de 1°C min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 155°C, suivi d'une augmentation de 5°C min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 170°C, suivi d'une augmentation de 10°C min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 220°C, suivi d'une augmentation de 5°C min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 260°C et d'une augmentation de 20°C min<sup>-1</sup> jusqu'à une température de 280°C.

La température du quadripôle a été fixée à 150°C, et la source MS à 230 ° C. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode EI à 70 eV. La masse scannée variait de 30 à 400 m/z. Les ions ont été détectés en SIM (détection ion unique) afin de pouvoir quantifier des concentrations plus faibles (Tableau 4).

Tableau 4 : Tableau des ions SIM se référant aux trois molécules d'intérêt (indole, scatole, et androsténone)

Analytes	Ions SIM	
	Quantification	Qualification
Indole	117	90 et 63
Scatole	130	103 et 77
Androsténone	272	257 et 239

## 4.4 Analyse générale du profil en COVs de la graisse de truie, verrat non odorant et odorant

### 4.4.1 Échantillonnage

Afin de pouvoir faire une étude comparative des trois profils en COVs émis par du gras chauffé de truie, de verrat non odorant et odorant, la préparation des échantillons est identique au point 4.3.1 Préparation de l'échantillon. Après avoir déterminé le point de percée et l'optimisation du dispositif expérimental du point 4.3.2, à une température de chauffe de 440°C, pendant dix secondes dans un dispositif hermétique, nommé éléphant et un volume pompé de 3 750 ml, les échantillons ont subi le même traitement.

### 4.4.2 Analyse en GC-MS

Les analyses en GC-MS suivent les mêmes conditions qu'au point 4.3.3 Analyse par GC-MS à l'exception du programme de température qui est de 40°C pendant trois minutes, avec

ensuite une montée lente de 5°C/min jusqu'à 300°C. Un dernier palier de cinq minutes clôture l'analyse.

La liste des composés présents a pu être mise en évidence grâce au programme Mass Hunter, Qualitative Workflow B.08.00.

#### 4.4.3 Analyse statistique

Afin de pouvoir identifier une différence entre les profils de truie, de verrat non odorant et de verrat odorant, une analyse discriminante linéaire a été effectuée grâce au programme Rstudio (Rstudio, Boston). Une analyse discriminante linéaire (ADL) est une analyse statistique descriptive qui permet de mettre en évidence les caractéristiques mesurées à partir de variables sur des individus, en les regroupant en classes et en les caractérisant via ces variables (Rakotomalala, 2010).

Les trois groupes dans notre cas sont d'une part la liste des COVs retrouvées dans la graisse de verrat odorant, de verrat non odorant et de truie, le but étant de comprendre et d'identifier quelles molécules pourraient gêner la lecture avec le capteur, connaître le profil de manière générale des matrices. De plus, il est intéressant de faire ressortir des molécules caractéristiques d'un profil, même si elles ne sont pas forcément odorantes, afin de l'analyser et de l'identifier comme typique du profil du verrat odorant.

### 4.5 Analyse du bruit de fond en abattoir

#### 4.5.1 Échantillonnage de l'air

L'analyse du bruit de fond de l'odeur dans l'abattoir est un élément essentiel. Effectivement, afin de développer le capteur, il est important intégrer les données des odeurs résiduelles se trouvant dans l'abattoir.

Des volumes déterminés d'air (un débit constant de 70 mL min<sup>-1</sup> pendant une heure) sont prélevés à différents endroits dans la salle d'abattage dans le but d'obtenir une moyenne des COVs présentes dans la zone d'abattage des porcs en abattoir. La méthode a été inspirée d'un article (Zhang *et al.*, 2010). Des cartouches Tenax TA (Camsco, USA), préalablement conditionnées au N<sub>2</sub>, ont été utilisées.

Les cartouches ont été stockées à -80°C, avant analyse en GC-MS.

#### 4.5.2 Analyse par GC-MS

Les échantillons ont été analysés suivant un programme TDU : nous avons fait passer la température de 100°C à 250°C en 5 minutes. La température a été maintenue pendant 30 secondes (Rabaud *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2010). Le programme GC-MS est identique à celui présenté ci-dessus (cf. partie 4.3.3 Analyse par GC-MS)

La liste et un pourcentage relatif des COVs présents dans la salle d'abattage ont pu être établis. Le but était de déterminer les molécules majoritairement présentes dans l'air ambiant et de déterminer s'il existe des différences au sein de la même salle d'abattoir, ainsi que l'importance des paramètres de saisonnalité, de races...

## 5. Résultats

Cette section consacrée aux résultats s'articule autour de deux grandes parties qui reflètent les deux techniques d'analyse mises en place.

La première partie, réalisée en HPLC-FLD, présente une validation de la technique ainsi que le dosage en indole, scatole et androsténone dans des échantillons de gras de verrat. Elle répond ainsi au premier objectif.

La seconde partie, réalisée en GC-MS, répond aux trois autres objectifs. Premièrement, l'établissement d'une liste des COVs retrouvés dans la salle de découpe de l'abattoir. Deuxièmement, une mise au point de la technique de prélèvement des COVs, afin de quantifier les trois molécules cibles, sur du gras chauffé est présentée. Et troisièmement, l'établissement des profils en COVs complet et sans *a priori* émis par la chauffe du gras de truie, de verrat non odorant et de gras odorants, complété par une analyse discriminante linéaire de ces trois profils dans le but d'établir les molécules contributrices de l'odeur de verrat.

### 5.1 Quantification de l'indole, scatole et androsténone contenus dans le gras via HPLC-FLD

#### 5.1.1 Validation de la méthode

Aucune norme relative au dosage simultané d'indole, de scatole et d'androsténone n'existe. Le guide de l'Europe 2002/657/EC (The Commission of the European Communities, 2002) et divers articles sur des validations de méthode (Ducauze *et al.*, n.d. ; Verheyden *et al.*, 2007 ; Bekaert *et al.*, 2012) ont servi de base au développement et à la validation de la méthode utilisée dans le présent travail. Il s'agit d'une adaptation de la méthode décrite par Hansen-Moller (1994).

##### 5.1.1.1 Spécificité

La spécificité d'une méthode peut être démontrée lorsque ladite méthode peut discerner l'analyte d'autres substances lors de l'analyse.

Une matrice parfaite ne contenant pas les trois analytes ciblés n'existe pas. En effet, même les échantillons de truie peuvent contenir un faible pourcentage d'indole et de scatole. Cette matrice est cependant la plus indiquée comme matrice de référence pour la mise au point de la présente méthode, malgré ses faibles taux d'indole et scatole.

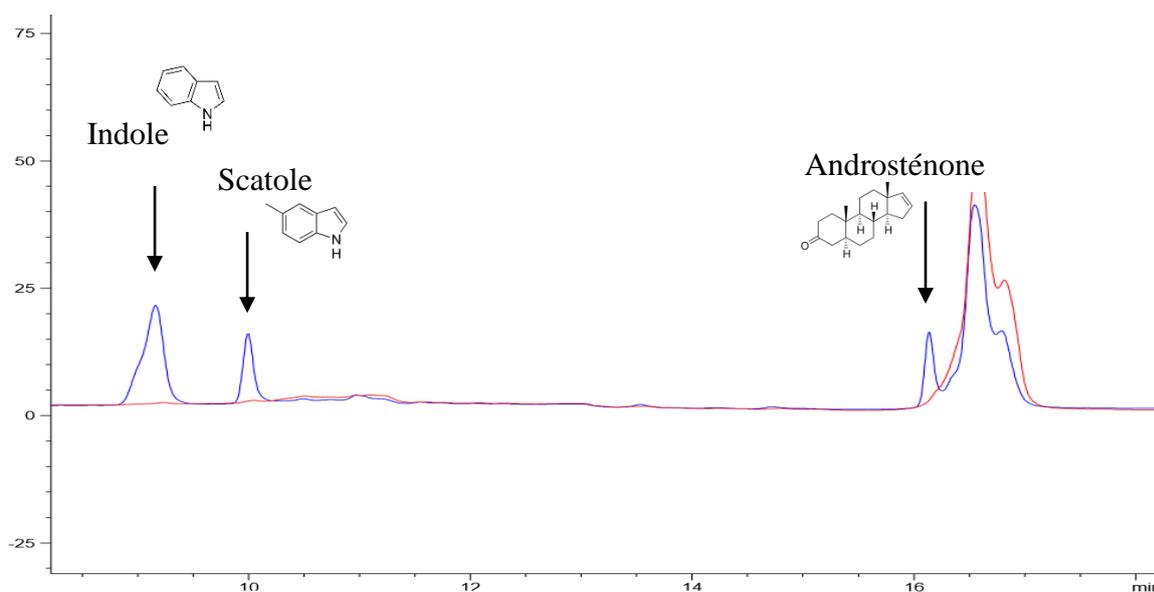


Figure 11 : Chromatogrammes superposés d'un échantillon de truie (en rouge) et du même échantillon de truie dopés avec 500ng/g d'indole et scatole et 5000 ng/g d'androsténone (en bleu)

Il est à remarquer que l'intensité des pics de la truie dopés est plus importante et qu'aucun autre pic de substances endogènes ne vient se superposer dans les chromatogrammes au niveau de l'indole et du scatole. Il est aussi à noter un pic fort proche du pic d'intérêt de l'androsténone provenant de la matrice, puisqu'il n'est pas présent sur le blanc analytique. Cependant, il est tout à fait possible d'intégrer ce pic en soustrayant le pic présent dans la matrice non dopés.

### 5.1.1.2 Calibration-Linéarité

La linéarité de la méthode développée a été évaluée par des courbes d'étalonnage en sept points dans le solvant et la matrice pour les différents composés. Les échantillons à blanc ont été enrichis avec des concentrations allant de 25 à 500 ng/g théoriques pour l'indole et le scatole. Les concentrations étaient de 250 à 5 000 ng/g théoriques pour l'androsténone. Des droites de régression linéaire et les coefficients de corrélation ( $R^2$ ) ont été calculés (Tableau 5).

Tableau 5 : Tableau de données de calibration-linéarité de la méthode HPLC-FLD

	Droite de régression		Coefficient de régression ( $R^2$ )	
	Solvant	Matrice	Solvant	Matrice
Indole	$Y=0,3407x+1,0976$	$Y=0,4025x+0,9111$	0,98	0,98
Scatole	$Y=0,1717x-0,9096$	$Y=0,1718x+0,9035$	0,97	0,96
Androsténone	$Y=0,0163x-1,24$	$Y=0,0153x+9,8098$	0,97	0,96

Les résultats obtenus par régression linéaire montrent une bonne linéarité pour les trois molécules. Les coefficients ( $R^2$ ) sont légèrement plus élevés dans le solvant. Ils sont respectivement de 0,98, 0,97 et 0,97 dans le solvant pour l'indole, le scatole et l'androsténone. Ils sont de 0,98, 0,96 et 0,96 dans la matrice.

### 5.1.1.3 Rendement d'extraction et effet de matrice

L'indole, le scatole et l'androsténone présentent des caractéristiques lipophiles conséquentes ; l'extraction de ces composés de la matrice de gras reste donc une étape critique (Kock *et al.*, 2001).

Tableau 6 : Paramètres chimiques des molécules d'indole, scatole et androsténone

	Poids moléculaire (g/mol)	Point fusion (°C)	Point ébullition (°C)	Solubilité (eau) (en mg/l à 25°C)
Indole	117,15	52,5	254	3560
Scatole	131,18	95	266	450
Androsténone	272,4	142,5	371	0,23

De plus, la matrice de gras de porcs est complexe et nécessite par conséquent un nettoyage et un parage rigoureux pour ne pas avoir d'interférence lors de l'analyse (Verheyden *et al.*, 2007 ; Haugen *et al.*, 2012). En effet, une analyse d'un échantillon de gras par Rius Solé *et al.*, (2001) a mis en évidence plus de 75 molécules différentes, principalement des aldéhydes (nonanal, hexadecanal...) des acides carboxyliques (acide décanoïque...) des alcools, des hydrocarbures ou d'autres molécules telles que des dérivés phénoliques, d'éthanol ou encore du squalène et du cholestérol, par exemple.

L'extraction de ces molécules de la matrice n'est pas totale. Il est donc primordial de connaître le rendement de la présente méthode d'extraction dans la matrice grasse.

L'extraction de l'indole, du scatole et de l'androsténone nécessite une extraction liquide-solide. Elle peut être effectuée au moyen de différents solvants organiques. Cependant, il est difficile de trouver un solvant candidat à l'extraction des composés indoliques et des stéroïdes, qui ont des polarités différentes (voir Tableau 6). Plusieurs solvants organiques ont été utilisés avec des résultats différents. De ce fait, certains n'ont extrait que l'indole et le scatole. Par exemple Dehnhard *et al.*, (1993) ont utilisé de l'hexane/acétonitrile (25/75) et ont obtenu un rendement d'extraction de 98,9 et 93,8% pour le scatole et d'indole. D'autres avec du méthanol (Hansen-Møller, 1994), un mélange d'hexane/2-propanol (92 : 8) (Garcia Regueiro *et al.*, 1998) ou encore le dichlorométhane (Tuomola *et al.*, 1996). Cependant, il est possible de recourir à une extraction simultanée des composés indoliques et des stéroïdes. Le méthanol a donné un rendement d'extraction proche des 100% lors de l'extraction de l'androsténone, du scatole et de l'indole (Hansen-Møller, 1994 ; Chen *et al.*, 2007 ; Haugen *et al.*, 2012).

Le rendement d'extraction a été calculé en effectuant un ajout dosé des échantillons à des concentrations de 100 et 400 ng/g pour l'indole et le scatole, et à 1 000 et 4 000 ng/g pour l'androsténone. Les analyses ont été faites en six répétitions. (Tableau 7)

Tableau 7 : Rendement d'extraction de l'indole, du scatole et de l'androsténone en %

	Indole (en %)	Scatole (en %)	Androstenone (en %)
Moyenne	88,1 ± 13,8	90,8 ± 3,9	72,2 ± 3,3
(Hansen-Møller, 1994)	104,8 ± 9	96,9 ± 6	100,7 ± 5

La procédure d'extraction possède des similarités avec le protocole de Hansen-Møller (1994), (homogénéisation, sonication, refroidissement et centrifugation). Celui-ci présente cependant des rendements d'extraction plus élevés. L'extraction issue de la littérature résulte en un rendement de 18,91% plus élevé pour l'indole, de 7,5% plus élevé pour le scatole et de 39% plus élevé pour l'androsténone.

Toutefois, la méthode de référence ne reprend pas toutes les conditions nécessaires lors de cette extraction (p.ex., temps et vitesse d'homogénéisation). La méthode testée dans ce travail a fait l'épreuve de différents tests afin d'optimiser ces lacunes, et chaque modalité a été conservée une fois le meilleur rendement obtenu.

Une étape préalable de chauffe par micro-ondes peut également être réalisée (Fischer *et al.*, 2011 ; Bekaert *et al.*, 2012 ; Verplanken, Wauters, Vercruysse, *et al.*, 2016). Celle-ci a donc été testée ici. Après avoir été coupé en morceau de 0,5 cm de côté, le gras a été chauffé avec les paramètres suivants : une montée en température jusque 80°C en une minute et un maintien à la température de 80°C pendant trois minutes. Cependant, les rendements d'extraction ne se sont pas avérés satisfaisants : 73,24 ± 21,01% pour l'indole ; 55,69 ± 7,38% pour le scatole, et 53,92 ± 16,07% pour l'androsténone. Cette étape affaiblit donc la valeur du rendement d'extraction. Il a été décidé de la supprimer dans les étapes d'extraction de ce travail. Une hypothèse serait une perte au niveau des parois de l'échantillon, et donc, finalement, une concentration plus faible avant le processus d'extraction. Une autre hypothèse serait une volatilisation partielle des molécules d'intérêt due à la chauffe de l'échantillon et de sa déstructuration.

De plus, l'article de Hansen-Møller (1994) a testé différentes modalités d'ajout dosé ainsi que davantage de répétitions.

Enfin, les rendements d'extraction présents dans ce travail ne correspondant pas aux 100% théoriques. Un facteur correctif a été appliqué à toutes nos concentrations d'échantillons afin d'annuler le biais que peut représenter l'extraction. L'analyse en HPLC-FLD vise à quantifier les trois molécules majoritairement responsables de l'odeur de verrat : l'indole, le scatole et l'androsténone. Cependant, le gras de porc est une matrice complexe, car il comporte une grande variété de molécules. Rius Solé *et al.*, (2001) en a détecté plus de 75, avec principalement des aldéhydes (nonanal, hexadecanal...) des acides carboxyliques (acide decanoïque...) des alcools, des hydrocarbures ou d'autres molécules tels que des dérivés phénoliques, de l'éthanol ou encore du squalène et du cholestérol, par exemple. Il peut donc se produire un effet de matrice. Ce dernier est défini comme un biais lors de l'analyse et est dû à l'environnement chimique dans lequel se trouve la molécule analysée. Celui-ci a pu être mis en évidence en faisant le rapport des droites de calibrage dans le solvant (le méthanol) et la matrice de truie (Tableau 8 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Tableau 8: Effet de matrice ; rapport des pentes des droites d'étalonnage dans le solvant et la matrice

	Indole	Scatole	Androsténone
<i>pente dans le solvant</i>	0,3407	0,1717	0,0163
<i>pente dans la matrice</i>	0,4025	0,1719	0,0153
<b>Rapport (%)</b>	118	100	94

La comparaison des pentes des droites d'étalonnage réalisées dans le solvant (méthanol) et dans la matrice fait ressortir un effet de matrice. Effectivement, un rapport de 118% a été observé pour la molécule d'indole et de 94% pour l'androsténone. L'analyse du scatole ne présente pas d'effet de matrice, car le rapport est de 100%. Un effet de matrice positif, tel que c'est le cas pour l'indole, annonce un renforcement ; un effet de matrice supérieur à 100%, tel que c'est le cas pour l'indole, annonce un renforcement de l'analyse. Un effet de matrice en dessous de 100% indique un effet négatif, et donc une sous-estimation de la valeur réelle lors de l'analyse (Matuszewski *et al.*, 2003). Ce qu'il est logique d'observer pour l'androsténone. Comme remarqué à la Figure 11, un pic parasite proche du pic d'androsténone a été constaté.

Cet effet de matrice est à mettre en relation avec le rendement d'extraction. Cet effet de matrice peut expliquer un rendement d'extraction inférieur à 100%. L'androsténone étant plus lipophile (voir Tableau 6), il est plus difficile de l'extraire du gras (Kock *et al.*, 2001). Cette rétention de l'androsténone explique un rendement d'extraction moindre et, de ce fait, une matrice qui interfère dans le dosage.

L'extraction exerce une grande influence sur l'effet de matrice. À méthode de détection égale, LC-MS/MS, l'effet de matrice sur les trois molécules peut être différent. En effet, Buttinger *et al.*, (2014) procède à une étape finale de chromatographie d'exclusion stérique (SEC), tandis que Verheyden *et al.*, (2007) obtient une extraction similaire des étapes précédentes, mais ne finit que sur une filtration sur papier filtre (0,45 µm) et dilution avec 1% d'acide acétique. (Buttinger *et al.*, 2014) ne met aucun effet de matrice en évidence, tandis que (Verheyden *et al.*, 2007) démontre un effet de matrice important pour l'androsténone avec un coefficient de variation de 33%.

#### 5.1.1.4 Limite de détermination - limite de quantification

La limite de détection (LOD) est la concentration minimale donnant un signal différent du blanc. Elle est calculée comme étant un rapport signal/bruit de 3.

La limite de quantification (LOQ) est la concentration minimale à laquelle l'analyte peut être quantifié. Il est calculé comme le rapport signal/bruit de 10 (CD 2002/657/EC) (The Commission of the European Communities, 2002).

Il existe différents blancs : le blanc analytique et le blanc de matrice. Étant donné que le but de cette analyse est de doser des échantillons avec une matrice de gras, il est plus logique de trouver les LOD et LOQ dans le blanc de matrice.

Tableau 9 : Limite de détection et de quantification dans la matrice de gras pour l'indole, le scatole et l'androsténone

(ng/g)	indole	Scatole	Androsténone
LOD	25	50	50
LOQ	100	100	200

La LOD de l'indole est de 25 ng/g. Elle est légèrement plus élevée pour le scatole avec 50 ng/g. La LOD de l'androsténone est identique à celle du scatole avec une limite à 50 ng/g.

La LOQ est identique pour les deux composés indoliques avec une valeur à 100 ng/g et de 200 ng/g pour l'androsténone.

La LOQ de l'indole et du scatole est plus élevée que dans la littérature (Hansen-Møller, 1994), qui était déterminée à 30 ng/g pour le scatole et l'indole. La LOQ de l'androsténone, en revanche, est identique avec une valeur de 200 ng/g. Cependant, les LOQ de Hansen-Møller, (1994) ont été déterminés dans le solvant (méthanol) et, dans ce travail, dans la matrice de gras.

Cependant, les limites de quantification relevées s'avèrent tout à fait acceptables, car, en gardant en tête l'objectif de la ségrégation des carcasses pour le consommateur, le curseur est le seuil de détection par l'homme. Le seuil de détection pour le scatole étant de 150 ng/g et de 1 000 ng/g pour l'androsténone (Haugen et al., 2012) ; les LOQ sont bien en dessous.

### 5.1.1.5 Répétabilité-reproductibilité

La précision de la méthode peut également être établie en analysant la répétabilité et reproductibilité de cette méthode (Tableau 10). Pour ce faire, les écarts-types relatifs (en %) ont été calculés. Pour la répétabilité, deux séries de six répétitions fortifiées au moyen de deux concentrations contrôlées : 100 ng/g et 400 ng/g pour l'indole et le scatole ; 1 000 et 4 000 ng/g pour l'androsténone. La reproductibilité a, quant à elle, été testée avec deux séries de trois répétitions à un seul niveau de fortification par molécule (400 ng/g pour l'indole et le scatole et 4 000 ng/g pour l'androsténone). Les deux séries ont été réalisées sur deux jours différents et par des opérateurs distincts, afin de modifier les conditions dans lesquelles a eu lieu cette analyse.

Tableau 10 : Précision de la méthode ; répétabilité et reproductibilité de l'indole, scatole et androsténone

	Conc. Ajoutée (ng/g)	Écart-type relatif (%)	
		répétabilité	reproductibilité
<i>Indole</i>	100	1,91	/
	400	2,86	8,72
<i>Scatole</i>	100	3,53	/
	400	2,18	10,13
<i>Androsténone</i>	1000	3,06	/
	4000	5,08	4,09

Les écarts-types relatifs sont très faibles pour la répétabilité. L'écart-type relatif le plus important est celui de pour la molécule d'androsténone fortifiée à 4 000 ng/g, avec une valeur de 5,08%. Ils sont bien inférieurs aux limites imposées par l'équation d'Horwitz<sup>14</sup> ; par exemple, pour 100 ng/g, l'écart-type relatif doit être de maximum 23% et de 16%

<sup>14</sup> Coefficient de Variation =  $2^{(1 - 0,5 \log C)}$ , C représente la fraction de la masse exprimée en puissances de 10 (par exemple, 1 mg/g =  $10^{-3}$ ).

pour 1 000 ng/g (CD 2002/657/EC) (The Commission of the European Communities, 2002), tant pour la répétabilité que pour la reproductibilité.

#### 5.1.1.6 Conclusion

Le but de cette méthode d'analyse est de choisir la méthode d'analyse simultanée de nos trois molécules et celle qui présente le meilleur compromis pour l'analyse de ces trois dernières.

Pour ce faire, une méthode d'extraction et une méthode d'analyse ont été testées et peuvent être validées en répondant à l'objectif initial.

Premièrement, les rendements de la méthode d'extraction sont performants entre 72 et 90%. Des facteurs correctifs ont donc été appliqués aux échantillons, afin de prendre en compte le biais lors de l'extraction. En relation, un léger effet de matrice est observé ; négatif pour l'androsténone et positif pour l'indole. Les limites de quantification et de détection sont en dessous des seuils de détection sensorielle, ce qui prouve la sensibilité de cette méthode. Enfin, la précision est également vérifiée avec des écarts-types relatifs bien en dessous des 20% recommandés par The Commission of the European Communities, (2002), avec une valeur maximale de 10,13% (reproductibilité du scatole).

### 5.1.2 Quantification de l'indole, scatole et androsténone dans le gras de verrats odorants

Un des objectifs globaux du travail est de connaître les valeurs des concentrations en indole, scatole et androsténone dans divers échantillons de gras prélevés en abattoir.

Une trentaine d'échantillons estimés comme contaminés par une odeur de verrat ont été fournis par l'abattoir<sup>15</sup> (Lovenfosse, Aubel).

#### 5.1.2.1 Échantillons analysés

Via la validation de la méthode d'analyse par HPLC-FLD, le rendement d'extraction ne s'est pas avéré à 100%. Un facteur de correction est donc appliqué aux échantillons afin de coller avec la concentration réelle des échantillons (Tableau 11).

Tableau 11 : facteur de correction appliqué aux échantillons lors de l'analyse par HPLC-FLD

	<i>Indole</i>	<i>Scatole</i>	<i>Androsténone</i>
<i>Facteur de correction</i>	1,13	1,10	1,38

Une analyse comparative entre échantillons peut être réalisée (Figure 12). L'axe des X représente la concentration en scatole (en ng/g) dans l'échantillon, et l'axe des Y la concentration (en ng/g) en androsténone. Une troisième échelle, le diamètre des points, est utilisée pour quantifier l'indole.

<sup>15</sup> Identifié comme odorant à la suite d'une détermination par un nez humain sur la chaîne d'abattage.

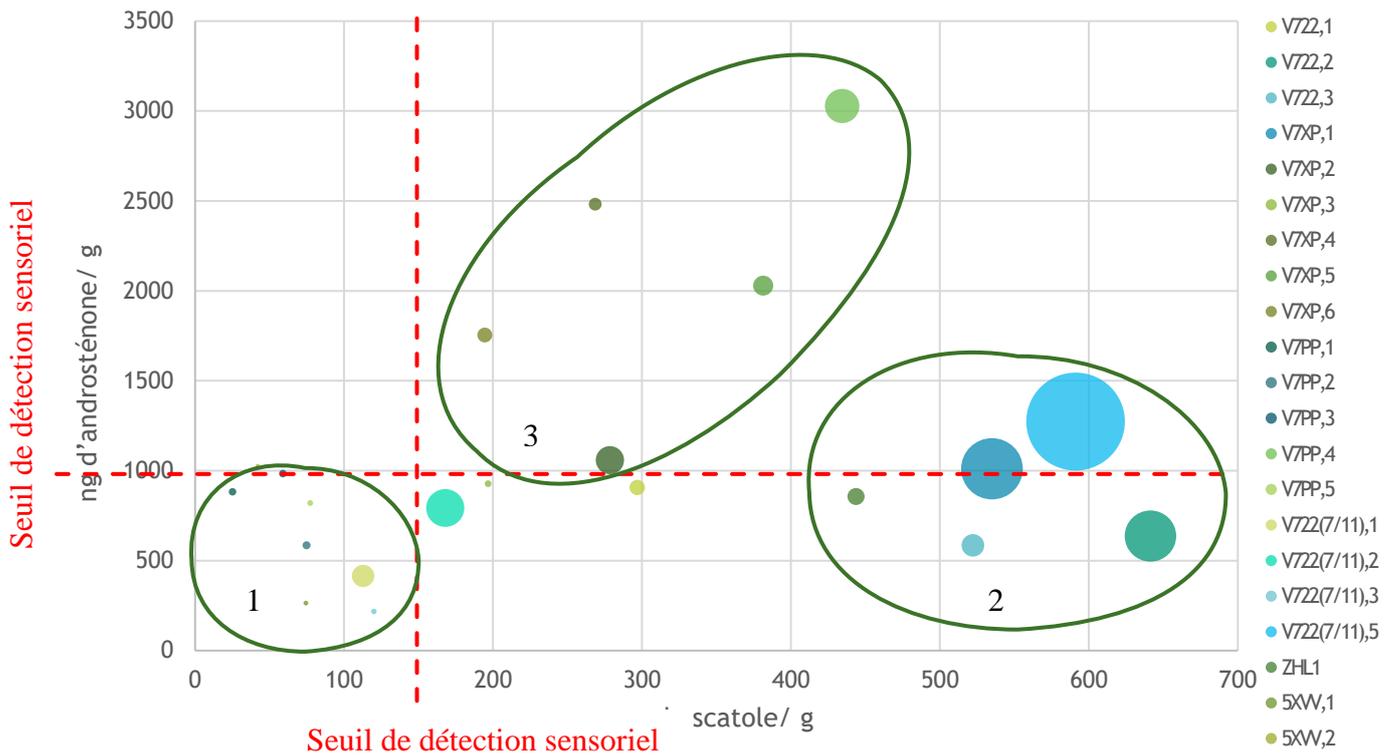


Figure 12 : graphique général de la concentration en indole, scatole et androsténone des échantillons récoltés

Trois grands groupes se distinguent.

Le premier groupe d'échantillons est très faiblement dosé en scatole et en androsténone, car ceux-ci sont en dessous des seuils de détection de ces deux molécules. Les circonférences des points, indiquant la concentration, en indole sont petites (cf. V7PP1, V7PP2, V7PP3, V7PP5, V722 (7/11) 1 à 3, et 5XVV1).

On peut en ressortir deux hypothèses. Soit ces échantillons ont été détectés par l'opérateur comme positifs, mais sont en réalité des faux positifs. Ceci met bien en lumière le problème de cette discrimination par un nez humain.

Soit une synergie des trois molécules (ou d'autres mineures dans la responsabilité de l'odeur de verrat), même à faible dose, donne une odeur de verrat aux échantillons. Il a déjà été prouvé que l'odeur du scatole était renforcée (et par conséquent, plus importante que sa valeur réelle) en présence d'androsténone, notamment par son long pouvoir de rétention, démontré par Annor-Frempong *et al.*, (1997). Cela explique peut-être en partie des échantillons considérés comme porteurs d'une odeur de verrat par un pénaliste entraîné et qui, en réalité, n'ont qu'une très faible concentration de scatole et d'androsténone.

Afin de confirmer tout cela, une étude sur davantage d'échantillons serait nécessaire ainsi qu'une étude par analyse sensorielle, afin d'avoir un large panel d'experts et d'éliminer l'hypothèse des faux positifs et, dès lors, confirmer la piste de l'hypothèse de la synergie entre molécules.

Un deuxième groupe se distingue par une très forte concentration en scatole, mais très faible en androsténone, voire même en dessous du seuil de détection de ce dernier (V722 2 et

3, V7XP 1, V722 (7/11)5 et ZHL1). Les concentrations en indole sont également plus importantes. Ce groupe met en évidence que l'odeur de verrat peut provenir uniquement du scatole (ou à faible participation de l'androsténone), et probablement de l'indole. L'indole et le scatole sont deux composés indoliques provenant tous les deux, par biosynthèse, du L-Tryptophane (Zamaratskaia, Chen, et al., 2006). La génétique, les conditions d'élevage et la maturité sexuelle déterminent la concentration en composés indoliques (Zamaratskaia *et al.*, 2008). Il est donc probable qu'un de ces trois facteurs (ou plusieurs) ait influencé la composition en indole et scatole pour ces échantillons.

Un troisième groupe met en lumière des échantillons contenant une grande concentration en scatole et en androsténone. À de hautes concentrations d'androsténone, le cytochrome P450 est en partie inhibé (Doran *et al.*, 2002). Étant donné que ce cytochrome est impliqué dans le catabolisme du scatole (Skrlep *et al.*, 2012 ; Parois, 2016 ; Parois *et al.*, 2018), il est logique de retrouver une grande quantité de scatole, lorsque la quantité d'androsténone chez le porc est importante.

*A contrario*, aucun échantillon n'est fortement dosé en androsténone et pas du tout en scatole. Ce qui peut également être expliqué par les propriétés plus lipophiles de l'androsténone. Le coefficient de partage de l'androsténone (CP air/eau = 0,012 à 25°C) est plus élevé que celui du scatole, sera par conséquent libéré plus lentement et aura un impact olfactif moindre. Le scatole, théoriquement, a des coefficients de partage de phase inférieurs et est donc plus facilement libéré de la matrice grasse dans les phases aqueuse et gazeuse. De ce fait, et par sa plus faible volatilité, la molécule d'androsténone aura moins tendance à être libérée lors du test de chauffe (Kock *et al.*, 2001) par l'opérateur, et donc celui-ci aura moins d'occurrences à sortir ce type d'échantillon de la chaîne de production. De plus, la molécule serait plus largement détectée par le consommateur par la voie rétronasale que nasale (Kock *et al.*, 2001) lors de la mastication de la viande.

L'échantillon V7XP1 contient une très grande quantité d'indole, cependant, la majeure partie des échantillons dans ce groupe présente une quantité faible d'indole. Ce qui est assez étonnant, car Mörlein *et al.*, (2015) a déterminé une teneur moyenne, dans un groupe de porcs à haute concentration en molécules responsables de l'odeur de verrat, de 331,9 ng d'indole/g de gras. Or seul un échantillon (le plus élevé en indole) atteint cette valeur avec une concentration de 348 ng d'indole/g. Tous les autres échantillons ne dépassent pas le seuil des 200 ng/g. En conséquence, dans les échantillons chargés en scatole et androsténone, une forte concentration en indole n'est pas systématique.

En bref, soit les échantillons sont très faiblement dosés en indole, scatole et androsténone ; ils se situent même en dessous des seuils de perception sensoriels (groupe1). Soit ils sont très élevés en composé indolique, surtout en scatole. Enfin, le troisième groupe est très élevé en scatole et androsténone, mais peu en indole. Ces échantillons sélectionnés grâce à une discrimination par un nez humain prouvent que ce dernier reconnaît l'odeur de verrat dans des groupes à concentrations fort différentes. Le capteur final devra également être capable de détecter cette odeur dans ces différents groupes.

## 5.2 Analyse des COVs

Après une analyse et une détermination de la concentration exacte des molécules (indole, scatole et androsténone) contenues dans les échantillons, une analyse de COVs doit être effectuée à plusieurs niveaux : une analyse en abattoir dans le but d'analyser le bruit de fond de l'odeur présente afin d'éliminer ultérieurement ce bruit de fond lors du développement du capteur, mais également les COVs émis lors de la chauffe du gras pour mettre en relation les teneurs de ces trois molécules avec les variations de profil perçues.

Dans le but de répondre à cet objectif, trois grandes parties sont explorées : tout d'abord, une liste complète et sans *a priori* des COVs présents en abattoir, afin d'obtenir un bruit de fond et d'en tenir compte pour le futur capteur. Ensuite, la mise en place de l'analyse de ces COVs des molécules d'indole, de scatole et d'androsténone en GC-MS et l'échantillonnage de ces derniers. Et enfin, une étude comparative générale des profils types d'une truie, d'un verrat non odorant et d'un verrat odorant.

### 5.2.1 Bruit de fond en abattoir

Le but de cette analyse est d'obtenir une connaissance de ce bruit de fond afin d'annihiler ces interférences olfactives pour le développement du capteur. Il est donc utile de fournir une liste globale et moyenne des COVs que l'on retrouve en abattoir.

Cette liste a été réalisée à l'aide de trois prélèvements d'air au même moment, mais à différents endroits de l'abattoir.

Tableau 12 : Liste des molécules présentes lors du prélèvement d'air en abattoir (Nom de la molécule, son numéro CAS, l'index de rétention calculé et de la littérature ainsi que le pourcentage moyen de l'aire)

Nom	CAS	RI calculé	RI littérature	% moyen aire
<b>Alcool/phénols</b>				
<i>1-dodécanol</i>	112-53-8	1476,0826	1478	1,38±0,05
<i>1-tetradécanol</i>	112-72-1	1677,53033	1674	0,79±1,41
<b>Aldéhydes</b>				
<i>pentanal</i>	110-62-3	703,557949	702	0,46±1,16
<i>hexanal</i>	111-71-7	804,20832	802	0,45±1,91
<i>octanal</i>	124-13-0	1004,76593	1005	1,21±1,56
<i>nonanal</i>	124-19-6	1105,5069	1098	4,07±0,24
<i>2-nonéanal</i>	2463-53-8	1169,48323	1165	0,89±0,16
<i>décanal</i>	112-31-2	1206,49359	1209	0,86±0,56
<i>undécanal</i>	112-44-7	1307,79532	1307	0,15±0,37
<i>2-undécenal</i>	2463-77-6	1365,92939	1356	0,18±0,37
<i>dodécanal</i>	112-54-9	1408,86302	1426	0,51±0,03
<b>Aromatique</b>				
<i>benzaldéhyde</i>	100-52-7	896,49892	933	0,53±1,75
<b>Alcane</b>				
<i>dipentyl disulfide</i> <sup>16</sup>	112-51-6	1157,09966	1456	0,65±0,24
<i>undécane</i>	1120-21-4	1092,22445	1100	1,44±0,19

<sup>16</sup> L'indice de rétention de la littérature et calculé sont différents de plus de 5%.

2,5 dimethyl-undécane	17301-22-3	1213,41755	1210	0,84±0,11
tridécane	629-50-5	1298,41145	1300	0,17±0,54
tétradécane	629-59-4	1397,84212	1400	0,28±0,37
pentadécane	629-62-9	1497,07581	1500	0,45±0,79
hexadécane	544-76-3	1597,52771	1600	1,38±1,58
heptadécane	629-78-7	1696,84056	1700	0,66±1,75
<b>Alcène</b>				
squalène	7683-64-9	2826,76593	2809	8,91±0,66
<b>Acide carboxylique</b>				
(S)-isopropyl lactate	63697-00-7	761,695927	794	2,25±2,12
acide hexanoïque	111-14-8	1018,04562	1012	0,38±0,19
acide nonanoïque	112-05-0	1289,09381	1280	1,05±6,27
acide décanoïque	334-48-5	1381,15807	1380	0,48±0,37
acide (Z)- Dibutyl esterbutenedioïque	105-76-0	1539,54877	1505	0,52±0,77
acide dodécanoïque	112-80-1	1573,07273	1574	0,44±1,55
acide tétradécanoïque	544-63-8	1771,03878	1756	1,36±0,75
acide pentadécanoïque	1002-84-2	1868,59438	1869	0,58±0,76
acide cis-7-hexadécanoïque	2416-19-5	1950,06778	1976	1,87±1,91
acide n-hexadécanoïque	57-10-3	1978,33886	1978	11,15±0,72
acide (Z)-9-octadécenoïque	112-80-1	2149,71991	2146	5,34±0,47
acide octadécanoïque	57-11-4	2173,89284	2173	4,20±0,43

Une liste des principaux COVs présents dans une porcherie a déjà établie : acide acétique, acide propanoïque, acide isobutanoïque, acide butanoïque, acide isopentanoïque, acide pentanoïque, acide hexanoïque, guaiacol, acide heptanoïque, phénol, p-cresol, 4-éthylphénol, 2-aminoacétophénone, indole et le scatole (Zhang *et al.*, 2010).

Malgré une prise d'échantillons à divers endroits dans une porcherie, il apparaît que certaines molécules provenant des porcs peuvent être similaires, étant donné que l'on traite du même animal. Seuls l'acide butanoïque et l'acide hexanoïque sont similaires. Cependant, la différence observée est logique, étant donné que le milieu n'est pas identique. Dans une porcherie, les COVs émis seront d'ordre externe à l'animal comme, par exemple, les excréments. De plus, dans un abattoir, les conditions d'hygiène sont différentes, les animaux sont lavés. Mais des COVs émis lors de la découpe de l'animal peuvent également survenir (odeur de sang, viscères, etc). Enfin, d'autres sources externes aux porcs peuvent également être présentes, notamment dues à l'homme ou encore aux installations (produits de nettoyages et autres).

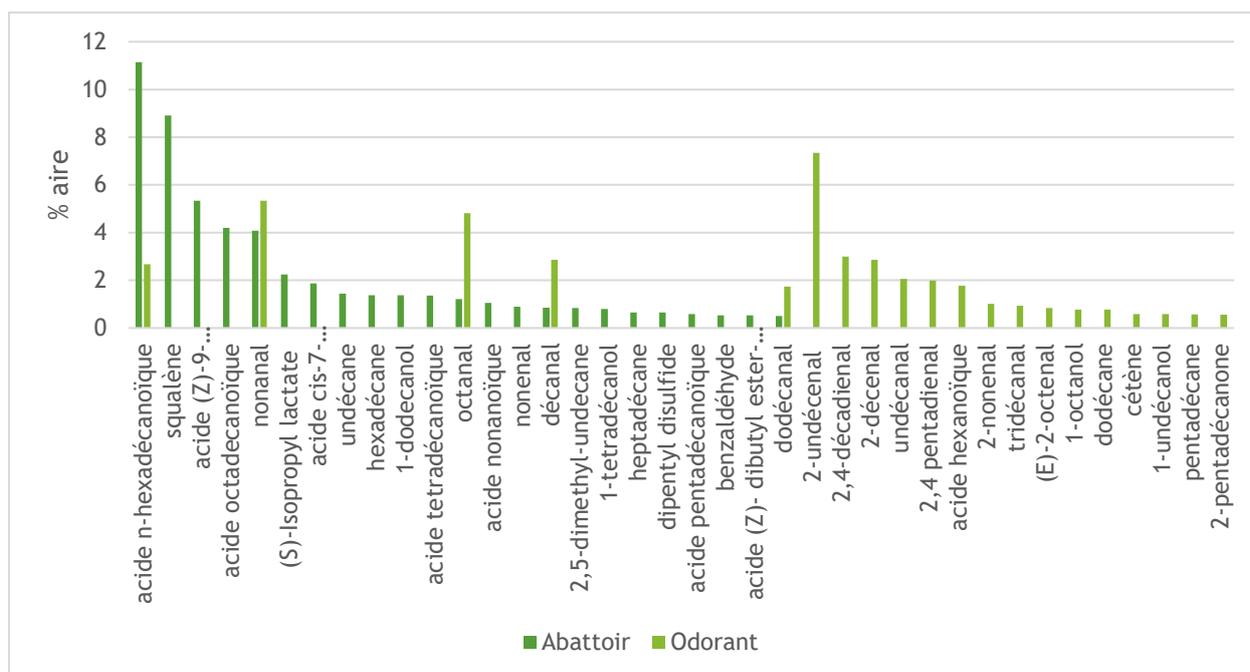


Figure 13 : Comparaison des principaux COVs du verrat odorant et des COVs retrouvés en abattoir

Il est à remarquer que les COVs retrouvés dans le gras de verrats odorants (analyse ci-dessous au point 5.2.3) et les COVs retrouvés en abattoir sont fort différents. Seules quelques molécules sont communes. Cela met donc en évidence les sources exogènes aux porcs, les molécules propres aux porcs ainsi que des molécules issues de la chauffe du gras dans les COVs retrouvés en abattoir. Il est donc important de tenir compte de ces molécules et de leurs potentiels effets sur la fonctionnalité du capteur en abattoir. Maintenant, les COVs obtenus lors de la chauffe du gras sont plus caractéristiques du gras de viande avec le 2-nonenal (Arn, 2004) et la viande cuite avec le 2-décenal (Rius Solé *et al.*, 2001).

Les échantillons ont été analysés le même jour, donc dans des conditions et paramètres (températures ou hygrométrie) semblables. Une perspective intéressante serait de prélever d'autres échantillons dans des conditions différentes afin de pouvoir faire une analyse comparative ainsi que de compléter cette liste et répondre au mieux à l'objectif. Des alternatives seraient de prélever des échantillons différents (différentes races, différentes origines...) à l'abattoir ainsi qu'à une température ou à une saison différente. Effectivement, la saison, comme d'autres paramètres à l'abattage, tels que le poids de l'animal ou encore son stade de puberté, aurait une influence sur le taux d'androsténone, et les conditions d'élevage et la génétique de l'animal sur le taux d'indole et scatole (Claus *et al.*, 1983 ; Zamaratskaia *et al.*, 2008 ; Thomsen *et al.*, 2015).

En conclusion, une liste des différents COVs présents lors de l'abattage de verrats a pu être établie. Celle-ci est caractéristique de l'abattoir, même si d'autres répétitions et modalités pourront la compléter. Celle-ci peut être utilisée pour représenter le bruit de fond en abattoir et, *in fine*, dans la mise au point du capteur.

## 5.2.2 Analyse des COVs par chauffe du gras de verrat

Un des objectifs de ce travail est de développer une technique de récolte des composés organiques volatils émis lors de la chauffe d'un morceau de gras et, idéalement, d'optimiser ce dispositif pour quantifier les trois molécules (indole, scatole et androsténone) responsables de l'odeur de verrat. Pour ce faire, la première étape est de vérifier et d'éprouver la méthode d'analyse en GC-MS. La deuxième étape est de créer et de mettre en place le dispositif de chauffe du morceau de gras et de piégeage des COVs.

### 5.2.2.1 Mise au point de la méthode d'analyse en GC-MS

Le standard interne permet de prendre en compte les variations d'une analyse à l'autre dans le résultat final.

Le standard interne, l'éthyle indole-2-carboxylate a été sélectionné. Pour déterminer un bon standard interne, il faut une structure apparentée aux molécules d'intérêt, ce qui est le cas, car l'éthyle indole-2-carboxylate est également un composé indolique, mais le groupement est différent. Ce groupement se trouve en position 2, et non en 3, comme dans le scatole. La fragmentation et, par conséquent, les spectres de masse diffèrent considérablement. Cela semble idéal, dans l'optique où la quantification se fait en SIM.

De plus, cette molécule n'est pas présente dans la matrice.

Un deuxième critère est que la molécule ait une structure semblable, mais une masse moléculaire différente (moins ou plus élevée) pour séparer les pics des molécules et du standard interne, et donc un temps de rétention différent. L'éthyle indole-2-carboxylate répond de prime abord à ces critères.

D'autres standards internes peuvent également être adoptés, comme le 2-méthylindole (Sharma, 2011 ; Bekaert *et al.*, 2012 ; Verplanken, Wauters, Durme, *et al.*, 2016 ; Verplanken, Wauters, Vercruyse, *et al.*, 2016). Le choix initial était porté sur ce standard interne. Cependant, après différents tests, le pic de cette molécule n'est pas résolu par rapport au pic du scatole, et pose par conséquent problème pour la quantification des deux molécules *in fine*.

La première étape est donc de vérifier la méthode d'analyse en GC-MS afin de retrouver les trois molécules d'intérêt, c.-à-d. l'indole, le scatole et l'androsténone. Un test avec les molécules en standard pur dans le solvant, du méthanol, a ainsi été effectué (Figure 14).

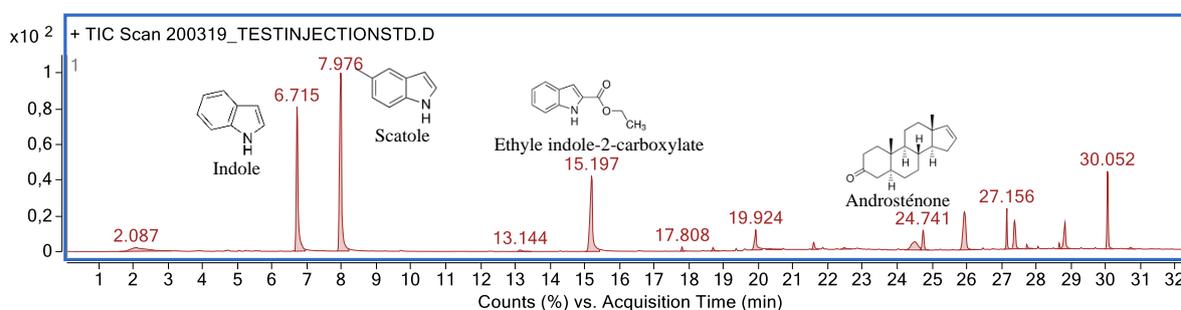


Figure 14 : chromatogramme en GC-MS de l'injection de standard (indole, scatole et androsténone) et d'un standard interne (éthyle indole-2-carboxylate) dans le solvant, méthanol

Le chromatogramme démontre des pics clairs et bien résolus. Ensuite, des tests d'injection de ces standards sur cartouches contenant les COVs émis lors de la chauffe ont pu être réalisés (Figure 15).

La matrice de gras de porc étant une matrice complexe, il n'est dès lors plus possible d'obtenir une bonne résolution des pics d'intérêt, comme constaté à la Figure 14.

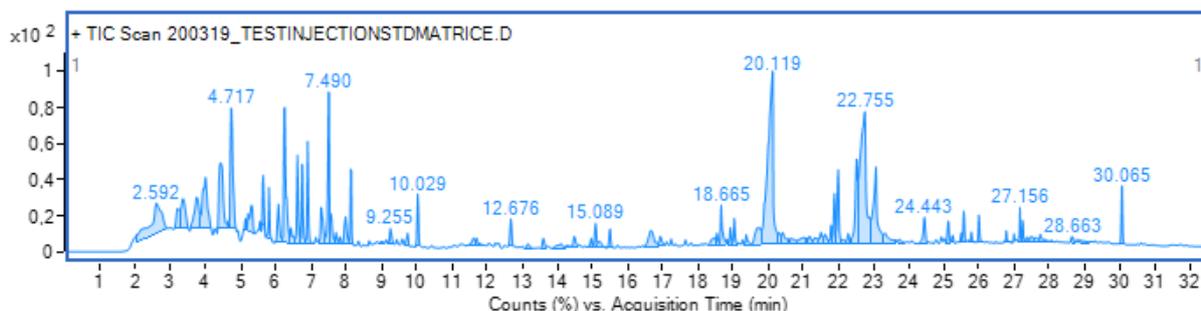
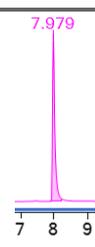


Figure 15 : chromatogramme de l'injection de standard (indole, scatole et androsténone) et d'un standard interne (éthyle indole-2-carboxylate) dans la matrice grasse

Pour une quantification optimale, ainsi que pour descendre à des seuils plus bas de détection (que le mode SCAN), les pics et les concentrations des molécules seront analysés via leur SIM (Single Ion Monitoring). Pour chaque molécule, un ion est utilisé pour quantifier la molécule, et deux autres ions servent à s'assurer que l'identification est correcte (ions qualificatifs) (Tableau 13).

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des ions quantitatifs et qualificatifs de l'indole, scatole, éthyle indole-2-carboxylate et androsténone

	Indole	Scatole	Ethyle indole-2-carboxylate	Androsténone
<b>Ions quantitatifs</b>	 Ion 117	 Ion 130	 Ion 143	 Ion 272
<b>Ions qualificatifs</b>	Ion 63 et 90	Ion 77 et 103	Ion 115 et 189	Ion 239 et 257

Cependant, malgré une bonne résolution des pics entre les molécules (voir Tableau 13), un problème de reproductibilité a été constaté lors de la réponse du standard interne. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à l'origine de cette difficulté. La première partie, la partie de préparation de l'échantillon peut être testée. La seconde partie est l'analyse en GC-MS. Elle est d'abord testée. Le problème peut survenir dans chaque étape de l'analyse par l'appareil. Effectivement, la difficulté rencontrée peut être d'ordre mécanique ou provenir des propriétés de la molécule. Afin de résoudre ce problème, différents tests ont été effectués. Premièrement, des injections liquides ont été effectuées directement sur la colonne. La réponse de l'appareil dans ce cas était très répétable. En conséquence, le problème survient lors d'une étape antérieure dans l'appareil de GC-MS. Une anomalie a été détectée dans le module « cooled injections

system » (CIS) et laisserait penser à un problème de volatilité du standard lors de la chauffe du système.

En effet, la pression de vapeur de l'éthyle indole-2-carboxylate est extrêmement faible ( $1,11 \cdot 10^{-5}$  KPa) tandis que, pour comparaison, l'indole possède une pression de vapeur de 0,0016 KPa et est déjà considéré comme semi-volatil. Il est donc possible que la molécule ne soit pas volatilisée et capturée par la cartouche Tenax, qui retient les composés (semi-)volatils. La méthode d'injection utilisée est de type « solvant vent », c'est-à-dire que le solvant d'injection s'est évaporé parce que l'entrée est en mode Split. Une solution serait donc de garder le solvant d'injection contenant le standard interne, en passant en mode Splitless, ce qui empêche l'évaporation du solvant, puisque tout l'échantillon est envoyé sur la colonne.

Vu les problèmes liés au standard interne, une calibration externe est utilisée dans un premier temps. Différentes adaptations devront être testées ensuite pour envisager l'utilisation du SI.

Tableau 14 : Données de calibration de la méthode développée en GC-MS

Composé cible	Équation	R <sup>2</sup>	Gamme de linéarité (ng/ml)
Indole	Y=415,1842x+39001,8262	0,99	9,7 – 12500
Scatole	Y=459,2758X+40123,4878	0,99	9,7 – 12500
Androsténone	Y=12,6812x+231,3030	0,96	75 – 5000

Une bonne linéarité avec des coefficients de détermination (R<sup>2</sup>) supérieurs à 0,96, par régression linéaire, a été obtenue pour les plages de concentration concernée (Tableau 14). Des tests ont été effectués pour voir si la gamme de linéarité couvre les échantillons.

En bref, les paramètres du GC-MS permettent de retrouver et de quantifier nos trois molécules d'intérêt, à savoir l'indole, le scatole et l'androsténone en SIM. Elle peut tout à fait être utilisée pour l'analyse des COVs du gras chauffé grâce à une calibration externe.

#### 5.2.2.2 Mise au point de la technique de prélèvement

À partir du moment où l'analyse par la GC-MS est au point, le prélèvement des COVs émis par la chauffe des échantillons doit être performant, testé et optimisé.

Le but du dispositif est que lorsque le gras est chauffé, les molécules émises (dont l'indole, le scatole et l'androsténone) soient piégées sur une cartouche d'absorption. Le dispositif en cours de développement doit correspondre et, *in fine*, amener à l'élaboration dudit capteur. Le dispositif doit donc mimer en conditions de laboratoire ce que le capteur devra également récolter en abattoir. Les trois molécules étant semi-volatiles, il est important de chauffer à très haute température et très rapidement, car le temps d'échantillonnage en abattoir est très limité, vu la vitesse d'avancement de la chaîne d'abattage.

Le premier objectif concret est de déterminer le point de percée, c'est-à-dire le volume à ne pas dépasser pour obtenir une concentration maximale sur la cartouche de piégeage, sans que le volume soit trop important et que la concentration diminue suite à une perte de fixation des molécules due à une surcharge sur la cartouche.

Tableau 15 : Différents paramètres des cinq tests effectués afin de déterminer le point de percée

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5
<b>Dispositif :</b>	Éléphant	Cartouches directement au-dessus du gras	Éléphant	Éléphant	Éléphant
<b>Température et temps de chauffe</b>	440°C, 10 sec		440°C, 30 sec	440°C, 30 sec	440°C, 30 sec
<b>Temps d'« équilibre »</b>	0 min		10 min	0 min	0 min
<b>Débit :</b>	200 ml/min		100 ml/min	100 ml/min	100 ml/min
<b>Volume total d'air</b>	60 à 200 ml		750 à 3000 ml	750 à 3000 ml	1500 à 4500 ml

Conditions

#### 1. Test 1 : avec éléphant<sup>17</sup>

Afin de pouvoir piéger les molécules volatiles émises lors de la chauffe d'un morceau de gras, un premier dispositif expérimental a été mis en place. Un morceau de gras de  $\pm 2g$  est placé dans un dispositif relativement hermétique. Dans un premier temps, afin de répondre au mieux aux contraintes futures en abattoir, les conditions ont été fixées comme suit :

- Une chauffe via un fer à souder à 440°C, ce qui correspond à dix degrés en dessous de la température maximale de l'appareil.
- 10 secondes de chauffe sont le temps maximal disponible dans la chaîne d'abattage pour l'analyse via le capteur
- Aucun temps d'équilibrage n'a été observé, pour suivre au mieux les futures conditions du capteur en abattoir.
- Un débit de 200 mL/min a initialement été choisi pour essayer de pomper au plus vite la fumée émise avec des volumes pompés de 60 à 200 mL.

<sup>17</sup> Voir matériel et méthode, dispositif point 4.3.2, Figure 10.

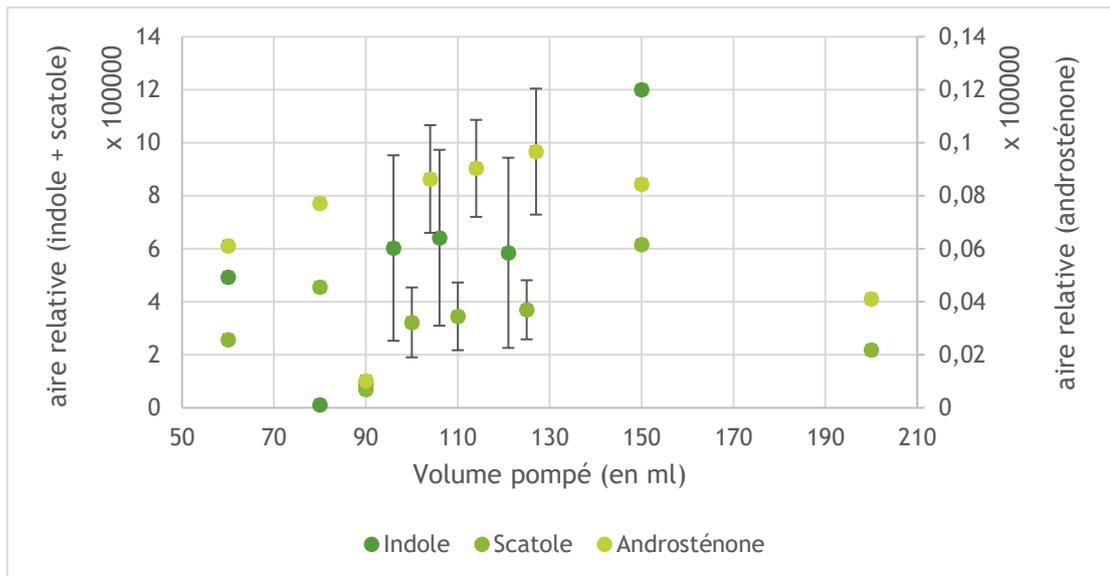


Figure 16 : Graphique de l'aire relative des pics obtenus d'indole, scatole et androsténone par GC-MS par rapport au volume d'air pompé dans le dispositif dit de l'éléphant

Après avoir réalisé une gamme de volumes différents ainsi que des répétitions pour certains de ces volumes, aucun volume optimal ne semble se dégager pour obtenir une concentration suffisante. De plus, la reproductibilité est très mauvaise avec des écarts-types relatifs de 38%, 91% et 78% pour l'indole, le scatole et l'androsténone respectivement. Ce problème est constaté pour tous les volumes pompés. Cela s'explique en partie par des concentrations beaucoup trop faibles en dessous de la gamme de linéarité, et donc de la LOQ.

Une hypothèse pour ces mauvais résultats serait un volume de pompage trop petit ainsi qu'une perte des molécules sur les parois en verre de l'éléphant (condensation).

## 2. Test 2 : sans éléphant

Vu les difficultés identifiées lors du premier test, une solution est donc de prélever la fumée contenant les COVs directement au-dessus de l'échantillon grâce à une cartouche pendant la chauffe et de tester pour voir si le problème provient du dispositif enfermant l'échantillon. Cette technique a déjà été éprouvée pour prélever les COVs lors de la chauffe d'un morceau de gras (Verplanken, Wauters, Durme, *et al.*, 2016).

Pour comprendre si le problème provient du dispositif en lui-même, aucun paramètre (temps, température de chauffe) n'a été modifié. Un volume constant de 60 ml a été déterminé afin de vérifier la répétabilité de cette technique sur quatre échantillons.

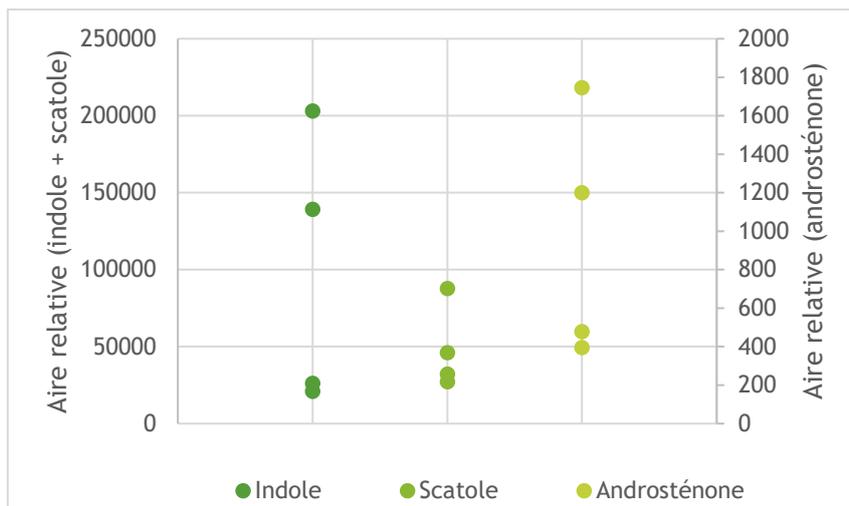


Figure 17 : Aires relatives des pics d'indole, scatole et androsténone obtenus par GC-MS par le test 2 ; sans éléphant

Les quatre différents essais représentés dans la Figure 17 montrent une non-reproductibilité de la méthode de piégeage des COVs sur une cartouche, en la plaçant directement au-dessus de l'échantillon lors de la chauffe d'un morceau de gras. De plus, les aires observées sont bien inférieures aux aires obtenues précédemment.

En conclusion, ce test n'est pas concluant en termes de reproductivité et de concentration plus importante en molécules d'intérêt.

L'hypothèse la plus probable est que les COVs n'étaient pas canalisés par l'éléphant parce que la fumée se disperse trop largement malgré l'aspiration par la cartouche. De plus, ce dispositif implique un volume pompé moins précis, et par conséquent, non contrôlé.

Le dispositif hermétique avec éléphant entre ces deux tests paraissait le plus concluant. Il a donc été décidé d'investiguer et de modifier différents paramètres afin de l'optimiser.

### 3. Test 3 : avec éléphant avec temps d'équilibrage

Lors d'une analyse en SHS-GC-MS, un temps d'équilibrage est observé. Effectivement, il est nécessaire de laisser un temps d'équilibre des COVs entre l'espace de tête (la phase gazeuse) et l'échantillon (phase solide) afin d'obtenir une répartition des molécules entre les deux phases (Vercruyssen, 2014).

Afin d'imiter ce processus, un nouveau paramètre a été instauré, un temps d'attente après chauffe du gras de dix minutes.

D'autres paramètres ont également été modifiés afin d'optimiser la technique et de répondre aux problématiques rencontrées initialement : pas assez de molécules générées, d'où un problème de reproductibilité au final.

- La température de chauffe de 440°C reste identique, mais le temps passe de 10 à 30 secondes, afin de générer plus de COVs.
- Le débit de pompage a également été changé à 100 mL/ minutes afin de réaliser un prélèvement plus lent et doux de manière à ne pas générer d'hypothétiques voies préférentielles ou de turbulences.

- Enfin, un volume final pompé beaucoup plus important. Il a été décidé de prélever de deux à neuf fois le volume initial de l'éléphant, c'est-à-dire de 750 à 3 000 mL, afin d'extraire un maximum de COVs. En effet, les tests effectués en DHS pompent plusieurs fois le volume d'air du récipient de 4,5 jusqu'à 12 fois le volume du vial initial ; Sørensen *et al.*, (2014) pompe un volume de 250 L sur un vial de 20 mL, ou encore Fischer *et al.*, (2014) pompe un volume 4, 5 fois plus grand (90 L sur un vial de 20 mL). Cette littérature a donc servi d'inspiration pour les paramètres retenus.

Ces paramètres s'éloignent un peu des contraintes en abattoir, mais il est préférable de s'assurer initialement que la technique est performante et récolter des mesures précises avant de trouver les paramètres utiles au développement du capteur proprement dit.

De plus, le fait d'utiliser l'éléphant permettra d'obtenir un volume et un air pompé plus contrôlés.

Les résultats obtenus par ce nouveau test sont visibles sur la figure ci-dessous (Figure 18).

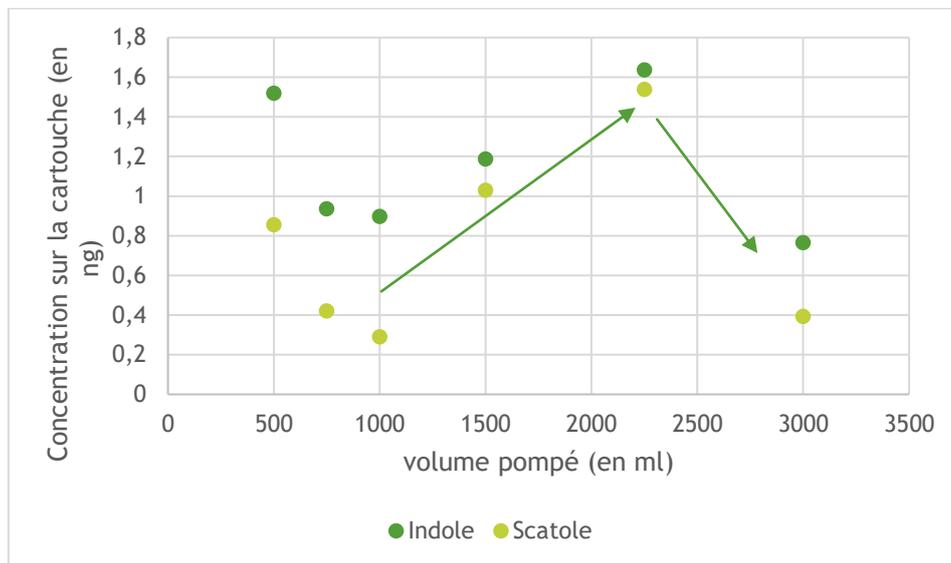


Figure 18 : concentration d'indole et de scatole obtenue par GC-MS, avec éléphant et temps d'équilibrage

Les données obtenues pour l'androsténone ne peuvent être exploitées, car la valeur du signal/bruit est trop faible. Il semble y avoir un pic avec une concentration maximale à 2 250 mL pour l'indole et la scatole.

Cependant, les valeurs sont faibles, et il s'avère impossible de quantifier l'androsténone. En conclusion de ce test, il est à constater que le temps d'équilibrage nuit à la quantité obtenue, ce phénomène étant probablement dû à l'adsorption des COVs sur les parois.

Cette technique ne permet pas de transferts suffisants de ces molécules présentes en très petites quantités dans l'échantillon (Fischer, Haas, et al., 2014)

De plus, la tendance n'est pas marquée. C'est pour cette raison qu'un test sans temps d'équilibrage est effectué.

#### 4. Test 4 : éléphant sans temps d'équilibrage et volume pompé plus important

Le temps d'équilibrage semble diminuer la concentration des COVs sur la cartouche de piégeage principale. Un test réalisé avec les mêmes conditions (440°C, 10 secondes de chauffe, débit de 100 mL/min) avec pompage de l'air directement après chauffe est effectué (Figure 19).

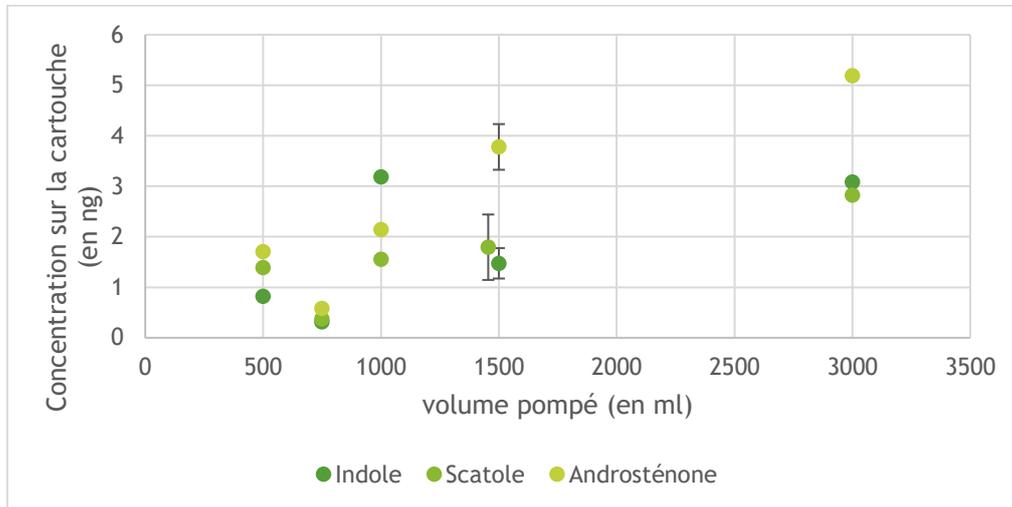


Figure 19 : Concentration en indole, scatole et androsténone par GC-MS en fonction du volume pompé sans temps d'équilibrage

Il est à remarquer qu'une tendance croissante se dessine jusqu'au dernier volume pompé de 3 000 mL, tant pour l'indole, le scatole que l'androsténone. Les points à 750 mL semblent hors de cette tendance, mais l'échantillonnage est peut-être à remettre en cause pour ce volume.

La reproductibilité n'a été testée que sur le volume de 1 500 mL. Des valeurs d'écart-types relatifs de 20% pour l'indole, 36% pour le scatole et 12% pour l'androsténone sont obtenues. Les valeurs pour l'indole et l'androsténone sont acceptables, mais trop élevées pour le scatole (Brown, 1998). Ces résultats ne sont pas encore parfaits, et surtout, ils sont à nuancer, car ils ne concernent que deux répétitions sur un seul volume pompé. Cependant, une nette amélioration est observée par rapport aux tests précédents (test 1 à 3).

#### 5. Test 5 : éléphant avec volume pompé de 5 à 14 fois le volume de l'enceinte

Lors du test 4, la reproductibilité s'est avérée meilleure, mais une tendance croissante de la concentration en fonction du volume pompé a été constatée. Afin de trouver le point de percée, il faut trouver la concentration la plus élevée possible.

Tous les paramètres sont restés constants, excepté le volume pompé qui est passé de 1 500 à 4 500 mL.

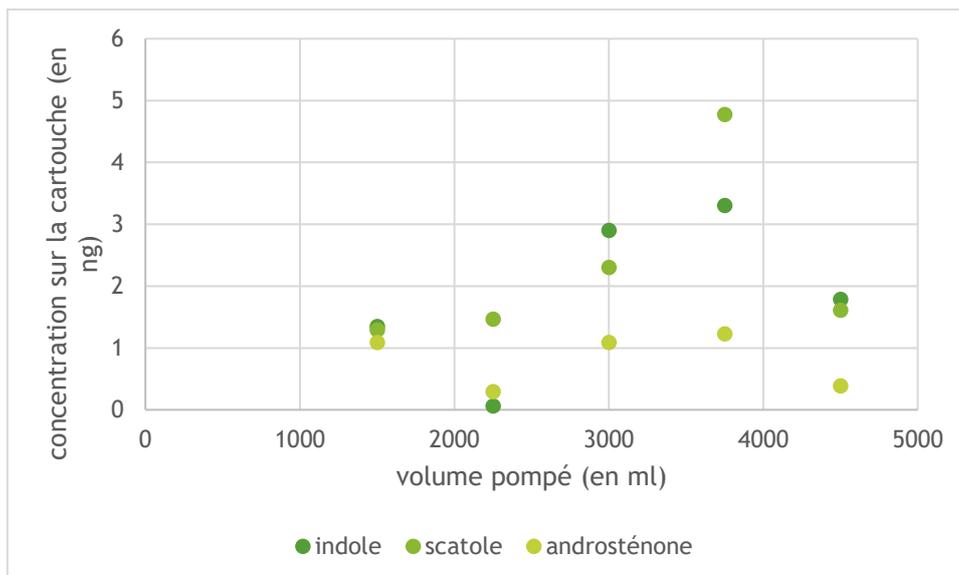


Figure 20 : concentration en indole, scatole et androsténone par rapport au volume pompé obtenu par GC-MS

La tendance croissante de l'augmentation de la concentration par rapport au volume se confirme. Le pic est atteint à 3 750 mL, tant pour l'indole, le scatole que l'androsténone. Le point de percée est donc défini à cette quantité d'air pompé (dans ces conditions et avec ce dispositif de l'éléphant). Cependant, des répétitions doivent encore être effectuées pour confirmer et valider ce volume de pompage.

En conclusion de tous ces tests, il est désormais possible de tester et déterminer la concentration en indole, scatole et androsténone dans différents échantillons avec ce dispositif et les mêmes paramètres.

Tableau 16 : Paramètres finaux optimisés pour l'échantillonnage des COVs pour l'analyse en GC-MS

dispositif	température et temps de chauffe	temps de d'« équilibrage »	débit	volume total d'air
<b>Éléphant</b>	440°C, 30 sec	0 min	100 mL/min	3750 mL

Une autre voie d'optimisation peut être de s'orienter vers un choix différent de cartouche de piégeage. Le choix initial s'est porté sur une cartouche Tenax, car elle offre un bon compromis pour la capture des composés volatils et semi-volatils. Un des objectifs consiste à établir la liste complète des COVs émis lors de la chauffe d'un morceau de gras (trouie ou verrat odorant et non odorant). Cette dernière semble donc répondre à l'objectif d'obtenir un large éventail de COVs. Cependant, les carbopacks C et F, par exemple, pourraient être testés à l'avenir. En effet, ceux-ci étant constitués de charbon graphique noir hydrophobe, ils sont plus sensibles aux semi-volatils, tels que les molécules ciblées ici.

### 5.2.3 Étude du profil aromatique complet du gras

Grâce à l'établissement, au point 0, du point de percée fixé en fonction de l'indole, scatole et androsténone, il est possible de tester des échantillons différents dans le but d'établir la liste complète des COVs émis lors de ce test de chauffe.

Deux buts sont ici poursuivis. Le premier est d'établir si d'autres molécules sont caractéristiques de l'odeur de verrat et si elles peuvent influencer la réponse du futur capteur. Le second objectif est de mieux connaître la matrice de truie et de verrat. Pour ce faire, premièrement, la liste des COVs émis est établie pour différentes catégories d'échantillons : pour du gras de truie, de porc non odorant et du gras de porc odorant avec des concentrations différentes en indole, scatole et androsténone, préalablement déterminées par HPLC-FLD (Tableau 17).

Tableau 17 : Concentration en indole, scatole et androsténone des échantillons odorants testés

<i>échantillons</i>	<i>concentration en indole (ng/g)</i>	<i>concentration en scatole (ng/g)</i>	<i>concentration en androsténone (ng/g)</i>
<i>odorant «niveau bas »<sup>18</sup></i>	78,92	112,79	414,99
<i>odorant « niveau moyen »</i>	134,56	167,93	792,91
<i>odorant « niveau haut »</i>	348,66	591,10	1273,46

<sup>18</sup> Les différents niveau sont ceux déterminés par Kock *et al.*, (2001).

Tableau 18 : Liste des COVs présents dans trois échantillons de truie, de verrat non odorant et de verrat odorant. (Nom de la molécule, son numéro CAS, l'indice de rétention calculé et de la littérature ainsi que le pourcentage moyen de l'aire)

Nom	CAS	RI calculé	RI littérature	% moyen Aire				
				Truie	Non odorant	Odorant « niveau bas »	Odorant « niveau moyen »	Odorant « niveau haut »
Alcool/phénols								
4-éthylcyclohexanol	4534-74-1	1008,94	1003,00	/	/	/	/	0,14
3,5,5-trimethyl-1-hexanol	3452-97-9	1067,36	1049,00	0,21	/	/	/	/
1-octanol	111-87-5	1082,49	1072,00	1,38	1,76	1,13	2,37	0,78
2-nonanol	143-08-8	1177,09	1186,00	0,65	0,44	/	0,20	0,38
1-décanol	112-30-1	1276,50	1280,00	2,41	0,38	0,18	0,33	0,30
1-undécanol	112-42-5	1375,29	1379,00	2,20	0,46	0,33	0,52	0,59
1-dodécanol	112-53-8	1473,49	1478,00	0,28	0,41	0,51	0,51	0,44
1-tétradécanol	67905-32-2	1674,17	1674,00	0,47	/	/	/	/
1-hexadécanol	36653-82-4	1884,75	1877,00	/	/	2,95	0,11	/
1-octadécanol	112-92-5	2085,72	2084,00	/	/	1,76	0,14	/
3β-cholest-5-en-3-ol	57-88-5	/	/	0,69	0,39	0,45	0,61	0,38
Aldéhydes								
2,4-pentadiénal	66-25-1	1029,92	NA	/	/	0,41	0,73	1,99
pentanal	110-62-3	703,83	703,00	0,14	/	/	/	/
Hexanal	66-25-1	790,01	799,00	0,41	/	/	/	/
(E)-2-hepténal	18829-55-5	853,60	925	0,62	/	/	/	/
n-heptanal	111-71-7	876,99	900,00	0,93	1,95	/	/	/
Octanal	124-13-0	1022,13	1005,00	1,58	1,00	0,28	2,05	4,81
2,4-heptadiénal	4313-03-5	1023,73	1022,00	0,47	/	/	/	/

(Z)- 2-octenal	20664-46-4	1050,52	1049,00	0,53	/	0,13	/	/
(E)- 2-octenal	2548-87-0	1069,88	1065,00	0,52	1,91	1,26	2,21	0,83
Nonanal	124-19-6	1094,85	1098,00	2,12	2,01	/	1,91	5,34
(E)- 2-nonenal	2463-53-8	1151,46	1116,00	2,68	1,69	1,20	4,16	1,01
décanal	112-31-2	1207,71	1209,00	1,53	3,10	1,07	2,28	2,86
(E,E)- 2,4-nonadiénal	5910-87-2	1217,16	1218,00	0,96	/	/	/	0,34
2-décenal	2497-25-8	1256,82	1276,00	1,44	2,78	2,25	2,27	2,85
undécanal	112-44-7	1307,07	1307,00	1,06	2,61	/	1,57	2,06
2,4-décadiénal	2363-88-4	1318,37	1311,00	1,11	2,61	0,78	1,67	2,99
2-undécenal	2463-77-6	1354,75	1356,00	3,96	6,71	2,03	5,18	7,34
dodécanal	112-54-9	1405,97	1426,00	0,79	2,31	0,68	1,43	1,73
(E)-2-dodécenal	20407-84-5	1411,33	1467,50	1,59	0,18	/	0,12	0,16
tridécanal	10486-19-8	1505,51	1510,00	0,41	1,24	0,45	0,96	0,93
tetradécanal	124-25-4	1599,76	1605,00	0,35	0,68	0,30	0,75	0,49
pentadécanal-	2765-11-9	1704,93	1725,00	0,41	0,43	/	0,46	0,31
(Z)- 9-hexadécenal	56219-04-6	1790,53	1800,00	/	0,18	/	0,30	/
hexadécanal	629-80-1	1812,73	1804,00	/	0,14	/	0,11	/
(E)- 13-octadécenal	69820-24-2	1879,76	1962,00	0,23	0,19	/	0,31	0,20
Aromatique								
benzaldehyde	100-52-7	934,16	933,00	0,10	/	/	/	/
3- methyl-1H-indole	83-34-1	1396,05	1395,00	/	/	/	/	0,24
Alcane								
undécane	1120-21-4	1103,31	1100,00	1,13	/	/	/	/
dodécane	112-40-3	1200,00	1200,00	0,57	0,96	0,34	1,07	0,77

tridécane	629-50-5	1299,89	1300,00	1,03	1,60	/	/	0,41
tétradécane	629-59-4	1391,38	1400,00	0,44	0,71	0,47	0,54	0,46
pentadécane	629-62-9	1491,49	1500,00	0,40	0,78	0,95	0,70	0,57
Hexadécane	544-76-3	1595,28	1600,00	/	0,27	0,32	0,22	0,22
Cétone								
3-éthylcyclopentanone	10264-55-8	937,47	923,00	1,61	/	/	/	/
2-décanone	693-54-9	1192,80	1201,00	0,35	0,43	0,26	/	/
2-undécanone	112-12-9	1290,30	1291,00	0,21	/	/	/	/
2-pentadécanone	2345-28-0	1690,45	1693,00	0,44	0,60	0,65	0,74	0,55
2-heptadécanone	2922-51-2	1899,38	1897,00	0,27	0,20	/	0,32	0,15
5-dodécyldihydro-2(3H)-furanone	730-46-1	2104,88	2106,00	0,46	0,28	0,44	0,37	0,24
tetrahydro-6-undecyl-2h-pyran-2-one	7370-44-7	2139,05	2154,00	0,84	0,45	0,18	0,45	0,23
(Z)-9-octadécén-4-olide	NA	2288,47	NA	0,12	/	/		/
Alcène								
1-tétradécène	1120-36-1	1397,87	1397,00	/	/	0,27	/	/
1-Pentadécène	13360-61-7	1483,90	1485,00	/	/	/	0,16	0,18
cétène	629-73-2	1554,82	1579,00	0,72	0,53	0,39	0,60	0,59
1-hexadécène	629-73-2	1591,42	1590,00	/	/	0,28	/	/
6(E),8(E)-heptadécadiène	81265-03-4	1668,87	1669,00	/	/	0,15	/	/
8-heptadécène	2579-04-6	1612,30	1673,00	0,52	0,29	0,54	0,31	0,32
squalène	7683-64-9	2824,84	2809,00	2,20	1,12	1,08	0,65	0,16
Acide carboxylique								
acide pentanoïque	109-52-4	875,07	875,00	0,18	/	/	/	/
acide hexanoïque	142-62-1	1016,03	1017,00	/	/	/	/	1,77

acide octyl ester, formique	112-32-3	1142,17	1128,00	/	/	0,60	1,04	/
acide undécanoïque	112-37-8	1479,51	1482,00	0,28	/	/	/	/
acide dodécanoïque	143-07-7	1573,48	1573,00	/	/	0,13	/	/
acide tétradécanoïque	544-63-8	1755,47	1756,00	1,04	/	/	/	/
isopropyl myristate	110-27-0	1829,81	1829,00	/	/	4,43	/	/
acide (Z)-7-hexadécenoïque	2416-19-5	1958,99	1976,00	/	/	/	/	0,14
vinyl palmitate	693-38-9	1964,48	1985,80	/	0,87	0,30	0,20	
acide n-Hexadécanoïque	57-10-3	1988,43	2010,00	10,60	3,37	4,08	3,07	2,67
acide méthyl ester (E)-9-Octadécenoïque	1937-62-8	2097,58	2100,10	0,16	/		0,37	0,19
acide Octadécanoïque	57-11-4	2182,27	2188,00	4,90	1,19	1,11	/	/
Acide 2-hydroxy-1-(hydroxyméthyl)éthyl ester hexadécanoïque	23470-00-0	2716,54	2519,00	/	0,77	/	/	/
Furane								
2-pentyl- furane	3777-69-3	1004,77	1002,00	0,28	/	/	/	/
Inconnu								
non identifié A	NA	1111,08	NA	3,50	/	/	/	/
non identifié B	NA	1297,40	NA	1,02	/	/	/	/
non identifié 2	NA	1113,65	NA	/	0,99	/	/	/
non identifié 1	NA	1130,64	NA	/	7,77	/	/	/
non identifié 3	NA	1356,15	NA	/	1,25	/	/	/
non identifié 4	NA	1776,09	NA	/	0,46	/	/	/

Premièrement, il est à remarquer que la molécule de scatole (3-methyl-1H-Indole) est présente dans l'échantillon de verrat ayant la concentration en molécules odorantes la plus forte. L'indole et l'androsténone n'ont pas été retrouvés avec cette technique d'analyse (en SCAN). Une première hypothèse serait qu'étant donné la faible volatilisation de ces molécules, une trop faible quantité ait été échantillonnée, et il est donc impossible de les détecter avec la méthode SCAN. Une seconde hypothèse serait une saturation de la cartouche en molécules plus volatiles, et donc la quantité volatilisée n'avait plus assez d'espace pour s'adsorber à la cartouche.

En comparant la liste des trois échantillons de verrat odorant, les classes chimiques ayant le plus grand pourcentage d'aire sont les aldéhydes, ensuite les acides carboxyliques. Les aldéhydes proviennent majoritairement de la dégradation oxydative des acides gras insaturés très présents dans la graisse de porc. Ils contribuent à l'arôme du gras (Rius Solé *et al.*, 2001 ; Rius, Hortós, *et al.*, 2005) et à cette mauvaise odeur de verrat (Xue *et al.*, 1996 ; Zamaratskaia *et al.*, 2009 ; Serra *et al.*, 2014). Les trois aldéhydes principaux sont l'octanal, le nonanal et le 2-undecenal. Cependant, cette famille chimique est également la plus importante dans les listes établies sur des échantillons de truie et de verrat non odorant. Ces molécules donc sont donc intrinsèques à l'odeur de la graisse de cochon en général.

La formation des aldéhydes (et leur odeur désagréable), consécutive à la dégradation oxydative des acides gras, met en lumière l'implication de ces acides gras dans le développement des odeurs chez le porc (Mörlein *et al.*, 2015). Les acides gras et leur composition influencent également la volatilisation de l'androsténone et du scatole (Rius, Hortós, *et al.*, 2005). Une relation entre faibles niveaux d'androsténone, de scatole et d'indole serait liée à un niveau d'acide gras polyinsaturés significativement plus élevé et des acides saturés gras moins présents (Mörlein *et al.*, 2014).

Les acides gras à courtes chaînes retrouvés contribuent également à la mauvaise odeur détectée dans les échantillons présentant des émanations de verrat (Rius Solé *et al.*, 2001 ; Rius, Hortós, *et al.*, 2005). Ils sont présents dans les trois types d'échantillons (truie, verrat non odorant et verrat odorant), par exemple, l'acide undécanoïque.

Les molécules d'indole, de scatole et d'androsténone ont été identifiées dans les échantillons de verrat odorant via analyse HPLC-FLD. Ne retrouvant seulement le scatole qu'en mode SCAN, les deux autres molécules doivent être présentes en très faible concentration. Une analyse en mode SIM est alors nécessaire pour les quantifier. Il est également possible d'établir une première corrélation entre la quantification des molécules par HPLC-FLD et leur quantification, lorsqu'elles sont sous forme de COVs via GC-MS (Tableau 19).

Tableau 19 : Corrélation entre les concentrations obtenues en indole, scatole et androsténone via HPLC-FLD et GC-MS

	HPLC-FLD (NG/G)			GC-MS (NG/ML)		
	Indole	Scatole	Androsténone	Indole	Scatole	Androsténone
« niveau bas »	19,25	120,03	217,51	0,21	1,01	1,06
« niveau moyen »	134,56	167,94	792,91	1,02	2,01	1,78
« niveau haut »	348,66	591,10	1273,46	1,55	8,35	1,08

Une première vision permet d'identifier une logique dans les concentrations en indole et scatole via analyse au GC-MS. Cependant, la concentration en androsténone du « niveau moyen » est plus élevée que le « niveau haut ». De plus, il n'existe pas une grande différence entre le « niveau bas » et le « niveau haut ». Seule une différence de 0,01ng/mL est observée. Or la concentration déterminée via HPLC-FLD montre une différence de 1 056 ng/g. De ce fait, aucun chiffre de corrélation ne peut encore être défini entre une concentration déterminée par HPLC-FLD et par GC-MS, et donc des COVs émis. Cependant, si le dispositif de l'éléphant est innovant, il n'est pas encore idéal. Un perfectionnement ainsi qu'une augmentation du nombre de tests, notamment avec gamme de concentrations différentes, pourraient affiner cette corrélation.

D'autres molécules impliquées dans l'odeur de verrat – les androsténols, le 4-phenyl-3-buten-2-one, le styrène, 1,4-dichlorobenzène (Babol *et al.*, 1995 ; Rius, Horto, *et al.*, 2005 ; Bekaert, 2012) – n'ont pas été retrouvées dans les échantillons de verrat odorants via cette analyse. Une étude plus poussée avec une recherche de ces molécules via le mode SIM ou par comparaison avec leurs spectres spécifiques pourrait être envisagée. Par ailleurs, ces molécules ne sont peut-être pas extraites ou analysables via la méthode décrite plus haut. La détection d'androsténone s'avérant déjà complexe, vu la faible quantité adsorbée sur la cartouche, il est donc probable de ne pas retrouver d'androsténols en cause également d'une très faible quantité. Toutefois, le P-crésol et le 4-éthylphénol, également responsables de l'odeur de verrat (Patterson, 1968 ; Bekaert, 2012) sont probablement présents, mais en très petite quantité. Il est par conséquent difficile de les authentifier avec certitude.

Malgré une liste bien établie, quelques détails sont susceptibles d'être améliorés. Effectivement, cette technique d'analyse ne prend pas en compte les seuils de détection et de perception des molécules. Des molécules ayant une faible concentration dans les échantillons peuvent représenter une grande faculté olfactive. Une analyse via GC-MS-O peut être une solution pour réellement identifier les molécules responsables de l'odeur, mais en veillant à maintenir la même technique d'échantillonnage, afin de rester proche de l'objectif de développement d'un capteur.

Une autre façon d'exploiter le profil général en COVs du gras de truie, de verrat non odorant et odorant est de voir quelles sont les principales molécules qui les composent (Figure 21, Figure 22, Figure 23).

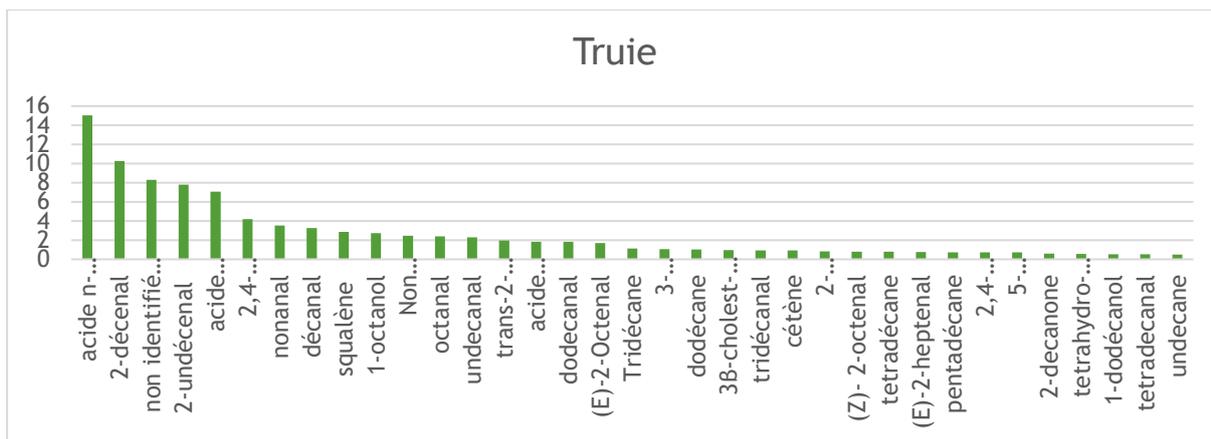


Figure 21 : Graphique de répartition de l'aire moyenne par molécule (seules les molécules avec une aire > 0,05% ont été prises en compte) dans l'analyse des échantillons de truie

Seules les molécules avec une aire supérieure à 0,5% d'aire ont été prises en compte lors de l'élaboration du graphique pour ne pas surcharger celui-ci inutilement. L'aire a été calculée sur la moyenne des aires sur les trois prélèvements réalisés.

Le profil des COVs de la truie est principalement dominé par la molécule d'acide hexadécanoïque. Les aldéhydes sont également très présents dans le profil. Le 2-décanal est l'aldéhyde le plus présent, il est caractéristique de l'odeur des viandes cuites (Rius Solé *et al.*, 2001).

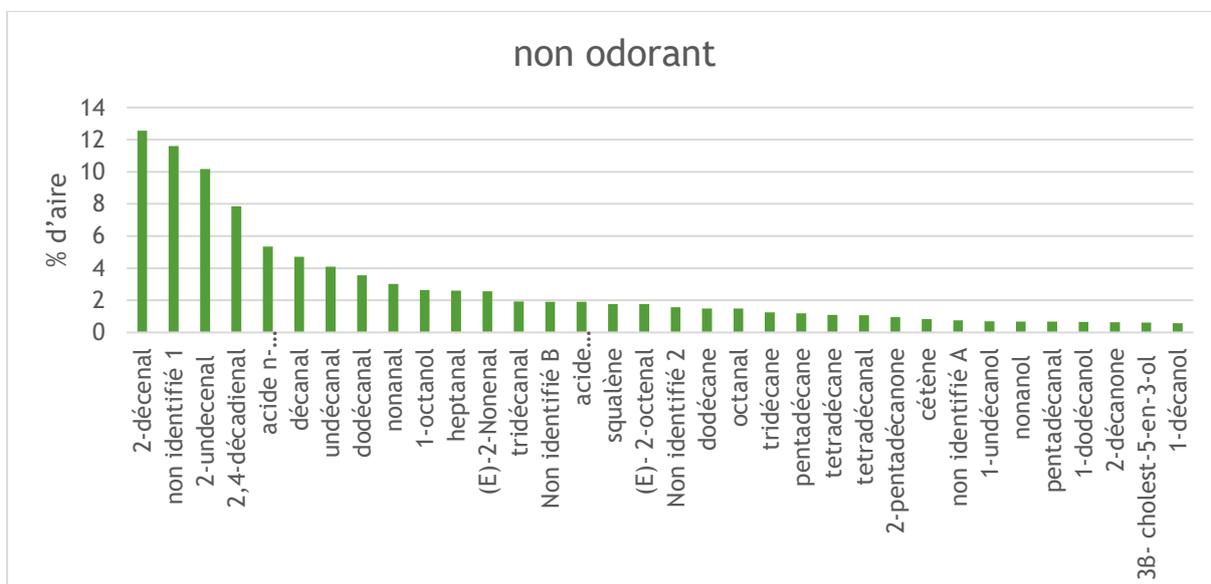


Figure 22 : Graphique de répartition de l'aire moyenne par molécule (seules les molécules avec une aire > 0,05% ont été prises en compte) dans l'analyse des échantillons de verrat non odorant

La molécule principale du profil du verrat non odorant est le 2-decanal. Il est également à remarquer que les aldéhydes sont les plus représentatifs par leur nombre et leur pourcentage. L'acide hexadécanoïque est représenté en cinquième position sur ce profil, mais il est encore

bien présent avec un pourcentage de 5,35%, il est également représentatif de l'odeur et des composés du gras.

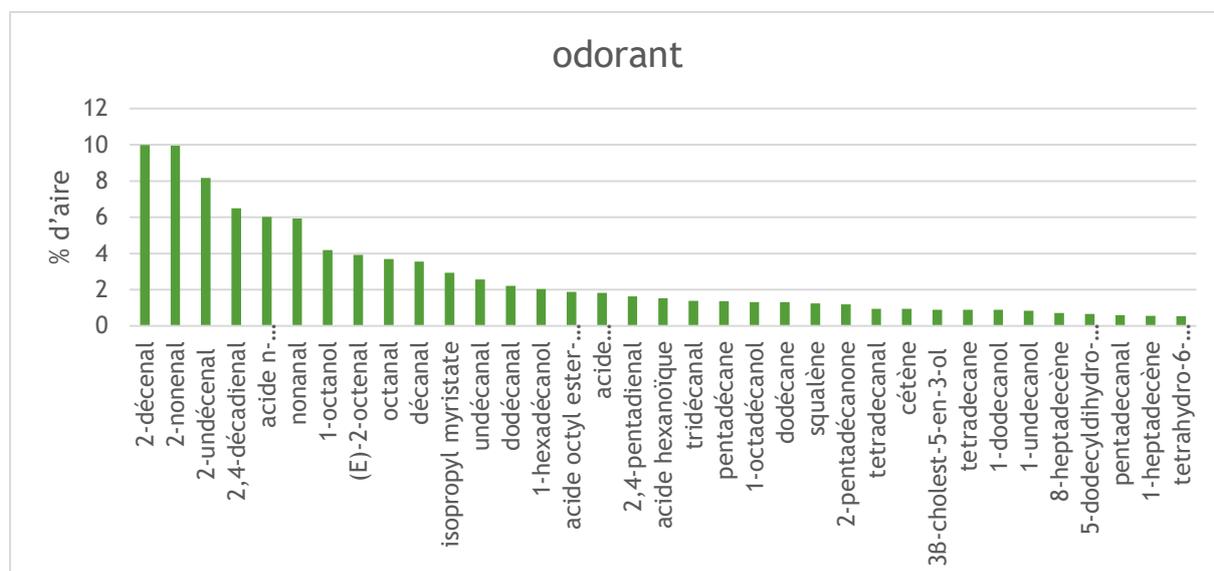


Figure 23 : Graphique de répartition de l'aire moyenne par molécule (seules les molécules avec une aire > 0,05% ont été prises en compte) dans l'analyse des échantillons de verrat odorant

La molécule principale est une fois encore le 2-décenal, identique au profil du verrat non odorant. La seconde molécule est le 2-nonanal avec un pourcentage de 9,94%. Il n'est pas présent en grande quantité sur les deux autres profils (truie et verrat non odorant). Son odeur est également caractéristique de l'odeur de gras (Arn, 2004). Il est donc logique de le retrouver dans profil de COVs du gras de verrat.

La molécule de scatole, déjà identifiée comme corrélée à l'odeur de verrat, n'est pas représentée dans la liste de ce profil, car elle correspond à moins de 0,50% de l'aire totale. Elle est exactement de 0,10%.

Il est à conclure qu'il est impossible d'identifier au premier coup d'œil de différences significatives qui expliquent l'odeur de verrat par la présence massive d'une ou plusieurs molécules spécifiques. Une analyse discriminante, ayant recours à un test statistique, pourrait peut-être permettre de mettre en lumière des différences.

L'analyse discriminante linéaire (ADL) est une analyse statistique de la classe des analyses discriminantes prédictives. Un individu sera classé dans le groupe auquel il appartient à partir de ses caractéristiques mesurées.

Dans le cadre de ce travail, l'ADL va permettre de classer et de prédire si une molécule appartient à une classe (truie, verrat non odorant ou verrat odorant) et si elle est caractéristique de cette classe. En d'autres termes, si cette molécule caractérise sa classe, il sera possible de déterminer si elle est caractéristique de l'odeur de verrat.

L'ADL va attribuer un score (coefficient et direction) à chaque molécule afin de créer deux nouvelles dimensions les LD (Linear Discriminant). Les classes (truie, non odorant et odorant) seront caractérisées par les molécules qui ont un gros coefficient, c'est-à-dire qui sont présentes à une grande concentration dans ces classes. Ensuite, les échantillons seront reclassés dans ces

classes afin de vérifier s'ils appartiennent bien au bon groupe. Ils les reclassent sur base de ces LD et du coefficient attribué à chaque molécule.

Après reclassement, il attribue deux échantillons du groupe non odorant à la classe non odorant et un à la classe odorant. C'est-à-dire que, selon le modèle développé, un échantillon non odorant ne rentre pas dans les caractéristiques attribuées à la classe non odorant, mais bien odorant. Le taux d'erreur de ce modèle est donc de 11%.

	<i>Non odorant truie</i>		
	<i>Non odorant</i>		
<i>Non odorant</i>	2	1	0
<i>Odorant</i>	0	3	0
<i>truie</i>	0	0	3

Figure 24 : Taux de reclassement des échantillons en classes suite à une ADL

Lors d'une ADL, deux nouvelles dimensions sont créées pour un nouveau modèle : la LD1 et la LD2. Elles sont caractérisées par l'importance du coefficient attribué à chaque molécule ainsi qu'une direction (négative ou positive).

Tableau 20 : Tableau des principales molécules caractérisant le LD1 et LD2

	<i>LD1</i>		<i>LD2</i>
Coefficient linéaire discriminant		Coefficient linéaire discriminant	
4,3039E-08	acide pentanoïque	5,06e-08	(E)-dodécenal
4,1326E-08	9- octadécen-4-olide	2,80e-08	éthylcyclohexanol
2,8392E-08	acide tetradécanoïque	2,76e-08	acide cis-7-hexadécenoïque
2,5247E-08	(Z)- octenal	2,34e-08	acide pentanoïque
2,4063E-08	3,5,5 – triméthyl-hexanol	2,02e-08	9-octadécen-4-olide
2,1459E-08	hexadecanal	1,61e-08	3-méthyl-1h-indole
2,0114E-08	(E)- octadécenal	1,48e-08	décانونe
1,5383E-08	hexanal	1,40e-08	nonanol
1,1543E-08	benzaldéhyde	1,36e-08	acide tetradécanoïque
9,6163E-09	trans - 2- décenal	1,20e-08	(Z)-octenal
8,8535E-09	(E) - heptenal	1,13e-08	(E,E)- nonadienal
8,146E-09	cis- 9- hexadécenal	1,10e-08	3,5,5triméthyl-hexanol
7,2035E-09	acide dodécanoïque	1,06e-08	hexadécane
7,067E-09	(E,E)- nonadienal	1,01e-08	acide dodécanoïque
7,0046E-09	acide 2-hydroxy-1-hydroxyméthyl, éthyl ester - hexadécanoïque	9,17e-09	heptadécadiène
...	...	...	...
-4,72E-09	tetradécane	-2,72e-09	acide undécanoïque
-5,01E-09	décانونe	-3,14e-09	heptadécانونe

-6,01E-09	dodécanol	-3,44e-09	décanol
-6,21E-09	3 $\beta$ -cholest-5-en-3-ol	-3,59e-09	heptadécène
-6,80E-09	3-méthyl-1H-indole	-4,05e-09	nonanol
-6,81E-09	dodécen-1-al	-4,94e-09	(Z)- octadécenal
-1,16E-08	acide cis-7 hexadécenoïque	-6,03e-09	undécanone
-1,18E-08	éthylcyclohexanol	-6,29e-09	1,3,3 -triméthyl cyclopentane
-1,25E-08	nonanol	-6,71e-09	cis-9-hexadécenal
-1,33E-08	undécanol	-7,16e-09	acide (Z)- méthyl ester octadécenoïque
-1,40E-08	pentanal	-7,82e-09	hexadécanal
-1,96E-08	acide palmitique	-9,50e-09	tétradécène
-2,04E-08	non identifié a	-1,15e-08	pentanal
-2,66E-08	hexadécane	-1,64e-08	pentadécène
-1,09E-07	(E)- dodécenal	-1,72e-08	dodécen-1-al

Grâce à ces deux nouvelles composantes, caractérisées par les coefficients des molécules, il est possible de représenter graphiquement l'appartenance des échantillons selon ces deux nouveaux vecteurs.

Les ronds rouges représentent le verrat non odorant, les ronds bleus la truie, et les ronds verts le verrat odorant.

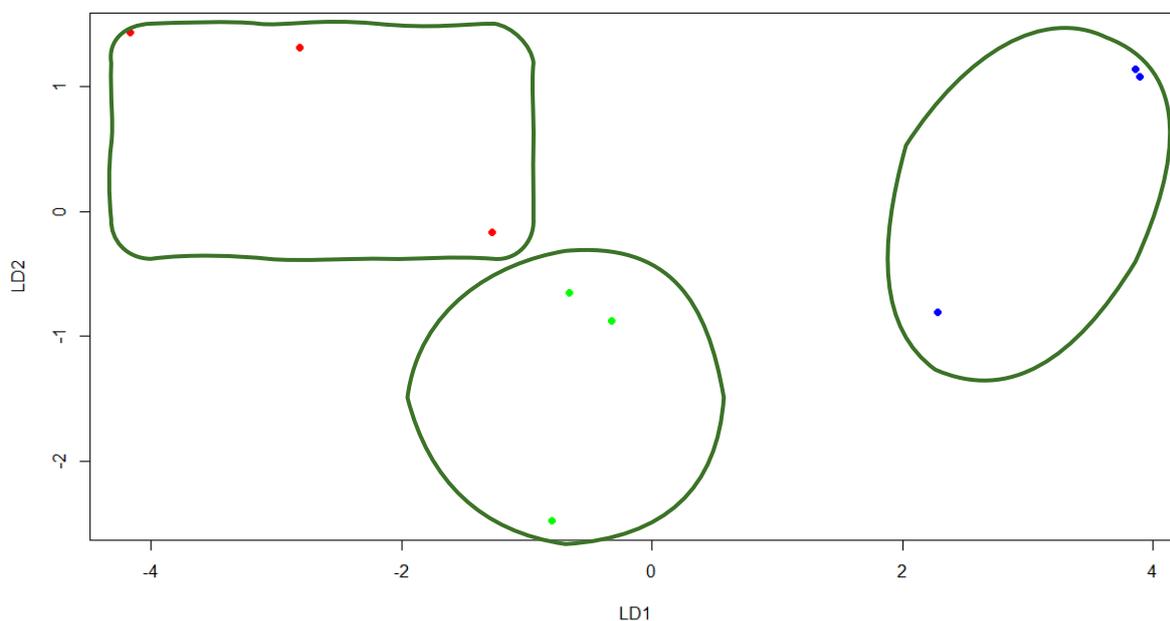


Figure 25 : Graphique représentant la LD1 et LD2 découlant de l'ADL caractérisant les profils en COVs de truie (en bleu), verrat non odorant (en rouge) et odorant (en vert).

Le profil de truie est caractérisé par un LD1 positif. Les molécules caractérisant le côté positif de LD1 telles que l'acide pentanoïque, le 9-octadécen-4-olide, l'acide tétradécanoïque...

(voir Tableau 20) caractérisent donc également la classe des truies, et par conséquent, l'odeur émise par la chauffe d'un morceau de gras de truie.

De plus, elle est également caractérisée par un LD2 principalement positif. Les molécules déterminant ce vecteur, tels que le (E)-dodécénal, l'éthylcyclohexanol, l'acide cis-7-hexadécénoïque ou encore l'acide pentanoïque (voir Tableau 20), caractérisent également l'odeur de gras de truie chauffé.

Un mélange de ces deux vecteurs positifs, et donc le mélange de ces molécules caractérise donc l'odeur de truie.

L'odeur de verrat non odorant se caractérise quant à elle par un LD1 négatif, mais un LD2 positif. Un mélange des molécules caractérisant ces deux côtés de vecteur serait donc caractéristique de l'odeur de verrat non odorant. Cependant, comme cité ci-dessus, un échantillon serait plutôt caractérisé par des similitudes avec les molécules caractéristiques de l'odeur de verrat odorant. Un plus grand nombre d'échantillons serait donc nécessaire pour confirmer la position de la classe verrat non odorant.

L'odeur de verrat odorant est quant à elle caractérisée par un LD1 et LD2 négatif. L'odeur est donc déterminée par un mélange de molécules caractérisant ces deux vecteurs comme le tétradécane, l'acide undécanoïque, le décanone, l'heptadécane, le dodécanol, le décanol, le 3 $\beta$ -cholest-5-en-3-ol, l'heptadécène, le 3-méthyl-1H-indole ou encore le 2-nonanol (voir Tableau 20). Ce mélange de molécules trouvé par l'ADL n'était pas les molécules prédominantes dans le profil en COVs du gras de verrat odorant chauffé. Il est donc bien mis en évidence que ces molécules caractérisent l'odeur de verrat odorant, et non celui du verrat non odorant ou de la truie. De plus, la molécule de 3-méthylindole s'y trouve en bonne place, déjà reconnue par la littérature pour son influence dans l'odeur de verrat.

## 6. Discussion générale

Le titre de ce travail est l'étude des composés organiques volatils responsables de l'odeur de verrat en vue du développement d'un capteur permettant la détection de cette odeur en abattoir. Afin de pouvoir répondre à ce titre et lui donner toute sa substance, quatre grands objectifs ont été définis.

Le premier objectif était de pouvoir quantifier rigoureusement le contenu du gras en indole, scatole et androsténone reconnu dans la littérature comme responsable de l'odeur de verrat. Pour ce faire, la technique par HPLC-FLD a été retenue, et deux objectifs sous-jacents en ont découlé.

Le premier consistait en la validation de cette méthode. Les critères de spécificité et de linéarité ont été validés avec des coefficients de régression de respectivement 0,98, 0,96 et 0,96 pour l'indole, le scatole et l'androsténone. Un effet de matrice a également été mis en évidence provoquant un rendement d'extraction différent de 100%. Cependant, un facteur de correction de 1,13 pour l'indole, 1,10 pour le scatole et 1,38 pour l'androsténone sera appliqué aux échantillons afin de contrer un rendement d'extraction différent de 100%, et intrinsèquement, prendre en compte l'effet de matrice. Les LOQ déterminés sont bien au-dessous des seuils limites de détection des consommateurs. La répétabilité et la reproductibilité étaient également acceptables et dans les normes européennes (The Commission of the European Communities, 2002). Grâce à tous ces paramètres positifs, la validation de la méthode peut être considérée comme valable et acquise.

De ce fait, le deuxième sous-objectif a pu être rempli, à savoir, la quantification des trois molécules citées ci-dessus dans différents échantillons de gras jugés odorants par sniffing d'un expert de l'abattoir. Trois catégories d'échantillons s'en sont dégagées. Le premier avec une très faible concentration de scatole et d'androsténone en dessous des seuils de détection du consommateur. Une probable synergie entre les molécules odorantes expliquerait cette catégorie. Une seconde catégorie présente des concentrations en composés indoliques importantes, surtout en scatole. Il est donc à noter que l'odeur de verrat peut être caractérisée en grande partie par le scatole. La voie indolique semble être prédominante chez les verrats de cette catégorie (avec des races, des conditions d'élevage et une maturité sexuelle propices). Enfin, la troisième catégorie d'échantillons comporte des échantillons avec une concentration élevée de scatole et d'androsténone. Il est donc mis en évidence qu'une concentration en androsténone élevée donnera un taux de scatole élevé chez les verrats étiquetés positifs.

Le deuxième grand objectif de cette étude était d'établir une liste des COVs présents en abattoir afin de déterminer le bruit de fond olfactif, en vue de l'utilisation future du capteur. Cette liste a permis de se rendre compte de la teneur importante en 4-(4-phenylphenoxy) phénol, probablement exogène aux porcs, et deux autres molécules : l'acide hexadécanoïque et le squalène présents aussi chez le porc. Cette expérimentation était nécessaire, car elle est caractéristique de ce milieu encore non étudié.

Le troisième grand objectif était la mise au point d'une méthode pour étudier les COVs émis lors de la chauffe du morceau de gras. Effectivement, le futur capteur reposera sur une réponse des COVs odorants émis lors de la chauffe d'un morceau de graisse du cou des porcs. Pour ce faire, deux étapes ont été nécessaires. D'abord, la mise au point et la validation de la méthode d'analyse des COVs en TDU-GC-MS. Des coefficients de corrélation de 0,99, 0,99 et 0,96 ont été obtenus pour les droites d'étalonnage. Ensuite, la mise au point de la technique de

prélèvement de ces COVs a été réalisée. Un dispositif de laboratoire essayant de mimer le futur capteur a été mis en place pour pouvoir étudier les COVs émis lors de la chauffe d'un morceau de gras. Un tel dispositif expérimental a nécessité quelques adaptations, et plusieurs modalités ont été testées afin d'optimiser ledit dispositif : différents temps de chauffe, d'attente et de pompage. Les conditions d'échantillonnage retenues sont les suivantes : une chauffe à 440°C pendant 30 secondes dans une enceinte hermétique et un pompage de 3 750 mL avec un débit de 100 mL/min.

Après que tous ces objectifs ont été accomplis et validés, le quatrième a pu être réalisé, à savoir l'établissement de liste des COVs émis par la chauffe d'un morceau de gras de truie, de verrat non odorant et de verrat odorant. Le but était également de mieux connaître la matrice de gras de porc de ce travail. Après établissement de ces listes, il a pu être mis en évidence la présence du groupe le plus important des molécules du groupe chimique aldéhyde. Celles-ci proviennent de la dégradation des acides gras constituant naturellement la majeure partie du gras de porc. Il est également à remarquer que les molécules identifiées comme étant réellement responsables de l'odeur de verrat étaient très peu présentes, car vraisemblablement présentes en trop faible concentration pour une analyse réalisée en mode SCAN. L'analyse discriminante linéaire a permis de classer les différents types de gras à l'aide d'un nouveau modèle créé et caractérisé par deux nouveaux vecteurs LD1 et LD2, eux-mêmes caractérisés par les molécules. Il ressort de ce modèle qu'une grande distinction entre les différents groupes serait expliquée par une variation en concentration en un mélange de molécules. Ces mélanges sont bien différents pour chaque groupe. Le profil en COVs du gras caractérisé comme odorant serait principalement déterminé par le tétradécane, l'acide undécanoïque, la décanone, l'heptadécane, le dodécanol, le décanol, le 3 $\beta$  cCholest-5-en-3-ol, l'heptadécène, le 3-méthyl-1H-indole ou encore le 2-nonanol.

## 7. Conclusion

En conclusion, ce travail a permis une avancée dans l'établissement des connaissances dans l'étude de l'odeur de verrat. Ce travail fait partie d'une étude qui a pour but la fabrication d'un capteur permettant de détecter cette odeur de verrat rapidement et sans facteur humain en abattoir.

En répondant aux différents objectifs, une validation d'une méthode de quantification simultanée par HPLC-FLD de l'indole, du scatole et de l'androsténone a été effectuée. Cette méthode a démontré sa robustesse et pourra donc être utilisée comme méthode de référence tout au long du projet.

La mise au point de l'analyse par GC-MS et la mise au point de la technique de prélèvement permettent également une grande avancée dans ce projet ainsi qu'une construction positive aux futures étapes d'analyse des COVs émis lors de la chauffe du gras de porc. De plus, une analyse du bruit de fond permettra de tenir compte des COVs présents dans l'air de l'abattoir, lors de la mise en place du capteur.

Enfin, une étude des COVs dans le gras de truie, de verrat non odorant et de verrat odorant a permis de faire progresser la connaissance de cette matrice complexe ainsi que de mettre en lumière les COVs présents dans les gras des différents porcs.

## 8. Perspectives

Malgré une validation et une réponse positives pour chaque objectif, quelques perspectives de recherches peuvent être établies pour compléter ce travail, afin de perfectionner les connaissances et d'avoir toutes les cartes en main pour la construction du futur capteur. Ces perfectionnements et améliorations peuvent se classer selon la vitalité pour la suite du projet : à court, moyen et long termes.

Premièrement, à court terme, deux points doivent être conclus et entérinés :

1. La mise au point de l'analyse par GC-MS n'a pas permis l'utilisation d'un standard interne. L'éthyle indole-2-carboxylate semble un bon candidat, cependant, une anomalie de répétition a été détectée. Des investigations avec des tests d'injection en mode Splitless peuvent être menées dans un premier temps afin de pouvoir poursuivre les analyses avec une calibration interne.
2. La technique de prélèvement a également été mise au point en testant différentes modalités. Une étude de sa répétabilité doit également être envisagée avant d'entamer d'autres analyses ou modalités différentes.

Quand ces deux points seront validés, d'autres améliorations peuvent être envisagées pour apporter une plus-value à ce travail.

Lors de l'analyse par HPLC-FLD, une catégorie d'échantillons contenant peu de scatole et d'androsténone a été mise en évidence. Deux hypothèses ont été établies : de faux positifs ou une synergie entre différentes molécules qui rendraient le verrat positif à l'odeur caractéristique de verrat. Afin de vérifier l'hypothèse des faux positifs, une étude sensorielle avec un panel plus large d'experts peut être mise en place pour s'assurer que les échantillons sont bien catégorisés comme positifs.

L'androsténone a des spécificités chimiques particulières avec un caractère lipophile fort et une volatilité faible. Cependant, la molécule serait plus largement détectée par le consommateur par la voie rétronasale que nasale. Il est donc important de déterminer précisément le coefficient entre la détection nasale et rétronasale afin de ne pas sous-estimer la quantité d'androsténone dans un échantillon, en se basant uniquement par les COVs émis lors de la chauffe du gras lors de la détection par capteur. L'utilisation d'une bouche électronique sur la viande cuite peut constituer une solution.

Ensuite, une liste du bruit de fond en COVs en abattoir a été établie. Cependant, celle-ci a été réalisée dans les mêmes conditions. Une liste plus complète peut être élaborée en rajoutant des modalités d'analyses telles que la saison ou encore des différences dans les paramètres externes aux porcs (employé, nettoyage...). En outre, une analyse plus approfondie des échantillons d'air prélevé pourrait être envisagée avec une analyse par déconvolution du chromatogramme afin d'enrichir cette liste.

Dans la même optique, l'étude de la matrice avec une analyse des COVs émis peut-être plus robuste avec l'analyse de davantage d'échantillons de verrat odorant, par exemple, avec des verrats de différentes races, provenant de différentes fermes, à des stades de maturité sexuelle différents... tous les paramètres établis ayant une influence sur le taux d'indole, scatole et androsténone chez le verrat.

De plus, une amélioration des paramètres de test afin de revenir aux critères fondamentaux de la faisabilité en abattoir (p.ex. diminuer le temps de chauffe) doit être effectuée.

Le développement du capteur en lui-même doit également être effectué, notamment choisir le matériau à sensibilité suffisante, à savoir un polymère à empreinte moléculaire à base de polypyrrole ou de polyaniline. Par ailleurs, des tests de sensibilité aux interférents et de l'efficacité du traitement des signaux des capteurs devront également être envisagés.

Enfin, afin de conclure le projet et d'éprouver le système du capteur, des tests finaux pourront être effectués tels que :

- une analyse en COVs avec différents échantillons, un lien entre les émissions en COVs et la concentration en molécules pourrait être établi ;

- une étude sensorielle pourrait venir compléter pour corrélérer les COVs étudiés en GC-MS, la concentration établie en HPLC-FLD et les ressentis du consommateur à propos du même morceau de viande ;

- pour finir, il conviendra de procéder à des tests de l'efficacité du capteur en abattoir et de voir s'il répond au cahier des charges initial : coût, facilité d'utilisation, stabilité dans le temps,...

## 9. Bibliographie

- Aaslyng M.D., Honnens E., Broge D.L., Brockhoff P.B., Haubo R. & Christensen B., 2016. The effect of skatole and androstenone on consumer response towards fresh pork from m . longissimus thoracis et lumborum and m . semimembranosus. *MESC* **116**, 174–185.
- Aluwé M., Bekaert K.M., Tuyttens, F. A. M. Vanhaecke L., Smet S. d., Brabander, H. F. d., Brabander D.L. d. & Millet S., 2011. Influence of soiling on boar taint in boars. *Meat Sci.* (87), 175–179.
- Aluwé M., Millet S., Bekaert K.M., Tuyttens F.A., Vanhaecke L., De Smet S. & De Brabander D.L., 2011. Influence of breed and slaughter weight on boar taint prevalence in entire male pigs. *Animal* **5**, 1283–1289.
- Aluwé M., Tuyttens F.A.M., Bekaert K.M., De Smet S., De Brabander D.L. & Millet S., 2012. Evaluation of various boar taint detection methods. *Animal* **6**(11), 1868–1877.
- Annor-Frempong I.E., Nute G.R., Whittington F.W. & Wood J.D., 1997. The problem of boar taint in pork II. The influence of skatole, androstenone and indole, presented individually and in combination in a model lipid base, on odour perception. *Meat Sci.* **47** (1/2), 49–61.
- APAQ-W A. wallone pour la promotion d'une agriculture de qualité, 2015. Le Porc Fermier de Wallonie , c ' est notre fierté !
- APAQ-W A. wallone pour la promotion d'une agriculture de qualité, 2018. Production wallone: Le porc wallon.
- Arn T.A. & H., 2004. Flavornet.org. <http://www.flavornet.org/info/60784-31-8.html>
- Babol J., Squires E.J. & Gullett E.A., 1995. Investigation of factors responsible for the development of boar taint. *Food Res. Int.* (28), 573–581.
- Babol J., Zamaratskaia G., Juneja R.K. & Lundström K., 2004. The effect of age on distribution of skatole and indole levels in entire male pigs in four breeds : Yorkshire , Landrace , Hampshire and Duroc **67**, 351–358.
- Baes C., Mattei S., Luther H., Ampuero S., Sidler X., Bee G., Spring P. & Hofer A., 2013. A performance test for boar taint compounds in live boars. *Animal* **7**, 714–720.
- Bekaert K.M., 2012. Chemical and sensory detection of boar taint.
- Bekaert K.M., Aluwé M., Vanhaecke L., Heres L., Duchateau L., Vandendriessche F. & Tuyttens F.A.M., 2013. Evaluation of different heating methods for the detection of boar taint by means of the human nose. *MESC* **94**(1), 125–132.
- Bekaert K.M., Bussche J. Vanden, Franc S., Tuyttens F.A.M., Brabander H.F. De, Vandendriessche F. & Vanhaecke L., 2012. A validated ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry analysis for the simultaneous quantification of the three known boar taint compounds **1239**(January 2012), 49–55.
- Bonneau M. & Weiler U., 2019. Pros and Cons of Alternatives to Piglet Castration : Welfare , Boar Taint , and Other Meat Quality Traits. *Animals* **9**(884), 1–12.
- Brennan J.J., Shand P.J., Fenton M., Nicholls L.L. & Aherne F.X., 1986. Androsténone, androstenol and odor intensity in backfat of 100- and 130- Kg boars and gilts. *Can. J. Anim. Sci.* (66), 615–624.

- Brown C., 1998. Coefficient of Variation. *In: Applied Multivariate Statistics in Geohydrology and Related Sciences*. Berlin, Heidelberg, 155–157.
- Burgot G. & Burgot J.-L., 2011. *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques*, 10.
- Bussmann K., 2015. The chemical profiling of boar taint within entire male pigs in the Western Cape, South Africa by.
- Buttinger G. & Verlinde P., 2014. In house validation of a reference method for the determination of boar taint compounds by LC-MSMS.
- Cadinot M., 2011. Nouveaux procédés d'élaboration de polymères à empreintes moléculaires.
- Chen G., 2007. Physiological and Biochemical Factors Responsible for Boar Taint.
- Chen G., Zamaratskaia G., Andersson H.K. & Lundström K., 2007. Effects of raw potato starch and live weight on fat and plasma skatole, indole and androstenone levels measured by different methods in entire male pigs. *Food Chem.* **101**(2), 439–448.
- Chevillon P. & Van Ferneij J.P., 2014. Le point sur les travaux européens relatifs aux porcs mâles non castrés.
- Claus R., Lo D., Lacorn M., Mentschel J. & Schenkel H., 2003. Effects of butyrate on apoptosis in the pig colon and its consequences for skatole formation and tissue accumulation 1. *J. Anim. Sci.* **81**, 239–248.
- Claus R., Schopper D. & Wagner H.G., 1983. Seasonal effects on steroids in blood plasma and seminal plasma of boars. *J. Steroid Biochem.* **19**, 725–729.
- Craig H.B., Pearson A.M. & Webb N.B., 1962. Fractionation of the component(s) responsible for sex odor/flavor in pork. *J. Food Sci.* **27**, 29–34.
- De Brabander H.F. & Verbeke R., 1986. Quantitative determination of androstenone in pig adipose tissue. *J. Chromatogr.* **363**, 293–302.
- Debliquy M., Lahem D., Tang X., Krumpmann A., Vila A.G., Raskin J.P. & Zhang C., 2017. Molecularly Imprinted Polymers for VOC Sensing : chemoresistive and optical Sensors. *In: In FiMPART Conference*.
- Dehnhard M., Claus R., Hillenbrand M. & Herzog A., 1993. High-performance liquid chromatographic method for the determination of 3-methylindole (skatole) and indole in adipose tissue of pigs. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **616**(2), 205–209.
- Deslandes B., Gariépy C. & Houde A., 2001. Review of microbiological and biochemical effects of skatole on animal production. *Livest. Prod. Sci.* (71), 193–200.
- Diemer T., Hales D. & Weidner W., 2003. Immune-endocrine interactions and Leydig cell function: the role of cytokines. *Andrologia* **35**, 55–63.
- Dolores M., Egea M., Belén M., Martínez B., Viera C., Rubio B. & Borrissier-pairó F., 2016. A procedure for sensory detection of androstenone in meat and meat products from entire male pigs : Development of a panel training. *MESC* **122**, 60–67.
- Doran E., Whittington F.W., Wood J.D. & Mcgivan J.D., 2002. Cytochrome P450IIE1 ( CYP2E1 ) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated

- pig hepatocytes **140**, 81–92.
- Doran O., 2012. Instrumental Detection of Boar Taint : Advantages and Disadvantages of the Existing Methods.
- Drews C., 1993. The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour*. **125**, 283–313.
- Ducauze C., Baillet-guffroy A., Bui T.X., Et C., Une V.D. & Analyse M.D., n.d. *Choix et validation d'une méthode d'analyse*, Paris, Agroparitech.
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of the castration of piglets 1 ( Question N ° EFSA-Q-2003 - 091 ) Adopted on the 12 th and 13 th July 2004. *EFSA J.* **1**(July), 1–18.
- European Union, 2008. Directive 2008/120/CE établissant les normes minimales relatives à la protection des porcs.
- Eurostat, 2018. Production de viande: porc.
- FAO, 2019. FAOstat. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- FAO O. des N. unies pour l'alimentation et l'agriculture-, 2016. Production et Santé optimales. Le secteur porcin.
- Felix W., Olson D., Rains G., Lundby F. & Haugen J., n.d. Boar Taint Detection Using Parasitoid Biosensors.
- Fischer J., Elsinghorst P.W., Bücking M., Tholen E., Petersen B. & Wüst M., 2011. Development of a candidate reference method for the simultaneous quantitation of the boar taint compounds androstenone, 3 $\alpha$ -androstenol, 3 $\beta$ -androstenol, skatole, and indole in pig fat by means of stable isotope dilution analysis-headspace solid-phase micro. *Anal. Chem.* **83**(17), 6785–6791.
- Fischer J., Elsinghorst P.W., Mark B., Tholen E., Petersen B. & Matthias W., 2011. Development of a candidate reference method for the simultaneous quantitation of the boar taint compounds androtenone,. *Anal. Chem.* 6785–6791.
- Fischer J., Gerlach C., Meier-dinkel L., Elsinghorst P.W., Boeker P., Schmarr H. & Wüst M., 2014. 2-Aminoacetophenone — A hepatic skatole metabolite as a potential contributor to boar taint. *FRIN* **62**, 35–42.
- Fischer J., Haas T., Leppert J., Schulze P., Horner G., Wüst M. & Boeker P., 2014. Fast and solvent-free quantitation of boar taint odorants in pig fat by stable isotope dilution analysis – dynamic headspace-thermal desorption – gas chromatography / time-of-flight mass spectrometry. *FOOD Chem.* **158**, 345–350.
- Font-i-Furnols M., 2012. Consumer studies on sensory acceptability of boar taint: A review. *Meat Sci.* **92**(4), 319–329.
- Frimpong N., Supervisor F., Derosa M.C., Ranganathan M.V. & Callahan J., 2017. Optimized Gold Nanoparticle Aptamer-Based Sensor To Detect Boar Taint.
- García-Regueiro J.A. & Diaz I., 1989. Evaluation of the contribution of skatole, indole, androstenone and androstenols to boar-taint in back fat of pigs by HPLC and capillary gas chromatography (CGC). *Meat Sci.* **25**(4), 307–316.

- Garcia-Regueiro J.A., Hortos M., Arnau C. & Monfort J.M., 1986. Determination of skatole and indole in back fat of pigs by HPLC. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **9**(6), 362–363.
- Garcia-Regueiro J.A. & Rius M.A., 1995. Evaluation of boar taint compounds in vapour phase by head space techniques coupled to capillary GC–MS. *In: Production and Utilization of Meat from Entire Male Pigs, Milton Keynes, UK, INRA.*
- Garcia Regueiro J.A. & Rius M.A., 1998. Rapid determination of skatole and indole in pig back fat by normal-phase liquid chromatography **809**, 246–251.
- Gaudré D., 2011. Réduire les défauts d’odeur sexuelle par l’alimentation. *Tech Porc* **1**, 2–3.
- Gilbert A.N. & Wysocki C., 1987. The smell results: survey. *Natl. Geographic* 514–525.
- Haga H. & Ranheim B., 2005. Castration of piglets: the analgesic effects of intratesticular and intrafunicular lidocaine injection. *Vet. Anaesth. Analg.* (32 (1)), 1–9.
- Hansen-Møller J., 1992. Determination of indolic compounds in pig back fat by solid-phase extraction and gradient high-performance liquid chromatography with special emphasis on the boar taint compound skatole. *J. Chromatogr. A* **624**(1–2), 479–490.
- Hansen-Møller J., 1994. Rapid high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of androstenone, skatole and indole in back fat from pigs. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **661**(2), 219–230.
- Hansson K.E., Lundström K., Persson J. & Fjelkner-Modig S., 1980. The importance of androstenone and skatole for boar taint. *Swedish J. Agric. Res.* **10**, 167–173.
- Hart J., Crew A., MCGuire N. & Doran O., 2017. EP 2 966 441 B1, Sensor and method for detecting androstenone or skatole in boar taint.
- Haugen J., 2006. The use of chemical sensor array technology, the electronic nose, for detection of boar taint. *Acta Vet. Scand.* **3**, 1–3.
- Haugen J.E., Brunius C. & Zamaratskaia G., 2012. Review of analytical methods to measure boar taint compounds in porcine adipose tissue: The need for harmonised methods. *Meat Sci.* **90**(1), 9–19.
- Haupt K. & Fradet A., 2001. polymères à empreintes moléculaires: principe et applications.
- Heyrman E., Millet S., Tuytens F.A.M., Ampe B., Janssens S., Buys N., Wauters J., Vanhaecke L. & Aluwé M., 2018. Olfactory evaluation of boar taint : effect of factors measured at slaughter and link with boar taint compounds (2017), 2084–2093.
- Hogard M.L., Lunte C.E. & Lunte S.M., 2017. Detection of reactive aldehyde biomarkers in biological samples using solid-phase extraction pre-concentration and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Methods* **9**(12), 1848–1854.
- Hugon-chapuis F. & Pichon V., 2007. Polymères à empreintes moléculaires pour l’ extraction sélective de composés de milieux biologiques Molecularly imprinted polymers for selective extraction of analytes from biological samples (January).
- Kaufmann G., Ritter F. & Schubert K., 1976. Quantitative determination of the boar taint substance 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one in fat. *J. Steroid Biochem.* **7**(8), 593–597.
- Kock H.L. De, Heinze P.H., Potgieter C.M., Dijksterhuis G.B. & Minnaar A., 2001. Temporal

aspects related to the perception of skatole and androstenone , the major boar odour compounds **57**.

Korsak N., 2006. Processus d'abattage. *In: Faculté de Médecine Vétérinaire Uliège.*

Larousse, 2019. Dictionnaire Larousse.  
<https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/anesthesie/3432?q=anesthesie#3431>

Lefebvre D., 2007. Alternatives à la castration des porcelets, Progrès accomplis depuis la dernière évaluation Alternatives à la castration des porcelets Progrès accomplis depuis la dernière évaluation Evaluation scientifique.

Legault C., 1978. Genetique et reproduction chez le porc. Journées Rech. Porcine en France, 10, pp.43-60., 43–60.

Loesel D., Lacorn M., Buettner D. & Claus R., 2006. Flavor improvement in pork from barrows and gilts via inhibition of intestinal scatole formation with resistant potato starch. *J. Agric. Food Chem.* **54**(16), 5990–5995.

Mågård M., Berg H., Tagesson V., Järemo M., Karlsson L. & Mathiasson L., 1995. Determination of androstenone in pig fat using supercritical fluid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 114–120.

Mainau E., Temple D. & Manteca X., 2013. Effet de la castration sur le bien-être des porcelets. *Fawec* **5**.

Marmion J.-F., 2008. Qu'est-ce que l'héritabilité ? [https://www.scienceshumaines.com/qu-est-ce-que-l-heritabilite\\_fr\\_21728.html](https://www.scienceshumaines.com/qu-est-ce-que-l-heritabilite_fr_21728.html)

Mathur P.K., ten Napel J., Bloemhof S., Heres L., Knol E.F. & Mulder H.A., 2012. A human nose scoring system for boar taint and its relationship with androstenone and skatole. *Meat Sci.* (91), 414–422.

Matuszewski B.K. & Constanzer M.L., 2003. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC - MS / MS **75**(13), 3019–3030.

Meier-Dinkel L., Gertheiss J., Schnackel W. & Morlein D., 2016. Consumers' perception and acceptance of boiled and fermented sausages from strongly boar tainted meat. *Meat Sci.* **118**, 34–42.

Meinert L., Lund B., Bejerholm C. & Aaslyng M.D., 2017. Distribution of skatole and androstenone in the pig carcass correlated to sensory characteristics. *Meat Sci.* **127**, 51–56.

Merks J.W.M., Hanenberg E.H.A.T., Bloemhof S. & Knol E.F., 2009. Genetic opportunities for pork production without castration. *Anim. Welfare.* **18**, 539–544.

Merlot E., Thomas F. & Prunier A., 2013. Comparison of immune and health markers in intact and neonatally castrated male pigs. *Vet. Rec.* **173**, 317–322.

Mo D., Trautmann J., Gertheiss J., Meier-dinkel L., Fischer J., Eynck H., Heres L., Looft C. & Tholen E., 2016. Interaction of Skatole and Androstenone in the Olfactory Perception of Boar Taint.

Mörlein D. & Tholen E., 2014. Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue from entire male pigs with extremely divergent levels of boar taint compounds - An exploratory study. *Meat Sci.*

- Mörlein D. & Tholen E., 2015. Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue from entire male pigs with extremely divergent levels of boar taint compounds — An exploratory study. *MESC* **99**, 1–7.
- Moss B.W., Hawe S.M. & Walker N., 1993. Sensory thresholds for skatole and indole. Dans: Measurement and Prevention of Boar Taint in Entire Male Pigs. In: *Les Colloques de l'INRA N°60. Édité Par Bonneau, M. 60: Pp 63-68.*
- Nezer C., Moreau L., Brouwers B., Coppieters W., Detilleux J., Hanset R., Karim L., Kvasz A., Leroy P. & Michel G., 1999. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nat. Genet.* **21**, 155–156.
- Ochiai N., Tsunokawa J., Sasamoto K. & Hoffmann A., 2014. Multi-volatile method for aroma analysis using sequential dynamic headspace sampling with an application to brewed coffee. *J. Chromatogr. A* **1371**, 65–73.
- Olson D., Felix W. & Haugen J., 2012. Threshold Detection of Boar Taint Chemicals Using Parasitic Wasps. *J. Food Sci.* **77**(10), 356–361.
- Parois S., 2016. Mise en évidence des effets du génotype, de l'agressivité et de l'hygiène sur la teneur en composés odorants du gras dorsal de la viande de porc mâle entier.
- Parois S., Bonneau M., Chevillon P., Larzul C., Quiniou N., Robic A. & Prunier A., 2018. Odeurs indésirables de la viande de porcs mâles non castrés : problèmes et solutions potentielles. *INRA Prod. Anim.* **31**(1), 23–36.
- Patterson R.L.S., 1968. 5 $\alpha$ -androst-16-ene-3-one:—Compound responsible for taint in boar fat. *J. Sci. Food Agric.* **19**, 31–38.
- Peleran J.C. & Bories G.F., 1985. Gas chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of traces of indole and 3-methylindole (skatole) in pig back fat. *J. of Chromatography* **324**, 469–474.
- Piletsky S.A. & Turner A.P.F., 2002. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers 317–323.
- Porter M.G., Hawe S.M. & Walker N., 1989. Method for the determination of indole and skatole in pig fat. *J. Sci. Food Agric.* **49**(2), 203–209.
- PUB CHEM, n.d. . <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>
- Rabaud N.E., Ebeler S.E., Ashbaugh L.L. & Flocchini R.G., 2002. The application of thermal desorption GC/MS with simultaneous olfactory evaluation for the characterization and quantification of odor compounds from a dairy. *J. Agric. Food Chem.* **50**(18), 5139–5145.
- Rakotomalala R., 2010. Analyse discriminante descriptive ou analyse factorielle discriminante.
- Rius A., Horto M. & Garcia-Regueiro J., 2005. Influence of volatile compounds on the development of off-flavours in pig back fat samples classified with boar taint by a test panel. *Meat Sci.* **71**, 595–602.
- Rius M.A. & Garcia-Regueiro J.A., 1998. Analysis of androstenone in pig back fat by solid-phase extraction and GC/MS. In: *Proceedings 44th International Congress of Meat Science and Technology, 30. August-4. September 1998, Barcelona, Spain.* 584–586.
- Rius M.A. & Garcia-Regueiro J.A., 2001. Skatole and indole concentrations in Longissimus dorsi and fat samples of pigs **59**, 285–291.

- Rius M.A., Hortós M. & García-Regueiro J.A., 2005. Influence of volatile compounds on the development of off-flavours in pig back fat samples classified with boar taint by a test panel. *Meat Sci.* **71**(4), 595–602.
- Rius Solé M. & Garcia Regueiro J.A., 2001. Role of 4-phenyl-3-buten-2-one in boar taint: Identification of new compounds related to sensorial descriptors in pig fat. *J. Agric. Food Chem.* **49**(11), 5303–5309.
- Robic A., Larzul C. & Bonneau M., 2007. Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue : A review. *EDP Sci.* **40**, 129–143.
- Schilt R., Haasnoot W., Van Bennekom E.O., Hooijerink H., Weseman J.M. & Korbee H.J., 1989. Determination of the boar taint steroid 5-alpha-androst-16-en-3-one in adipose tissue of pigs by size exclusion chromatography (SEC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Arch. Lebensmittelhyg.* (40), 49.
- Schreurs N.M., McNabb W.C., Tavendale M.H., Lane G.A., Barry T.N. & Cummings T., 2007. Skatole and indole concentration and the odour of fat from lambs that had grazed perennial ryegrass/white clover pasture or *Lotus corniculatus*. *Anim. Feed Sci. Technol.* **138**, 254–271.
- Serra A., Buccioni A., Rodriguez-estrada M.T., Conte G., Cappucci A. & Mele M., 2014. Fatty acid composition, oxidation status and volatile organic compounds in “Colonnata” lard from Large White or Cinta Senese pigs as affected by curing time. *MESC* **97**(4), 504–512.
- Sharma V.K., 2011. Development and validation of a method for determination of corticosteroids in pig fat using liquid chromatography – tandem mass spectrometry **879**(Lc), 403–410.
- Skrlep M., Batorek N., Bonneau M., Fazarinc G., Segula B. & Andek-Potokar M., 2012. Elevated fat skatole levels in immunocastrated, surgically castrated and entire male pigs with acute dysentery. *Vet. J.* **194**, 417–419.
- Sørensen K.M. & Engelsen S.B., 2014. Measurement of boar taint in porcine fat using a high-throughput gas chromatography-mass spectrometry protocol. *J. Agric. Food Chem.* **62**(39), 9420–9427.
- Sørensen K.M., Westley C., Goodacre R. & Engelsen S.B., 2015. Simultaneous quantification of the boar-taint compounds skatole and androstenone by surface-enhanced Raman scattering (SERS) and multivariate data analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**(25), 7787–7795.
- Tajet H. & Andresen Ø., 2006. Estimation of genetic parameters of boar taint; skatole and androstenone and their correlations with sexual maturation. *Acta Vet. Scand.* **48**, 1–4.
- The Commission of the European Communities, 2002. European Criteria 2002/657 8–36.
- The Commission of the European Communities, 2010. European Declaration on alternatives to surgical castration of pigs.
- Thomsen R., Edwards S., Jensen B., Rousing T. & Sørensen J., 2015. Weight and season affects androstenone and skatole occurrence in entire male pigs in organic pig production. *Animals* **9**(9), 1577–1586.
- Trautmann J., Meier-dinkel L., Gertheiss J. & Mörlein D., 2016. Boar taint detection : A comparison of three sensory protocols. *MESC* **111**, 92–100.

- Tuomola M., Vahva M. & Kallio H., 1996. High-performance liquid chromatography determination of skatole and indole levels in pig serum, subcutaneous fat, and submaxillary salivary glands. *J. Agric. Food Chem.* **44**(5), 1265–1270.
- Vahlun S., 1993. Production of entire male pigs in Denmark. *Fleischwirtschaft* **73**(4), 445–448.
- Vercruyssen E., 2014. Dynamic headspace ( DHS ) technique : set-up and parameter control for GC / MS analysis of odorant formulations.
- Verheyden K., Noppe H., Aluwé M., Millet S., Vanden Bussche J. & De Brabander H.F., 2007. Development and validation of a method for simultaneous analysis of the boar taint compounds indole, skatole and androstenone in pig fat using liquid chromatography-multiple mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1174**(1–2), 132–137.
- Verplanken K., Wauters J., Durme J. Van, Claus D., Vercammen J., Saeger S. De & Vanhaecke L., 2016. Rapid method for the simultaneous detection of boar taint compounds by means of solid phase microextraction coupled to gas chromatography / mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1462**, 124–133.
- Verplanken K., Wauters J., Vercruyssen V., Aluwé M. & Vanhaecke L., 2016a. Development and validation of a UHPLC-HR-Orbitrap-MS method for the simultaneous determination of androstenone , skatole and indole in porcine meat and meat products. *FOOD Chem.* **190**(2016), 944–951.
- Verplanken K., Wauters J., Vercruyssen V., Aluwé M. & Vanhaecke L., 2016b. Development and validation of a UHPLC-HR-Orbitrap-MS method for the simultaneous determination of androstenone, skatole and indole in porcine meat and meat products. *Food Chem.* **190**(2016), 944–951.
- Vestergaard J.S., Haugen J. & Byrne D. V., 2006. Application of an electronic nose for measurements of boar taint in entire male pigs. *Meat Sci.* **74**, 564–577.
- Vold E., 1970. Meat production from boars and castrates. (*Report No. 238*), *Meld. Nord.* **IV. Organo**(49), 1–25.
- Wagenberg V.C.P., Snoek H.M., van der Fels J.B., van der Peet-Schwering C.M., Vermeer H.M. & Heres L., 2013. Farm and management characteristics associated with boar taint. *Anim. an Int. J. Anim. Biosci.* **7**, 1841–1848.
- Wauters J., Verplanken K., Vercruyssen V., Ampe B., Aluwé M. & Vanhaecke L., 2017. Sensory evaluation of boar meat products by trained experts. *Food Chem.* **237**, 516–524.
- Wesoly R. & Weiler U., 2012. Nutritional influences on skatole formation and skatole metabolism in the pig. *Animals* **2**(2), 221–242.
- Westmacott K.L., Crew A.P., Doran O. & Hart J.P., 2019. Novel , rapid , low-cost screen-printed ( bio ) sensors for the direct analysis of boar taint compounds androstenone and skatole in porcine adipose tissue : Comparison with a high-resolution gas chromatographic method. *Biosens. Bioelectron.* (October), 111837.
- Whitcombe M.J., Kirsch N. & Nicholls I.A., 2014. *Molecular imprinting science and technology : a survey of the literature for the years 2004 – 2011*, 297–401.
- Wille K., Brabander H.F., De Wulf E., Van Caeter P., Janssen C.R. & Vanhaecke L., 2012. Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. *Trac-Trends Anal. Chem.* **35**, 87–108.

- Xue J., Dial G.D., Holton E.E., Vickers Z., Squires E.J., Lou Y., Godbout D. & Morel N., 1996. Breed differences in boar taint: relationship between tissue levels boar taint compounds and sensory analysis of taint. *J. Anim. Sci.* (74), 2170–2177.
- Yano K. & Karube I., 1999. Molecularly imprinted polymers for biosensor applications **18**(3), 199–204.
- Zabolotsky D.A., Chen L.F., Patterson J.A., Forrest H.M., Lin H.M. & Grant A.L., 1995. Supercritical carbon dioxide extraction of androstenone and skatole from pork fat. *J. Food Sci.* **60**, 1006–1008.
- Zamaratskaia G., Andersson H.K., Chen G., Andersson K., Madej A. & Lundström K., 2008. Effect of a gonadotropin-releasing hormone vaccine (Improvac<sup>TM</sup>) on steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs. *Reprod. Domest. Anim.* **43**(3), 351–359.
- Zamaratskaia G., Chen G. & Lundstro K., 2006. Effects of sex , weight , diet and hCG administration on levels of skatole and indole in the liver and hepatic activities of cytochromes P4502E1 and P4502A6 in pigs. *Meat Sci.* **72**, 331–338.
- Zamaratskaia G. & Jastrebova J., 2006. Application of LC – MS for Determination of Indole and 3-Methylindole in Porcine Adipose Tissue (7), 435–439.
- Zamaratskaia G. & Squires E.J., 2009. Biochemical , nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs (3:11), 1508–1521.
- Zhang S., Cai L., Koziel J.A., Hoff S.J., Schmidt D.R., Clanton C.J., Jacobson L.D., Parker D.B. & Heber A.J., 2010. Field air sampling and simultaneous chemical and sensory analysis of livestock odorants with sorbent tubes and GC – MS / olfactometry. *Sensors Actuators B. Chem.* **146**(2), 427–432.
- Zols S., Ritzmann M. & Heinritzi K., 2006. Effect of a local anaesthesia in castration of piglets. *Tieraerztliche Prax. Ausgabe Grosstiere Nutztiere* **34**(2), 103–106.