

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Étude des mécanismes de production et de dépôt des composés de la fumée lors du fumage de la chair de poisson. Contribution à l'obtention de produits sains possédant de bonnes propriétés organoleptiques.

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences Agro-Alimentaires
Spécialité : Chimie des Arômes

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Clément CATANÉO

Le 24 Octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs Mme. MENUT Chantal, *Professeur* • Université de Montpellier II
M. ENGEL Erwan, *Chargé de Recherche* • INRA, Clermont-Ferrand-Theix
Examineurs Mme. RAYNAUD Christine, *Ingénieur de Recherche* • ENSIACET, Toulouse
M. EPPE Gauthier, *Professeur* • Université de Liège, Belgique
M. BOUJTITA Mohammed, *Maître de conférences* • Université de Nantes
M. BARON Régis, *Cadre de Recherche* • IFREMER, Nantes
M. LE BIZEC Bruno, *Professeur* • ONIRIS, Nantes • *co-directeur de thèse*
M. SÉROT Thierry, *Professeur* • ONIRIS, Nantes

Directeur de thèse : M. SÉROT Thierry

« Tell me and I forget, teach me and I remember, involve me and I learn. »

-Benjamin Franklin

Avant-propos

Ce manuscrit présente des travaux de recherche qui ont été réalisés en collaborations avec :

- le Laboratoire de Biochimie Alimentaire Industrielle (LBAI) de l'école nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique (ONIRIS) ;
- le Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) de l'école nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique (ONIRIS) ;
- le laboratoire de Sciences et Technologie de la Biomasse Marine (STBM) du centre de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER).

Ces travaux ont fait l'objet d'un financement par le ministère de l'Enseignement et de la Recherche et de la Région Pays de la Loire dans le cadre du projet régional « Approche Intégrée de la Qualité et la Sécurité des Aliments » (AISQUAL) coordonné par le Dr. Patricia Le Bail (INRA Nantes). A ce titre, une partie des résultats obtenus ont été intégrés à la restitution finale du projet (rapport de recherche et colloque de restitution).

Ces résultats ont également été valorisés sous forme de communications écrites et orales :

Publication scientifique:

Catanéo C. ; Lalanne V. ; Baron R. ; Courcoux P. ; Le Bizec B. ; Le Thuaut L. ; Prost C. ; Sérot T. (2010). *Use of comprehensive GC to assess the influence of smoke generation parameters over the content of phenolic compounds in smoke*. Book of Full Papers, 5th Central European Congress on Food Proceedings, ISBN 978-80-89088-89, pp 19-24.

Communications orales internationales et nationales :

Catanéo C. ; Chopin C. ; Sérot T. *Artificial fish fillet-like matrices: a powerful tool to unravel food smoking complexity*. Biopolymers 2010, 1st - 3rd December 2010, Le Croisic, France

Catanéo C. ; Lalanne V. ; Baron R. ; Courcoux P. ; Le Bizec B. ; Le Thuaut L. ; Prost C. ; Sérot T. *Use of comprehensive GC to assess the influence of smoke generation parameters over the content of phenolic compounds in smoke*. 5th Central European Congress on Food, 19th - 22nd May 2010, Bratislava, Slovaquie

Catanéo C. ; Le Thuaut L. ; Marquez-Haury A. ; Rannou C. ; Sérot T. ; Prost C. *How comprehensive GC is a useful tool to elucidate food aroma analysis ? Focuses on Bread, Petfood and smoked fish*. 1st European Comprehensive GCxGC Workshop, 17th - 18th June 2009, Amsterdam, The Netherlands

Catanéo C. ; Veyrand B. ; Baron R. ; Chopin C. ; Le Bizec B. ; Sérot T. ; *Contribution à la compréhension des phénomènes régissant les qualités sanitaires et organoleptiques des produits de fumage*. Colloque PONAN-AIQUAL, 25 Novembre 2009, Nantes, France

Serot T., Baron R. Cardinal M. Catanéo C., Knockaert C., Le Bizec B. Prost C., Monteau F., Varlet V. *Assessment of the effects of the smoke generation processes and of smoking parameters on the organoleptic perception, the levels of the most odorants compounds and PAH content of the smoked salmon fillets*. Experts Workshop on Fish Technology, Utilization and Quality Assurance in Africa 24-28 November 2008, Agadir, Maroc

Communications par poster internationales et nationales :

Catanéo C. ; Lalanne V. ; Baron R. ; Courcoux P. ; Le Bizec B. ; Le Thuaut L. ; Prost C. ; Sérot T. *Identifying smoke generation operating conditions importance for phenolic compounds production : Two-dimensional GC – Time of Flight MS approach*. 7th GCxGC Symposium, 31 Mai - 1er Juin, Riva Del Garda, Italie

Catanéo C. ; Lalanne V. ; Baron R. ; Courcoux P. ; Le Bizec B. ; Le Thuaut L. ; Prost C. ; Sérot T. *Use of comprehensive GC to assess the influence of smoke generation parameters over the content of phenolic compounds in smoke*. Les journées arôme, 2 – 3 Avril 2009, Dijon, France

Baron R. ; Cardinal M. ; Chevalier-Gigout F. ; Catanéo C. ; Cornet J. ; Havet M. ; Knockaert C. ; Leroi F. ; Sérot T. ; Veyrand B. ; Vanquin V. *Some elements of comparison between « traditional » (auto-combustion) and atomizing smoking process of salmon*. TAFT, 15-18 Septembre 2009, Copenhague, Danemark

Vulgarisation et dissémination des résultats scientifiques :

« *Can we smell a safe smoked salmon ?* » : *fiché résumée de vulgarisation scientifique pour intégration au « supermarché virtuel » (plateforme en ligne de diffusion d'informations scientifiques à destination des industriels) dans le cadre du projet européen de dissémination des résultats de recherche « AgriFood Results » : « Can we smell a safe smoked salmon ? »*

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Madame **Chantal Menut** et Monsieur **Erwan Engel**, rapporteurs de cette thèse. Je vous suis sincèrement reconnaissant d'avoir consacré du temps à la lecture, l'évaluation et la discussion de ces travaux.

Un grand merci également à Madame **Christine Raynaud**, Monsieur **Gauthier Eppe**, Monsieur **Mohammed Boujtita** et Monsieur **Régis Baron** pour leur participation au jury de cette thèse et l'ensemble de leurs remarques.

L'ensemble de ce manuscrit ne pourrait suffire à témoigner toute ma gratitude à Monsieur **Thierry Sérot** qui a dirigé ces travaux de main de maître. C'est en particulier grâce à ses conseils, sa confiance et son encadrement de qualité que j'ai pu mener à bien cette thèse. Mon plus grand merci pour ce savant mélange de Science, d'humour et de patience qui n'appartient qu'à toi.

Je tiens également à remercier Monsieur **Bruno Le Bizec**, co-directeur de ces travaux, grâce à qui j'ai eu la chance de collaborer avec le LABERCA. Merci, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis d'effectuer une partie de mes travaux dans la formidable équipe qu'il dirige.

J'ai eu une chance infinie de pouvoir passer tant de temps au sein du LBAI, et ma reconnaissance pour ses occupants est à la mesure des rencontres que j'y ai faites : formidable. Merci donc à **Carole** qui m'en a ouvert grand les portes jusqu'au bout, en faisant toujours preuve de la plus grande bienveillance envers moi.

Je pense évidemment aussi à **Béatrice**, sans qui je n'aurais probablement pas survécu dans la jungle administrative d'une thèse. Pour m'avoir si souvent sauvé des méandres bureaucratiques avec une patience et une célérité incroyable : merci !

Au nombre de celles sans qui ces travaux n'auraient jamais pu être menés à bien dans d'aussi bonnes conditions il y a également **Cécile**, **Catherine**, **Michelle** et **Valérie**. Les filles, pour votre gentillesse sincère, votre efficacité infaillible et votre faculté quasi-miraculeuse à m'empêcher de détruire totalement le labo : bravo ! Mais surtout, merci.

Il y a aussi ceux qui après m'avoir enduré comme étudiant m'on accueilli comme thésard, éclairé, conseillé, supporté et tant apporté. Pour tous ces moments (que ce soit au quotidien ou en déplacements, mais aussi durant ces formidables TPs) et pour tout ce que j'ai pu en retirer, je ne remerciais jamais assez **Gaëlle**, **Florence**, **Joëlle** et **Laurent**.

Que dire enfin de tous les autres, sinon que ce laboratoire n'aurait pas pu être ce qu'il était sans eux !? Irremplaçables post-doc, compagnons thésards ou stagiaires de passage, qui n'ont cessé d'insuffler au labo un supplément de vie et de soleil. Je tiens à tous vous remercier, ainsi que tous ceux que j'ai pu croiser plus ou moins fréquemment dans notre interminablement interminable couloir ou au sein de l'école.

Sans flatterie aucune, je ne peux qu'ajouter une mention très spéciale et très personnelle toute particulièrement pour **Cécile**, **Angélique**, **Araceli**, **Christelle** et nécessairement **Pauline** : formidable acolyte et co-fondatrice du *Oui-ouisme*. C'est avec vous que j'aurais passé le plus clair de mon temps et je peux dire malgré tout que ce ne fut pas assez tant il fut formidable à tout point de vue !

Il me faut également saluer et remercier chaleureusement tous les habitants du LABERCA que j'ai côtoyé avec un plaisir chaque fois renouvelé. Travailler et échanger avec vous fût bien plus qu'une partie de plaisir.

Je pense spécialement à **Bruno V** avec qui le temps passé ne put qu'être trop court, tant il m'a apporté scientifiquement, techniquement et humainement. Très sincèrement : merci pour ta sympathie, ta disponibilité et ton inextinguible dynamisme en toutes circonstances.

Un grand merci également à **Sophie** pour avoir pris une part active dans ces travaux avec une gentillesse et une efficacité rare.

Au sein du reste de l'école, c'est surtout avec **Philippe** que j'ai eu le plaisir de travailler. Vraiment merci, pour avoir réussi ce tour de force de me donner le goût des statistiques et d'être chaque fois disponible pour m'aider et m'éclairer dans une parfaite bonne humeur.

Du côté de l'IFREMER, c'est avant tout **Camille** et **Régis** que je me dois de remercier : quel plaisir et quel honneur d'avoir été formé à l'école d'aussi fins et sympathiques « fumeurs » que vous ! Votre aide ainsi que vos conseils scientifiques et techniques furent très précieux.

Un immense merci également à **Jean-Yves**, sans qui une grande part de ces travaux n'aurait pas été possible. Merci pour ton aide colossale (la fabrication du « piège » n'étant que la partie émergée de l'iceberg) mais aussi pour ton accueil toujours joyeux et amical.

Christine, reçois également une part conséquente de mes remerciements. Pour t'être intéressée à ces travaux avec tant de spontanéité, d'énergie et de générosité. Mais aussi pour ta bienveillance et ton humour constants, le temps passé avec toi ne fut jamais perdu !

Merci également à tous les autres membres du département STAM, qu'ils aient contribué à ces travaux par leur aide ou leur bonne humeur, en particulier : **Karine, Claire** et **Laura**.

Je ne peux honnêtement pas passer sous silence l'énorme soutien que j'ai pu recevoir depuis l'extérieur, par ces gens incroyables qui furent si souvent mes meilleurs moments.

Ainsi, ces années nantaises ont été l'occasion de rencontres et d'aventures mémorables et je tiens à en remercier **Emilie, Sarah, Aude, Adrien, Raül** et **Ludo**. C'est avec la meilleure des équipes d'amis que j'ai pu parcourir ce chemin et je ne doute pas que de l'Andalousie ou de Bretagne, jusqu'aux cales du Remorqueur on s'en souviendra longtemps. ; *Qué fuerte!*

Mais je n'en oublie pas pour autant mes « vieux nantais », **SophieD, Elo, Bruno, Fanny, Sitraka, Chacha, Pim, SophieC** et enfin, **Dorothee** : collègue épistolaire et *one of a kind partner in crime*. Sincèrement merci à ces ENITIENS qui m'ont fait le bonheur de me garder leur amitié et me retrouver chaque fois avec un grandiose et un bonheur intact.

J'ai également tout un wagon de mercis pour les quelques, rares et précieuses personnes dont le temps et l'éloignement n'auront jamais émoussé l'amitié et le soutien. **Cécile, Julie, Min** et **Sam**, ces moments à passer avec vous furent trop rares et courts, mais ils auront compté d'autant plus pour moi à chaque fois.

Finalement, je veux donner mes plus vifs remerciements à l'ensemble de **ma famille** qui m'a suivi pas à pas avec toujours la même patience, la même générosité et la même énergie dont ils ont toujours fait preuve pour moi, en dépit de mes défauts qu'ils connaissent mieux que quiconque. Pour m'avoir accompagné depuis le tout début jusqu'à l'ultime fin de cette thèse, c'est sans exception et sans la moindre réserve que je vous remercie tous ici.

Un merci tout particulier à mes **grands parents** car leur bienveillance et leur inconditionnelle confiance ont toujours compté au nombre de mes carburants. A mes frères, **Jérôme, Vincent** et **Antoine** pour être aujourd'hui, encore et toujours, indéfectiblement, sans conteste, irréfragablement et très simplement : les meilleurs à tous points de vue !

A **mes parents**, enfin et surtout, car je vous dois tout ce qu'il y a de plus important. Tous les mercis du monde ne sont pas suffisants en face des soutiens et de l'amour que vous n'avez jamais cessé de m'apporter. C'est avant tout à vous que je dois d'être arrivé ici et ainsi. Merci.

Et aussi, merci aux lecteurs de ce travail, car c'est modestement pour vous qu'il a été réalisé.

Sigles et abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales
AFNOR : Association Française de Normalisation
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AG : Acides Gras
AGI : Acides Gras Insaturés
AGPI : Acides Gras PolyInsaturés
AGS : Acides Gras Saturés
ANOVA : Analyse de la Variance
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (anciennement AFSSA)
AOAC : Association of Analytical Communities
ASE : Accelerated Solvent Extraction
BaA : Benz[a]anthracène
BSTFA : N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CAR : Carboxen
CC : Chromatographie sur Colonne ouverte
COV : Composés Organiques Volatils
CPP : cyclopenta[c,d]pyrène
DHS : Direct HeadSpace (échantillonnage direct de l'espace de tête)
DLC : Date Limite de Consommation
DMP : diméthylphénol
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DSV : Distillation Sous Vide
DVB : Divinylbenzene
EDS : Extraction Distillation Simultanée
EFSA : European Food Safety Authority
F : facteur de réponse
FD : Fluorimetric Detector (DéTECTEUR Fluorimétrique)
FID : Flame Ionisation Detector (DéTECTEUR à Ionisation de Flamme)
FLD : Florescence Detector (DéTECTEUR à fluorescence)
G/P : ratio de concentration guaïacol/phénol
G/S : ratio de concentration guaïacol/syringol
GC : Gas Chromatography (Chromatographie en phase Gazeuse)
GC/GC : chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle
GCxGC : chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle totale
GC-COOL : Gas Chromatography-Concentration Omission of Odorants at Liquid state
GC-GOOD : Gas Chromatography-Global Odorants Omission Detection
GC-O : Gas Chromatography-Olfactometry (Chromatographie en phase Gazeuse couplée à l'Olfactométrie)
GPC : Gel Permeation Chromatography (chromatographie par perméation de gel)

HACA : Hydrogen Abstraction - Carbon Addition (Abstraction d'un atome d'Hydrogène / Addition de Carbone)

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HAP4 : groupe de 4 HAP impliqués dans la future réglementation européenne (Benz[a]anthracène, Benzo[b]fluoranthène, Benzo[a]pyrène, Chrysène)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)

HS-SPME : HeadSpace Solid Phase MicroExtraction (microextraction en phase solide de l'espace de tête)

HSSE : HeadSpace Sorptive Extraction

IRL : Indice de Rétention Linéaire

ITD : Ion Trap Detector (Détecteur à Trappe Ionique)

Kow : Coefficient de partage octanol/eau

LC : Liquid Chromatography (Chromatographie en phase Liquide)

LC-FD : Liquid Chromatography- Fluorimetric Detector (Chromatographie en phase Liquide couplée à un Détecteur Fluorimétrique)

LC/GC-MS : Liquid Chromatography/Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie en phase Liquide couplée à la Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse)

LC/LC : Liquid Chromatography/Liquid Chromatography (Chromatographie en phase Liquide couplée à la Chromatographie en phase Liquide)

LC/LC-FD : Liquid Chromatography/Liquid Chromatography-Fluorimetric Detector (Chromatographie en phase Liquide couplée à la Chromatographie en phase Liquide couplée à un Détecteur Fluorimétrique)

LC/LC-UV : Liquid Chromatography/Liquid Chromatography-UltraViolet (Chromatographie en phase Liquide couplée à la Chromatographie en phase Liquide couplée à un détecteur Ultraviolet)

LC-MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse)

LC-MS/MS : Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem)

LC-UV : Liquid Chromatography-UltraViolet (Chromatographie en phase Liquide couplée à un détecteur UltraViolet)

LLE : Liquid Liquid Extraction (extraction liquide-liquide)

LOD : Limit Of Detection (limite de détection)

LogP : Logarithme du coefficient de partage octanol/eau

LOQ : Limit Of Quantification (limite de quantification)

LSD : Least Significant Difference (Plus petite différence significative)

MAE : Microwave Assisted Extraction (extraction assistée par micro-ondes)

MASE : Membrane Assisted Solvent Extraction (extraction au solvant assistée par membrane)

MS : Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse)

MS/MS : Tandem Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse en Tandem)

PA : PolyAcrylate

PDMS : PolyDiMéthylSiloxane

PE : Polyéthylène

PLE : Pressurised Liquid Extraction (Extraction par Solvants sous Pression)

POP : Polluants Organiques Persistants

PTFE : Polytétrafluoroéthylène (Téflon ®)

QqQ : Spectromètre de masse triple quadripolaire

qMS (ou « Q ») : Quadrupole Mass Spectrometer (Spectromètre de masse Quadripolaire)

R² : Coefficient de détermination (coefficient « ajusté », sauf mention contraire)

Re : Nombre de Reynolds

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAFE : Solven Assisted Flavor Evaporation

SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction (Extraction par Barreau Aimanté Absorbant)

SCF : Scientific Commitee on Food

SDE : Simultaneous Extraction Distilation

SFE : Supercritical Fluid Extraction (Extraction par Fluide Supercritique)

SIM : Signle Ion Monitoring

SLE : Solid-Liquid Extraction (extraction solide-liquide)

SPE : Solid-Phase Extraction (Extraction en Phase Solide)

SPME : Solid-Phase MicroExtraction (Microextraction en Phase solide)

SPME-DED : Solid-Phase MicroExtraction-Direct Extraction Device

SRM : Single Reaction Monitoring

TEF : Toxic Equivalent Factor (Facteur d'Equivalence Toxique)

TEQ : Toxic Equivalent Quantity (Quantité d'Equivalence Toxique)

TOF : Time-Of-Flight detector (Détecteur à Temps de vol)

TOFMS : Time-Of-Flight Mass Spectrometer (spectromètre de masse à temps de vol)

USE : Ultra-Sound Extraction (extraction assistée par ultrasons)

UV : UltraViolet

Table des Matières

Avant-propos	i
Remerciements	v
Sigles et abréviations	ix
Table des Matières	xv
Introduction	1
Étude bibliographique	5
I. Le fumage	7
I.1. Généralités	7
I.1.1. Aspects historiques	7
I.1.2. Aspects économiques	7
I.2. La matière première fumée : La chair de poisson	9
I.2.1. Le filet de poisson : un muscle strié	9
I.2.1.1. Structure du muscle strié	9
I.2.1.2. Composition du muscle strié	11
I.2.1.2.1. Composition globale et sources de sa variabilité	11
I.2.1.2.2. Les protéines	12
I.2.1.2.2.1. Myofibrilles	12
I.2.1.2.2.2. Protéines sarcoplasmiques	13
I.2.1.2.2.3. Protéines extracellulaires	15
I.2.1.2.3. L'eau	16
I.2.1.2.4. Les lipides	16
I.2.1.2.5. Les glucides	19
I.2.1.2.6. Les minéraux	19
I.3. Fumage de filets de poisson	19
I.3.1. Salage	19
I.3.1.1. Salage à sec	20
I.3.1.2. Saumurage traditionnel	21
I.3.1.3. Saumurage par injection	21
I.3.2. Rinçage	21
I.3.3. Séchage	21
I.3.4. Génération de la fumée	22
I.3.4.1. Générateur à autocombustion	23
I.3.4.2. Générateur à plaques thermostatées	24
I.3.4.3. Générateur à friction	24
I.3.4.4. Vaporisation de « fumées liquides »	25
I.3.4.4.1. Les arômes de fumée	25
I.3.4.4.2. Les fumées liquides dans l'industrie du fumage	27
I.3.5. Exposition du filet à la fumée	28
II. La fumée	30
II.1. Chimie de la génération de fumée	30
II.1.1. Composition de la matière première : le bois	30
II.1.2. Réactions de pyrolyse	32
II.1.2.1. Décomposition de la cellulose	33

II.1.2.2. Décomposition de l'hémicellulose	36
II.1.2.3. Décomposition de la lignine	36
II.1.2.4. Paramètres influençant les décompositions	36
II.2. Composition chimique de la fumée	38
II.2.1. Les familles de composés chimiques de la fumée	38
II.2.2. Facteurs influençant la composition de la fumée	40
II.2.2.1. Essence de bois	40
II.2.2.2. Température de pyrolyse	42
II.2.2.3. Autres paramètres	43
II.3. Composition de la fumée d'un point de vue physique	44
III. Les composés phénoliques.....	46
III.1. Généralités.....	46
III.2. Propriétés des phénols simples.....	48
III.2.1. Toxicité.....	48
III.2.2. Actions antimicrobiennes	49
III.2.3. Prévention de l'oxydation	50
III.2.4. Coloration.....	52
III.2.5. Aromatisation	53
III.2.6. Interactions avec la matrice poisson.....	56
III.3. Techniques d'analyse des phénols simples	59
III.3.1. Analyses spécifiques des composés phénoliques.....	59
III.3.1. Analyses des composés volatils	60
III.3.1.1. Extraction des composés volatils	60
III.3.1.1.1. Extraction depuis le produit	60
III.3.1.1.2. Extraction depuis l'espace de tête	62
III.3.1.1.3. Représentativité des extraits aromatiques	64
III.3.1.2. Analyses Chromatographiques.....	65
III.3.1.2.1. Séparation.....	65
III.3.1.2.2. Détection et analyse	69
IV. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	71
IV.1. Caractéristiques générales.....	71
IV.2. Toxicité	72
IV.2.1. Métabolisme et toxicité.....	72
IV.2.2. Évaluation de la toxicité.....	74
IV.2.3. Exposition de l'homme	76
IV.3. Génération des HAP dans la fumée	78
IV.3.1. Mécanismes de production.....	78
IV.3.2. Variations de la contamination des fumées.....	80
IV.4. Législation relative aux HAP dans les aliments.....	82
IV.5. Techniques d'analyse des HAP.....	84
IV.5.1. Extraction et purification	85
IV.5.2. Analyses chromatographiques	90
V. Conclusions - Etude bibliographique	94

Objectifs et stratégie expérimentale	95
Matériels et Méthodes	101
VI. Matériel d'étude	103
VI.1. Produits chimiques et réactifs	103
VI.2. Matières premières	103
VI.2.1. Bois	103
VI.2.2. Filets de poisson	104
VI.2.3. Huiles	104
VI.2.4. Gélatine	105
VI.3. Pilote expérimental : production et piégeage de fumées, fumage de produits.....	105
VI.3.1. Générateur de fumée	106
VI.3.2. Piège à fumée	108
VI.3.3. Cellule de fumage	110
VI.3.4. Conduites et turbines.....	110
VI.3.5. Centrale de mesure	111
VI.3.5.1. Mesures de température et d'hygrométrie	111
VI.3.5.2. Mesure de débit gazeux.....	112
VI.3.5.3. Mesure de tension et d'intensité.....	113
VI.4. Obtention de condensats de fumée expérimentaux.....	113
VI.4.1. Production de fumée : conditions opératoires et planification expérimentale ...	113
VI.4.2. Récupération des fumées piégées	114
VI.4.3. Conservation des échantillons.....	115
VI.5. Fabrication de matrices modèle à base de poisson	115
VI.5.1. Matrices modèles à base de pulpe de poisson.....	115
VI.5.1.1. Obtention de la pulpe	115
VI.5.1.2. Caractérisation de la pulpe	116
VI.5.2. Fabrication des matrices.....	116
VI.5.2.1. Plans de formulation	117
VI.5.2.1.1. Matrices utilisée pour l'étude du fumage réel.....	117
VI.5.2.1.2. Matrices utilisées pour l'étude des phénomènes de sorption.....	118
VI.6. Isolation des protéines sarcoplasmiques de poisson	119
VII. Méthodes d'étude	120
VII.1. Fumage de matrices modèles.....	120
VII.1.1. Conditions opératoires	120
VII.1.1.1. Génération de fumée.....	120
VII.1.1.2. Conditions d'exposition dans le fumoir.....	120
VII.1.2. Exposition des matrices	120
VII.1.3. Conservation des matrices	121
VII.1.1. Analyse des matrices fumées.....	121
VII.2. Mesure de l'adsorption des composés phénoliques à l'état gazeux	121
VII.2.1. Objectif et principe	121
VII.2.2. Mise au point	124
VII.2.3. Mode opératoire première phase : adsorption	124
VII.2.3.1. Préparation de l'échantillon.....	124
VII.2.3.2. Préparation de la référence	124
VII.2.3.3. Enrichissement de l'espace de tête	124

VII.2.3.4. Extraction SPME	125
VII.2.4. Mode opératoire seconde phase : relargage.....	125
VII.2.4.1. Extraction SPME	126
VII.2.5. Différents échantillons analysés	126
VII.2.5.1. Matrices modèles à base de pulpe de poisson	126
VII.2.5.2. Huiles et eau pures.....	126
VII.2.5.3. Huiles en mélange dans l'héxadécane	127
VII.2.5.4. Protéines sarcoplasmiques	127
VII.2.6. Analyse chromatographique	128
VII.3. Dosage des composés phénoliques.....	129
VII.3.1. Extraction-distillation simultanée.....	129
VII.3.1.1. Préparation des échantillons	129
VII.3.1.2. Extraction et concentration de l'échantillon	130
VII.3.1.3. Dérivatisation.....	132
VII.3.1.4. Conservation des extraits.....	132
VII.3.2. Extraction des composés phénoliques par HS-SPME (matrices fumées)	132
VII.3.2.1. Préparation des échantillons	132
VII.3.2.2. Mise au point de l'extraction	133
VII.3.2.3. Conditions d'extraction	133
VII.3.3. Analyse Chromatographique des extraits	133
VII.3.3.1. Analyse des phénols par GC-quadMS-FID	133
VII.3.3.1.1. Appareillage.....	133
VII.3.3.1.2. Conditions opératoires	134
VII.3.3.2. Analyse des phénols par GCxGC-TOFMS.....	136
VII.3.3.2.1. Appareillage.....	136
VII.3.3.2.2. Conditions opératoires	137
VII.4. Dosage des HAP	138
VII.4.1. Extraction.....	138
VII.4.1.1. Echantillons liquides aqueux	138
VII.4.1.2. Echantillons d'huiles	139
VII.4.1.3. Echantillons solides	139
VII.4.1.4. Purification de l'extrait	140
VII.4.1.5. Concentration de l'extrait	141
VII.4.2. Analyse chromatographique	141
VII.4.2.1. Analyse des HAP par GC-MS/MS	141
VII.4.2.1.1. Appareillage.....	141
VII.4.2.1.2. Conditions opératoires	142
VII.5. Analyses statistiques des résultats	145
Résultats et Discussion - Première Partie.....	147
VIII. Mise au point et validation du pilote de production et de piégeage de fumées	149
VIII.1. Mesure des débits de tirage	149
VIII.2. Mesure des températures de pyrolyse	151
VIII.3. Choix d'une solution de rinçage des pièges à fumée	155
VIII.4. Choix du type de piège à fumée utilisé	156

IX. Production des fumées, étude des variables expérimentales du pilote.....	158
IX.1. Variables expérimentales étudiées	158
IX.2. Effets individuels des paramètres sur les variables.....	160
IX.3. Analyses en composantes principales des variables	163
X. Mise en place des dosages des composés cible	165
X.1. Composés phénoliques	165
X.1.1. Analyse en chromatographie monodimensionnelle	165
X.1.1.1. Séparation chromatographique.....	165
X.1.1.2. Calibration linéaire	168
X.1.2. Analyse en chromatographie bidimensionnelle totale.....	170
X.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	172
XI. Influence des paramètres de génération sur la composition des fumées	173
XI.1. Teneur des fumées en analytes.....	173
XI.2. Comparaison des résultats de teneurs en composés phénoliques obtenues en GC-MS-FID et GCxGC-TOFMS	177
XI.3. Analyses comparées des résultats de GC et GCxGC.....	178
XI.4. Effets individuels des paramètres opérationnels sur les teneurs en composés phénoliques des fumées.....	183
XI.5. Interactions entre paramètres opérationnels	187
XI.6. Analyse en composantes principales des teneurs en composés phénoliques.....	189
XI.7. Effets individuels des paramètres opérationnels sur les teneurs en HAP des fumées	193
XI.8. Interactions entre paramètres opérationnels.....	197
XI.9. Analyse en composantes principales des teneurs en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	199
XI.10. Caractérisation globale du générateur de fumée	202
XII. Conclusions - Première partie	207
Résultats et Discussion - Seconde Partie	209
XIII. Influence de la composition du produit sur le processus de fumage réel	211
XIII.1. Composés phénoliques déposés au cours du fumage	211
XIII.1.1. Effets technologiques et de formulation du produit	214
XIII.1.1.1. Durée du fumage	214
XIII.1.1.2. Présence d'huile dans les produits.....	215
XIII.1.1.3. Ajout d'eau à la formulation des matrices.....	217
XIII.2. HAP déposés au cours du fumage	218
XIII.2.1. Contamination initiale des échantillons et teneur dans les matrices	218
XIII.2.2. Effets technologiques et de formulation du produit	220
XIII.2.2.1. Durée de fumage	221
XIII.2.2.2. Présence d'huile dans les produits.....	223
XIII.2.2.3. Ajout d'eau à la formulation des matrices.....	224
XIII.3. Conclusions	225

XIV. Mise au point d'une technique d'évaluation des interactions gaz/solide	226
XIV.1. Nécessité d'une nouvelle approche scientifique	226
XIV.2. Mise en place et validation de la méthode	226
XIV.2.1. Choix d'une méthode d'analyse	227
XIV.2.2. Choix du matériel utilisé	229
XIV.2.2.1. Génération de l'espace de tête enrichi	229
XIV.2.2.2. Exposition des échantillons.....	231
XIV.2.3. Conditions de génération des espaces de tête	233
XIV.2.3.1. Température	233
XIV.2.3.2. Solution d'enrichissement.....	233
XIV.2.3.3. Temps d'équilibrage de l'espace de tête	235
XIV.2.3.4. Conditions d'extraction SPME	236
XIV.2.3.5. Calibration linéaire.....	237
XIV.3. Conclusions	238
XV. Influence de la composition d'une matrice alimentaire sur la sorption de composés phénoliques à l'état gazeux	239
XV.1. Adsorption	239
XV.2. Relargage	245
XV.1. Conclusions	248
XVI. Adsorption des composés phénoliques par les constituants de la chair de poisson	250
XVI.1. Fractions liquides	250
XVI.1.1. Huiles en mélange dans l'héxadécane.....	250
XVI.1.2. Huiles et eau pures	252
XVI.1.2.1. Huiles	252
XVI.1.2.2. Eau.....	253
XVI.1.2.3. Régression des courbes de piégeage	254
XVI.1.2.4. Affinité des composés phénoliques pour l'eau et les huiles	259
XVI.2. Protéines sarcoplasmiques	262
XVI.3. Conclusions	268
XVII. Conclusions - Seconde partie	269
Synthèse et Perspectives	271
Références bibliographiques	277
Liste des figures	303
Liste des tableaux	309
Annexes	315

Introduction

Le fumage des aliments en général, et du poisson en particulier, est un procédé de transformation qui a paradoxalement peu évolué en regard de sa très longue histoire. Le fumage artisanal tel qu'il est pratiqué aujourd'hui est en vérité très semblable à ce qui était réalisé déjà en des temps préhistoriques. Bien que le procédé technique se soit modernisé, industrialisé et ait changé par bien des aspects, c'est principalement le but du fumage qui a connu des changements déterminants. C'est dans l'œil et dans l'assiette du consommateur que le produit fumé a surtout changé. A l'origine produit de longue conservation, les poissons fumés sont au fil du temps devenus des produits de luxe, puis des produits courants à connotation festive, jusqu'à devenir depuis peu des produits de consommation quotidienne.

Les attentes des consommateurs, les besoins des producteurs, les exigences des législateurs et les impératifs des contrôleurs vis-à-vis du produit de poisson fumé ont changé avec l'évolution des habitudes de consommation. Du point de vue du consommateur, c'est principalement une demande de propriétés organoleptiques typiques qui est prépondérante. Par ailleurs, tandis que les autorités sanitaires se doivent de prendre en compte l'augmentation des quantités consommées pour y ajuster les réglementations à visée de santé publique, les industriels doivent pouvoir répondre à la fois aux contraintes légales et aux augmentations des volumes de production. Enfin, les organismes de contrôle ont en charge de faire évoluer les outils nécessaires à la bonne connaissance du produit et du procédé.

A l'interface de ces enjeux se situent d'une part le produit à fumer et d'autre part l'opération de fumage. C'est au cours du fumage que l'aliment acquerra les caractéristiques organoleptiques, technologiques et toxicologiques propres aux fumaisons. Le processus de fumage consistant principalement en une charge du produit en composés présents dans la fumée, de nombreuses études ont visé à mettre en évidence le rôle des différentes fractions de celle-ci. C'est ainsi que les hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été décrits comme la principale contamination des produits de fumaison. Etant donné leur caractère génotoxique et carcinogène avéré, une réglementation limitant leur présence admissible dans les aliments fumés a pu être instaurée. A l'inverse, les composés phénoliques volatils ont été présentés comme étant la famille chimique déterminante pour l'ensemble des propriétés souhaitables chez un produit fumé.

Une grande partie de la qualité du produit fini va donc être déterminée pendant la phase d'exposition de l'aliment à une fumée, puisque cette étape de production conditionnera ses teneurs finales en composés désirables et indésirables.

Cependant, alors que les propriétés des différents constituants de la fumée sont bien connues, ni les mécanismes de leur production en conditions industrielles, ni la façon dont ils passent de la fumée au produit ne sont parfaitement compris à l'heure actuelle. Ainsi, même si la composition de la fumée peut être précisément connue, celle-ci ne peut pas toujours être prédéterminée. Qui plus est, les interactions pouvant exister entre le produit et la fumée ne sont pas très bien connues, alors qu'elles pourraient être dominantes. En effet, les aliments traités par fumage étant particulièrement variés, le processus de fumage est réalisé sur des produits de compositions très différentes. La composition du produit comme étant directement un paramètre du fumage pourrait en fait être négligée à l'heure actuelle.

Ces travaux s'inscrivent dans la volonté des différents acteurs du secteur de tendre à des produits fumés de meilleures qualités -organoleptique, technique et sanitaire- satisfaisant aux critères toujours plus exigeants de chacun. L'objectif en est d'apporter des éléments de compréhension et de maîtrise relatifs à :

- ♦ la production industrielle de fumée alimentaire,
- ♦ le processus d'enrichissement du produit en composés issus de la fumée.

L'utilisation d'un pilote expérimental à taille industrielle permettra d'appréhender la génération de la fumée et le fumage de matrices alimentaires dans des conditions identiques à celles qui sont employées couramment par les industriels de la filière halieutique. En parallèle, l'étude des phénomènes de sorption se déroulant au cours du fumage sera réalisée dans des environnements modèles adaptés. Celle-ci servira à fournir des éléments de compréhension nouveaux relatifs aux phénomènes régissant l'enrichissement de produits en composés clefs de la fumée.

Les résultats attendus permettront ainsi de définir des conditions de production des aliments fumés plus rationnelles, en prenant en compte un maximum de facteurs déterminants. Ils pourront par ailleurs constituer une base scientifique à l'investigation détaillée de la physico-chimie du fumage.

Étude bibliographique

I. Le fumage

I.1. Généralités

I.1.1. Aspects historiques

Le fumage fait partie des techniques de transformation des aliments les plus anciennes utilisées par l'homme. En estimer l'âge exact est donc impossible. Cependant, des traces archéologiques (restes alimentaires principalement) permettent de penser que le fumage était déjà utilisé aux environs de -90.000 ans.

Il ne fait aucun doute que le fumage est apparu et s'est développé en tant que procédé de conservation des aliments et en particulier du poisson. En effet, si celui-ci était alors une des bases du régime alimentaire, il présentait déjà l'inconvénient de s'altérer rapidement. Il n'est donc pas étonnant que les trois techniques de conservation ancestrales (à savoir : séchage, salage et fumage) aient toujours plus ou moins été utilisées conjointement sur cette matière première, afin d'en retarder l'altération.

En dépit de sa très longue histoire, le fumage tel que nous le connaissons aujourd'hui n'est pas fondamentalement différent de ce qu'il était à l'origine. Il s'agit d'une exposition du produit alimentaire à de la fumée issue de la pyrolyse de matériel d'origine végétale. Le produit se « charge » alors en composés de la fumée et acquiert de nouvelles propriétés, principalement techniques (durée de conservation plus longue) et organoleptiques (couleur et flaveur « fumé »). Les principales évolutions résident dans une maîtrise accrue du procédé par une meilleure connaissance des phénomènes impliqués et une mise en œuvre à plus grande échelle par des procédés industriels modernes.

C'est en particulier dans les effets recherchés que le fumage « moderne » tel que nous le connaissons aujourd'hui et le fumage « ancestral » diffèrent. En effet, avec le développement des techniques de préparation (mesures d'hygiène, chaîne du froid, etc.) et de conservation (appertisation, congélation, ionisation, conservation sous vide, biopréservation, etc.), le besoin de préservation du produit par le fumage a disparu. Il est devenu principalement un moyen de valoriser le produit en y apportant des caractéristiques organoleptiques spécifiques appréciées du consommateur.

I.1.2. Aspects économiques

La simplicité du procédé de fumage le rend applicable à de très nombreuses matières premières. Ainsi on retrouve selon les régions et les spécificités culturelles une grande

diversité de produits de fumage allant du filet de poisson fumé jusqu'au thé fumé, en passant par toute une variété de viandes, produits de charcuterie dérivés, fromages, coquillages et œufs de poisson. Sur le marché européen en général et français en particulier, ce sont les produits de poissons fumés qui occupent la plus grande part de la consommation en fumaisons.

Les poissons fumés consommés sont principalement disponibles et achetés en grande et moyenne surface « traditionnelle » (par opposition aux « Hard Discount » et « Freeze Center ») au rayon traiteur réfrigéré, sous forme finement tranchée et emballée sous vide (FranceAgriMer, 2010). C'est un segment de marché en hausse constante depuis de nombreuses années tant en volume (+5,3% entre 2008 et 2009) qu'en valeur (+7,9% entre 2008 et 2009). Cette croissance est portée principalement par l'image positive des produits de la mer (d'autant plus que la forte association entre « poisson » et « acides gras essentiels » a été largement promue) et par le changement des habitudes de consommation. Autrefois réservé à la consommation festive, les produits de poisson fumé sont à présent disponibles et consommés toute l'année par l'ensemble des consommateurs de produits de la mer. Cette banalisation a été rendue possible par l'augmentation des productions de matière première (développement de l'aquaculture) qui a donné lieu à une diversification de la gamme en termes de prix, de marques et de produits proposés.

Il est important de noter que parmi les espèces principalement consommées en France (saumon, truite, hareng, haddock et maquereau), c'est le saumon qui représente la part prépondérante (70% des volumes achetés et 80% des valeurs dépensées). En matière d'origine, les saumons d'élevage sont encore majoritaires et ce sont les saumons issus de Norvège qui occupent le gros du marché, suivis de ceux d'Écosse et d'Irlande.

Le segment du saumon fumé représente donc un marché très important avec plus de 30.000 tonnes vendues en France en 2009, pour plus de 620.000 k€. Sa croissance ne semble pas destinée à s'inverser dans les années à venir puisqu'elle a été à peine ralentie par les contextes économiques difficiles récents (Xerfi, 2010). Ce secteur attire ainsi de plus en plus d'acteurs, devenant toujours plus concurrentiel. Il est par conséquent important pour les industriels de garantir une qualité optimale pour leurs produits, pour pouvoir résister à la pression de la concurrence.

Cependant, il ne faut pas oublier que l'augmentation de la consommation de poissons fumés par des consommateurs de tous les âges et tout au long de l'année augmente aussi l'exposition de ceux-ci à d'éventuels contaminants du produit. D'autant plus que cette consommation ne se limite pas à la consommation « directe » présentées par ces statistiques.

Il existe aussi une part « invisible » puisque les poissons fumés sont de plus en plus utilisés comme produits intermédiaires d'aliments élaborés, dont la consommation est également en forte hausse (par exemples, salades ou sandwich réfrigérés prêts à consommer).

I.2. La matière première fumée : La chair de poisson

La chair prélevée sur les poissons pour être consommée est constituée principalement des muscles du tronc de l'animal. Ceux-ci pouvant représenter entre 35-40% (lieu noir, cabillaud, etc.) et 65-70% (hareng, anchois, etc.) de l'animal entier en fonction des espèces. Parmi ces muscles, il existe trois types distincts.

- Les grands latéraux, qui sont des muscles en forme de fuseau disposés de part et d'autre de la colonne vertébrale. Les espèces pélagiques (vivant en haute mer) qui doivent fournir de plus gros efforts ont des grands latéraux très irrigués qui leur donne une teinte rouge sombre, comme celle du thon. A l'inverse, les espèces côtières (démersales) ont une chair plus claire, voire blanche. Certaines espèces de poissons accumulent de grandes quantités de lipides dans ce type de muscles.

- Les muscles rouges sont caractéristiques des téléostéens (poissons osseux). Ils ne doivent pas être confondus avec les grands latéraux d'espèces « à chair rouge ». Ils sont situés entre la peau et les grands latéraux, au niveau de la ligne médiane. Comme ils participent à la nage, ils sont fortement vascularisés, et plus développés chez les pélagiques. Enfin, chez les poissons gras ils peuvent constituer un lieu de stockage privilégié des graisses.

- Les muscles commandant aux nageoires n'ont aucun rôle dans la propulsion de l'animal. Ils servent à stabiliser l'animal et à l'orienter dans les trois dimensions lors de ses déplacements. Ils ont une structure en toron et sont situés principalement en position ventrale et dorsale.

I.2.1. Le filet de poisson : un muscle strié

I.2.1.1. Structure du muscle strié

Les muscles striés de poissons se distinguent de ceux des mammifères principalement par leur grande abondance (par rapport à la masse totale de l'individu, jusqu'à 70% pour des poissons comme le hareng ou l'anchois) et par leur organisation en métamères (segments de structure similaire disposés les uns à la suite des autres).

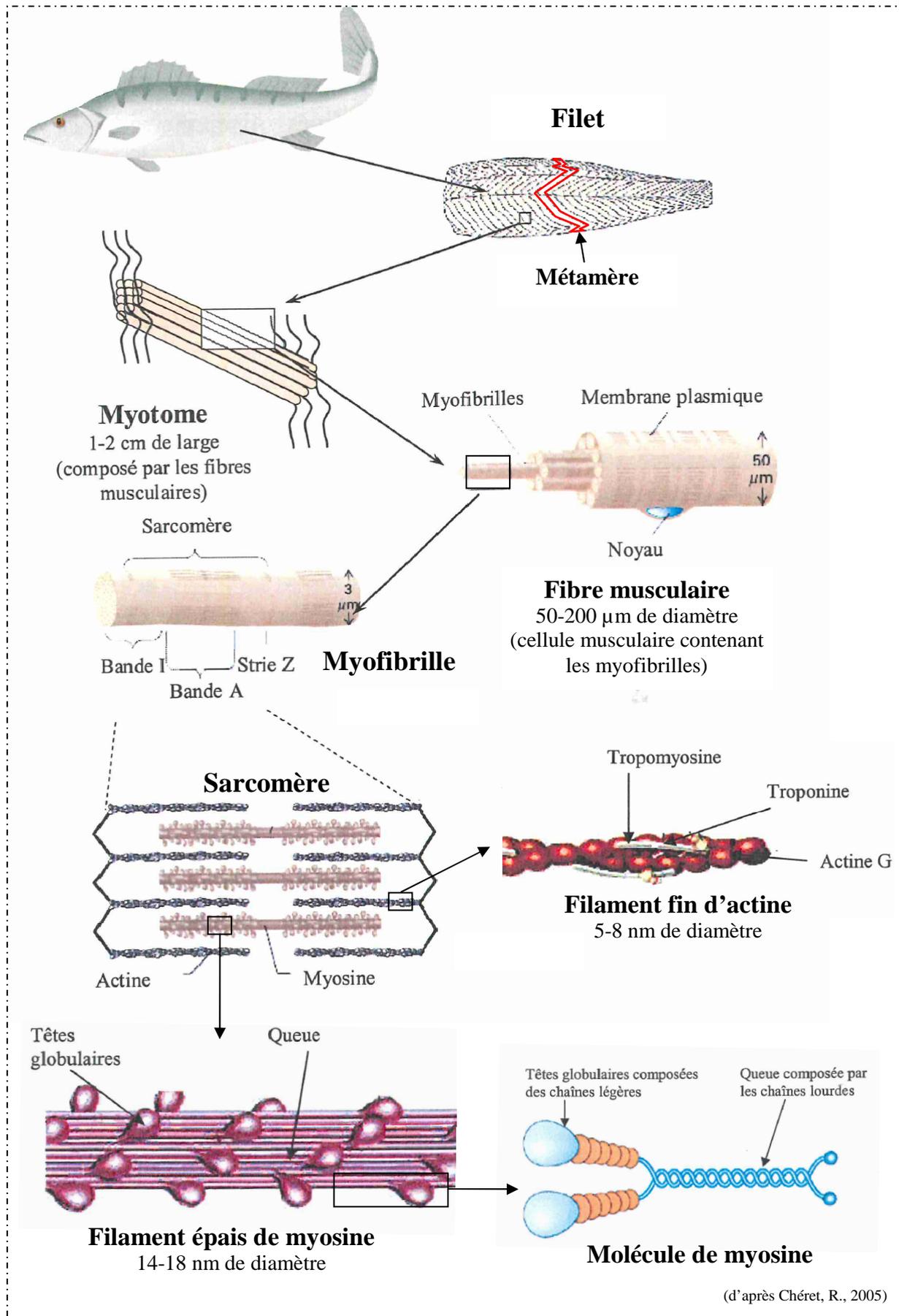


Figure 1 : Représentation schématique des structures du muscle de poisson

Pour le reste, on retrouve chez les poissons les mêmes caractères musculaires que chez les mammifères (Figure 1). Le muscle est donc constitué d'un ensemble de cellules musculaires (ou fibres musculaires) parallèles regroupées en faisceaux (également parallèles entre eux) par des enveloppes de tissu conjonctif à base de collagène. Les fibres musculaires sont de grandes cellules de forme allongée, plurinucléées et qui contiennent les organites protéiques responsables du mouvement de contraction : les myofibrilles. Celles-ci sont constituées d'associations de protéines avec une conformation où alternent des stries dites claires et foncées qui définissent le sarcomère. Celui-ci peut être considéré comme l'unité de base des myofibrilles, et par extension comme celle du muscle tout entier. L'alignement des sarcomères et le maintien de la structure des fibrilles est assuré par un réseau de soutien cytosquelettique. C'est de cet alignement régulier des sarcomères que provient l'aspect « strié » du muscle.

I.2.1.2. Composition du muscle strié

I.2.1.2.1. Composition globale et sources de sa variabilité

De nombreux facteurs déterminent la composition du filet de poisson. Celle-ci varie donc grandement à cause d'éléments pouvant être regroupés en trois grands groupes.

- Les facteurs d'origine biologique qui regroupent à la fois la variabilité inter-espèce (on peut citer évidemment la différence de teneur en lipide des filets de poissons maigres et de poissons gras) et des facteurs individuels comme l'âge, le sexe, le cycle sexuel ou l'état physiologique (Geri, G. et al., 1995 ; Martin, J.F. et al., 1995 ; Fauconneau, B. et al., 1995 ; Fauconneau, B. & Laroche, M., 1996 ; Sérot, T. et al., 2001a ; Sérot, T. et al., 2002).

- Les facteurs environnementaux représentent tout ce qui dépend du milieu de vie de l'animal comme la nourriture disponible (et terme de qualité et d'abondance), le milieu de vie ou encore la saison de capture (Fauconneau, B. et al., 1993 ; Orban, E. et al., 2000 ; Moreira, A.B., et al., 2001).

- Enfin, les facteurs technologiques comprennent à la fois les techniques de pêche, d'abattage et de transformation, qui pourront avoir une influence non négligeable.

L'ensemble de ces facteurs va moduler la composition du filet de poisson non seulement en terme de rapport entre les différentes fractions (par exemple, les sardines atlantique qui ne comportent que 2% de lipides au printemps, contre 8,5% en automne) mais aussi en terme de composition de chacune d'elles (ainsi, on observe chez le hareng de plus fortes proportions en

acides héxa et pentaénoïques dans les graisses des individus jeunes). On peut noter aussi que l'environnement joue un rôle déterminant pour les différences apparaissant entre les poissons sauvages et poissons d'élevage comme c'est le cas chez les saumons : ceux issus de l'élevage sont en moyenne plus gras que leurs équivalents sauvages. De plus, chez les poissons d'élevage le choix de l'alimentation va grandement influencer la teneur et la composition de la fraction lipidique de la chair (Sheehan, E.M. et al., 1996 ; Bencze Røra, A.M. et al., 2005 ; Nordgarden, U. et al., 2002).

Il est donc délicat de parler de manière générale de « la » composition biochimique du filet de poisson. Le Tableau 1 présente les teneurs en différentes fractions généralement observées chez des espèces particulières, ainsi que les extrêmes pouvant exister.

Tableau 1 : Composition biochimique de la chair de quelques espèces de poissons, moyenne générale est variations observables, exprimée en g pour 100 g de chair

Espèce	Eau	Protéine	Lipide	Cendre
<i>Poissons marins</i>				
Saumon (a)	64	21	13,5	1,5
Sardine (a)	71	19	8,5	1,5
Thon (a)	71	24	3,5	1,5
Merlu (a)	79	19	0,9	1,1
Cabillaud (a)	81	18	traces	1,0
<i>Poisson d'eau douce</i>				
Truite (a)	66	21	11,5	1,5
Carpe (a)	74	16	9,0	1,0
Poisson chat (b)	79	15	4,5	1,5
Perche (a)	78	19	2,0	1,0
Brochet (a)	80	18	0,5	1,5
Moyenne (c)	74,8	19,0	5,0	1,2
Variations normales (c)	66 - 81	16 - 21	0,2 - 25	1,2 - 1,5
Variations extrêmes (c)	28 - 96	6 - 28	0,1 - 67	0,4 - 1,5

(d'après (a)-Sainclivier, M., 1985a ; (b)-Mustafa, F.A. & Medeiros, D.M.,1987 ; (c)-Stansby, M.E.,1962, cités par Hallier, A., 2004)

1.2.1.2.2. Les protéines

1.2.1.2.2.1. Myofibrilles

Les stries du muscle sont des alternances de bandes claires et sombres résultant de la superposition des différents types de filaments protéiques responsables de la contraction musculaire (Figure 1).

Les filaments épais (de diamètre 14 à 18 nm) sont constitués de molécules de myosine organisées en faisceaux grâce à leurs queues composées de chaînes lourdes. Les têtes

globulaires sont disposées en spirale à l'extérieur du filament et font face aux filaments fins avec lesquels ils sont en contact.

Les filaments fins (de diamètre 5 à 8 nm) sont un assemblage de plusieurs protéines différentes. Des molécules d'actine globulaire (actine G) sont associées en filaments hélicoïdaux où sont fixées deux autres protéines : la tropomyosine et la troponine qui jouent un rôle de régulation des interactions actine/myosine. Les filaments fins assurent aussi la solidarité entre sarcomères par attachement au niveau de la strie Z.

Au niveau du contact des filaments fins et épais, les interactions entre les actines G et les têtes de myosines rendent possible le coulisement actif des uns par rapport aux autres. Ce mouvement induit un raccourcissement du sarcomère, c'est la base de la contraction musculaire.

En plus de ces protéines motrices, les myofibrilles contiennent des protéines du cytosquelette comme la titine et la nébuline qui ont un rôle de soutien et de cohésion des sarcomères. D'autres protéines du cytosquelette sont retrouvées aux différentes connections des myofibrilles (notamment la desmine, au niveau de la strie Z).

1.2.1.2.2. Protéines sarcoplasmiques

Les protéines dites sarcoplasmiques représentent la fraction protéique myogène intracellulaires soluble. Il s'agit de l'ensemble des protéines présentes dans le sarcoplasme des cellules du muscle, à l'exception des protéines myofibrillaires vues précédemment (incluant protéines de contraction, de régulation et de soutien).

Bien que présentant une grande diversité, ces protéines ont de nombreuses propriétés communes. Elles sont principalement globulaires, de bas poids moléculaire, de faible viscosité et solubles dans les solutions faiblement ioniques. Elles peuvent représenter jusqu'à 22% des protéines totales et se répartissent en quatre classes :

- protéines nucléaires (nucléoprotéines et lipoprotéines) ;
- protéines mitochondriales (enzymes du cycle des acides tricarboxyliques) ;
- protéines microsomales (réticulum sarcoplasmique et lysosomes) ;
- protéines hyaloplasmiques (enzymes de glycolyse et glycogénèse, myoglobine, etc.).

La plus grande part de ces protéines (jusqu'à 30% des protéines sarcoplasmiques) constitue l'ensemble des enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire et notamment les réactions de glycogénolyse et du cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs).

La fraction des protéines sarcoplasmiques la plus déterminante pour la qualité du produit fini de filet de poisson est probablement l'ensemble des enzymes protéolytiques qui jouent un rôle dans l'altération du filet après abattage. On distingue deux systèmes principaux de protéases : le système calpaïnes-calpastatine et le système cathepsinse-cystatine.

Les calpaïnes constituent une famille de protéases à cystéine (un résidu cystéine est présent sur leur site actif) calcium-dépendantes présentes dans le cytoplasme. Leurs isoformes contiennent deux sous-unités pour un poids moléculaire total de 90 à 110 kDa. On en dénombre environ 14 différentes qui se répartissent entre les différents types cellulaires, la m-calpaïne et la μ -calpaïne étant les seules ubiquitaires. Ces deux calpaïnes tirent leur nom de la quantité de calcium dans le milieu nécessaire à leur activation, respectivement environ 1 mM et 3 μ M (Goll, D.E. et al., 1992). En plus de la régulation due au calcium environnant, l'activité des calpaïnes est limitée par un inhibiteur spécifique réversible intracellulaire : une protéine, la calpastatine

Les cathepsines font parties des enzymes lysosomales. Elles ne sont pas libres dans le cytosol cellulaire mais localisées dans des petites organites sphériques constituées d'une couche membranaire et présents dans la plupart des cellules animales : les lysosomes (Goll, D.E. et al., 1983). Il s'agit d'endopeptidases de poids moléculaire compris entre 20 et 50 kDa dont il existe plusieurs types. Quatre d'entre elles sont particulièrement impliquées dans la dégradation du muscle *post-mortem* : les cathepsines B, L et H qui sont des protéases à cystéines, auxquelles s'ajoute la cathepsine D, une protéase à acide aspartique. Leur activité est régulée partiellement par l'action des cystatines qui empêchent notamment la protéolyse de la myosine et donc le ramollissement de la chair (Chen, G.H. et al., 2001).

Ces deux systèmes enzymatiques ont un rôle déterminant dans l'évolution et l'altération du filet après abattage. En effet, leurs différentes protéases vont s'attaquer, spécifiquement ou non, aux constituants des myofibrilles, notamment la myosine et l'actine (Mastumoto, T. et al., 1983), mais aussi la desmine au niveau de la strie Z, la nébuline, la connectine, etc.

Parmi les autres protéines sarcoplasmiques, on peut citer la myoglobine qui est également présente dans le muscle de poisson. Elle joue principalement un rôle de fixation de l'oxygène à partir de l'oxyhémoglobine des hématies du système sanguin. Elle permet de constituer une « réserve » d'oxygène nécessaire au métabolisme.

Enfin, cette fraction comporte également un ensemble d'albumines et de globulines aux rôles divers (transports métaboliques, maintien de la pression oncotique, etc.) qui sont différenciables selon leurs solubilités dans l'eau et le sulfate d'ammonium.

L'isolation de l'ensemble des protéines sarcoplasmiques est facilement réalisée par pressage du muscle et extraction en solutions faiblement ionique (Sainclivier, M., 1985a).

1.2.1.2.2.3. Protéines extracellulaires

Les protéines extracellulaires (ou protéines du stroma) sont des protéines ayant un rôle de soutien. Il s'agit principalement de molécules fibreuses de grande taille, insolubles dans les solutions salines. Elles participent à la formation du tissu conjonctif et de la substance fondamentale. Contrairement aux mammifères, les poissons ont des muscles relativement pauvres en protéines extracellulaires (environ 3% pour les poissons osseux, contre 17% chez les mammifères), le tissu conjonctif représentant principalement des membranes qui entourent les muscles. Les espèces pélagiques se déplaçant beaucoup ont des teneurs en tissu conjonctif encore plus réduites.

Le principal constituant du tissu conjonctif est le collagène, qui peut en représenter 80%. Son rôle est donc déterminant pour le maintien de l'intégrité des chairs et de leur texture. C'est aussi la protéine la plus abondante dans le poisson puisqu'elle participe aussi à la formation des tendons, cartilages, ligaments et diverses membranes comme les myoseptes qui délimitent les myotomes. Il s'agit d'une protéine fibreuse qui est formée à partir de trois chaînes polypeptidiques assemblées par des liaisons fortes et faibles agencées sous forme de fibres à triple hélice. Avec l'âge, le nombre de liaisons inter et intra-fibres augmente, donnant lieu à une structure quaternaire réticulée responsable d'une perte de tendreté dans les viandes.

Les autres protéines du tissu conjonctif sont principalement l'élastine et des protéines mineures comme la connectine. Leur rôle principal est d'apporter les propriétés d'élasticité nécessaires au tissu conjonctif dont le collagène est dépourvu.

Enfin, hors de la partie structurée du tissu conjonctif se trouve la substance fondamentale, un dérivé du plasma contenant principalement des mucoprotéines globulaires (protéines associées à des mucopolysaccharides comme l'acide hyaluronique) et des dérivés de collagène et d'élastine de petite taille (protocollagène et tropoélastine).

L'ensemble de ces protéines est déterminant pour la qualité du filet de poisson. En effet, des faiblesses du tissu conjonctif peuvent entraîner des phénomènes de clivage du filet, principalement entre les myomères.

1.2.1.2.3. L'eau

Quantitativement parlant, l'eau est le plus important constituant de la chair de poisson et représente environ 75 à 80% du filet frais. Elle revêt une grande importance du fait qu'elle est en grande partie responsable de la texture de la chair et de sa grande altérabilité. On distingue trois grand « types d'eau » en fonction de leur localisation et de leurs interactions avec les autres composants du muscle.

- L'eau dite libre représente la plus grande partie de l'eau du filet de poisson. Elle est localisée principalement entre les fibres musculaires et les couches de tissu conjonctif. Bien que sa mobilité puisse être réduite par son environnement, elle est capable de migrer à l'intérieur du muscle (par exemple lors du séchage de filets).

- L'eau de constitution représente la part de l'eau qui participe à une structure moléculaire et dont la mobilité est limitée par leur interaction (principalement avec les protéines myofibrillaires). Cependant, des modifications d'hydratation ou de force ionique (comme celles induites par le salage) peuvent la libérer pour qu'elle soit mise en mouvement. Elle est parfois appelée « eau vitale » car son élimination entraîne la mort cellulaire.

- Enfin, l'eau d'absorption qui est intimement liée à d'autres constituants (principalement protéiques) par des liaisons hydrophiles et polaires, ou alors présente en films très minces dans les structures moléculaires feuilletés.

La répartition de l'eau (tous types confondus) du muscle frais est la suivante :

- 70% dans les myofibrilles ;
- 20% dans le sarcoplasme ;
- 10% dans le tissu conjonctif.

Les protéines sarcoplasmiques ne jouant qu'un rôle très marginal dans la rétention d'eau (environ 3% de l'eau retenue), ce sont bien les myofibrilles qui jouent le rôle majeur des interactions vis-à-vis de l'eau.

1.2.1.2.4. Les lipides

Les lipides des poissons représentent un point clef dans la qualité de l'aliment final pour deux raisons principales. D'une part, les acides gras constituent une importante famille de

précurseurs aromatiques qui contribuent directement à l'élaboration de la richesse aromatique des produits de poisson. D'autre part, les acides gras présents dans la chair de poissons sont très importants du point de vue de la nutrition humaine car ils apportent dans le régime alimentaire des acides gras essentiels $\omega 3$ (principalement l'acide docosahéxaénoïque (C22:6 $\omega 3$) et l'acide eicosapentaénoïque (C20:5 $\omega 3$)). Ceux-ci sont très importants pour leurs implications dans la prévention de nombreuses maladies cardiovasculaires, cancéreuses et inflammatoires (Rose, D.P. & Connolly, J.M., 1999 ; Kamal-Eldin, A. & Yanishlieva, N.V., 2002).

Il existe chez les poissons de nombreux sites de dépôt et de stockage des lipides, principalement le foie, le tissu adipeux périvercéral, le tissu adipeux sous-cutané, la peau et le muscle (Sheridan, M.A., 1988). L'abondance des dépôts dans ces différents sites dépend principalement de l'espèce considérée. Ainsi, l'absence (ou faible taux) de graisse dans les muscles de poissons maigres s'explique en partie par un très fort stockage au niveau du foie (jusqu'à 70g de lipides pour 100g de tissu).

C'est donc surtout chez les poissons gras que l'on retrouve des lipides au niveau musculaire, principalement sous forme de globules extracellulaires, qui sont plus abondants sous la peau et au niveau des myoseptes où ils peuvent former des films fins. Il est à noter que chez un même poisson, la teneur en lipides du tissu musculaire dépend du type de muscle considéré. Par exemple chez le maquereau le muscle rouge peut atteindre 19,6% de lipides alors que le muscle blanc ne dépasse pas les 4% (Body, D.R. & Vlieg, P., 1989).

Il est aussi important de préciser que les lipides retrouvés dans le muscle de poissons maigres sont très riches en phospholipides (jusqu'à 65%) liés à des protéines. En effet, de par l'absence d'inclusions lipidiques, la part des membranes cellulaires (bicouche phospholipidique) est prépondérante sur la totalité des lipides musculaires. A l'inverse, la fraction lipidique du muscle de poisson gras est constituée principalement de lipides neutres, essentiellement des triglycérides. On retrouve également des mono et diglycérides issus de l'hydrolyse des triglycérides, mais en très faible proportion. Les triglycérides de poisson sont de type mixtes, avec des répartitions variées des acides gras, donnant lieu à la présence de triglycérides très hétérogènes.

En dépit de la grande variabilité pouvant exister dans la composition de la matière grasse de la chair de poisson (voir I.2.1.2.1, p.11), certaines caractéristiques sont communes à l'ensemble des espèces (Sainclivier, M., 1985a):

- Les acides gras saturés (AGS) représentent entre 15 et 40% des lipides totaux, le plus abondant étant l'acide palmitique (C16:0) qui peut constituer 10 à 30% de la totalité des acides gras. Les acides myristique (C14:0) et stéarique (C18:0) sont également présents, mais en quantité moindre (respectivement 4-6% et 1-5%).

- Les acides gras mono-insaturés (AGMI) représentent une portion allant de 20 à 60% des lipides totaux. A part l'acide oléique (C18:1 ω 9) qui est le plus abondant chez presque toutes les espèces, les acides palmitoléique (C16:1 ω 7), gadoléique (C20:1 ω 9) et érucique (C22:1 ω 9) sont les plus répandus.

- Les acides gras polyinsaturés (AGPI) constituent 20 à 60% des lipides totaux. L'acide docosahéxaénoïque (C22:6 ω 3) étant prédominant chez la plupart des espèces, suivi des acides eicosapentaénoïque (C20:5 ω 3) et arachidonique (C20:4 ω 6).

Tableau 2 : Pourcentages moyens des principaux acides gras présents dans la chair de poissons

Acides gras	Silure glane (a)	Carpe commune (b)	Saumon Atlantique (b)	Capelan Atlantique (b)
C14:0	4,3	2,3	1,5	4,8
C16:0	18,9	19,6	14,2	22,1
C17:0	0,6	1,6	-	-
C18:0	3,6	4,5	5,3	1,8
Total AGS	27,4	36,3	24,4	28,7
C16:1 ω 7	9,0	9,4	5,5	8,5
C18:1 ω 9	27,8	23,4	12,6	26,0
C20:1 ω 9	4,2	0,8	0,8	2,3
C22:1	2,9	-	0,1	2,0
Total AGMI	43,9	35,6	26,5	38,8
C18:2 ω 6	6,5	3,9	3,1	1,4
C20:4 ω 6	0,8	3,5	8,0	-
C22:4 ω 6	0,2	2,0	1,3	-
C22:5 ω 6	0,9	-	2,0	-
Total AGPI ω6	8,4	9,4	15,8	1,4
C18:3 ω 3	1,5	6,0	2,2	-
C18:4 ω 3	1,0	0,2	-	1,4
C20:5 ω 3	4,3	6,0	4,6	13,8
C22:5 ω 3	0,9	1,2	3,3	-
C22:6 ω 3	8,5	5,1	15,4	11,3
Total AGPI ω3	16,2	18,5	27,2	26,5
Rapport ω3 / ω6	1,9	2,0	1,7	18,9
Total AGPI	24,6	27,9	45,3	26,5

(d'après (a)-Martin, J.F., 1995 ; (b)-Henderson, R.J. & Tocher, D.R., 1987, cités par Hallier, A., 2004)

1.2.1.2.5. Les glucides

Les glucides sont très peu nombreux et abondants dans la chair de poisson. Celui qui est principalement rencontré est le glycogène (un polymère de glucose) qui joue le rôle de réserve énergétique pour les cellules, mais celui-ci est rapidement éliminé du muscle après la capture de l'animal.

1.2.1.2.6. Les minéraux

Les poissons d'eau douce sont moins riches en minéraux que les poissons d'eau de mer qui ont un environnement riche en ions. Les principaux éléments présents dans la chair de poisson sont le soufre, le fer, le cuivre et l'iode. Ceux-ci sont principalement combinés aux composants organiques (Causeret, J., 1962).

I.3. Fumage de filets de poisson

Le fumage au sens strict ne concerne que l'exposition du produit à la fumée. Cependant, les produits fumés existant sur notre marché sont presque exclusivement des produits ayant subi préalablement un salage et un séchage. Le terme « saurissage » englobe les étapes de salage, séchage et fumage, il serait donc plus adapté pour désigner le procédé de fabrication présenté. Nous conserverons cependant la dénomination générique de « fumage » puisque c'est celle qui est d'usage.

Bien qu'il soit possible de fumer les poissons entiers, le produit à fumer industriellement se présente la plupart du temps sous la forme de filets frais dont les dimensions et le poids varient beaucoup d'une espèce à l'autre. Dans le cas du saumon par exemple, les filets peuvent mesurer de 30 à 60 cm de long pour un poids de 600 à 1700 g, principalement en fonction de la maturité de l'animal.

I.3.1. Salage

L'objectif technologique principal du salage est la réduction de l'activité de l'eau (A_w) dans le produit. Celle-ci a une action bactériostatique (inhibition de croissance bactérienne) sur les flores d'altération qui permet une plus longue conservation du produit fini (Goulas, A.E. & Kontaminas, M.G., 2005). Par ailleurs, le sel a des effets sur les qualités

organoleptiques du produit en apportant une saveur salée, en raffermissant les chairs et en empêchant leur décoloration

On distingue plusieurs types de salage, qui diffèrent par la façon dont le chlorure de sodium sera mis en contact avec le filet de poisson. Cependant, nous verrons que dans tous les cas (salage à sec, en saumure ou par injection), la pénétration du sel dans le filet se fait par osmose au niveau du contact d'une saumure (solution concentrée en sel) et du filet (Sigurgisladottir, S. et al., 2000 ; Gallart-Jornet, L. et al., 2007).

Pour des produits industriels, la valeur cible de teneur en sel à l'issue du salage se situe entre 3 et 3,5% (Knockaert, C., 1990).

I.3.1.1. Salage à sec

Dans le cas du salage à sec, les filets sont disposés côté peau sur un film de sel sec. Le dessus du filet est ensuite recouvert de gros sel, parfois après avoir été scarifié pour accélérer le processus.

Dans un premier temps (phase de latence) une partie de l'eau du produit migre vers le sel qui s'y dissout pour former une saumure de surface saturée. La pénétration du sel dissout se fait de façon rapide, car la saumure ne s'appauvrit pas. En effet, au fur et à mesure que la fraction dissoute diffuse dans le filet, les cristaux de sel encore en surface se dissolvent pour maintenir la saturation du milieu aqueux. La saumure de surface est donc en permanence très riche en sel.

Le relargage d'eau cause une perte de poids du filet, jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint. Il en résulte avant tout un raffermissement des chairs, mais il est possible de constater d'autres effets. Notamment, dans le cas d'une prise en sel trop rapide, couplée à une forte déshydratation, il est possible de faire coaguler des protéines, donnant lieu à des « brûlures ». Ce phénomène va retarder la migration du sel vers le cœur du produit et entraîner un aspect « huilé » indésirable.

C'est pour cela que l'utilisation de gros sel est recommandée, car il se répartit moins uniformément, limitant la déshydratation et ces altérations de qualité du produit. De plus, il permet un meilleur écoulement de la saumure, garantissant moins de stagnation et une meilleure uniformité du procédé (Knockaert, C., 1990).

I.3.1.2. Saumurage traditionnel

Pour le saumurage, les filets de poisson sont immergés dans une solution plus ou moins concentrée de sel dont la température ne doit pas dépasser 10 °C et être fréquemment changée pour éviter la contamination éventuels des produits d'un batch à l'autre. En général, on utilise des saumures à 18-20% plutôt qu'une solution saturée car celle-ci nuirait à l'aspect final du produit en permettant la formation de sels poudreux.

Contrairement au salage à sec, c'est une technique de salage relativement lente qui s'accompagne d'une prise de poids, puisqu'il y a pénétration de la solution saline vers l'intérieur du filet (Knockaert, C., 1990).

I.3.1.3. Saumurage par injection

Le salage par injection utilise le même type de saumure que celles qui ont été décrites précédemment. Elles sont injectées directement dans le cœur du filet à l'aide d'aiguilles afin d'accélérer au maximum les phénomènes de diffusion du sel dans tout le produit.

Cette méthode a l'avantage de pouvoir augmenter grandement le rendement de production, puisque la prise de poids des filets est importante (jusqu'à 9%). Cependant, il peut en résulter un feuilleteage, c'est-à-dire dissociation des fibres du muscle, produisant un net impact négatif sur la texture et l'aspect du produit. De plus, une trop forte prise en eau du produit peut résulter en un mauvais séchage de celui-ci et à de mauvaises qualités de conservations à l'issue du process (Knockaert, C., 1990).

I.3.2. Rinçage

A l'issue du salage des filets, ceux-ci doivent être rincés pour empêcher la formation de cristaux de sel en surface des filets lors du séchage. Cependant, le rinçage ne doit pas être excessif car il peut entraîner un dessalage rapide des filets. Il est le plus souvent réalisé par douchage des produits (salage à sec) ou trempage (saumurage).

Enfin, il est possible de compléter cette étape en éliminant l'eau de rinçage résiduelle à l'aide d'air comprimé pour améliorer l'étape de séchage si elle a lieu.

I.3.3. Séchage

L'étape de séchage est réalisée uniquement dans le cas de fumage à froid (« séchage-fumage »). Le but de cette étape est de diminuer la teneur en eau des filets jusqu'à une valeur propre au fumage et à la conservation ultérieure du produit.

Originellement, la technique de séchage employée était imposée par les conditions climatiques locales (suspendu dans le vent froid et sec des pays nordiques, ou à même le sol exposé au soleil des pays tropicaux) (Sainclivier, M., 1985b). De nos jours, le séchage est réalisé par entraînement à l'air dans des enceintes dont les conditions d'aération, de température et d'hygrométrie sont parfaitement contrôlées. En effet, le processus doit être parfaitement maîtrisé afin d'être assez rapide pour empêcher la prolifération des microorganismes, mais assez doux pour ne pas dégrader le produit.

Le principal défaut qui peut apparaître est lié à un séchage trop violent : le croûtage, lorsque la surface du filet se déshydrate trop rapidement. En plus de donner une texture indésirable au produit, cette pellicule solide peut limiter la perte d'eau du cœur du produit et la diffusion ultérieure des composés vers l'intérieur du produit. Pour éviter cela, on utilise des températures comprises entre 17 et 25 °C, pour une humidité inférieure de 10% à celle de la chair de poisson (Siskos, I. et al., 2005).

Une fois les filets de poissons partiellement séchés, ils sont prêts à être exposés à la fumée.

I.3.4. Génération de la fumée

Dans le cas d'un fumage traditionnel, l'exposition des filets à la fumée est réalisée simplement en les suspendant au dessus du foyer de combustion dans lequel de la sciure de bois produit de la fumée par lente pyrolyse. On parle de fumoirs à fumée directe ou d'armoire monobloc (Tinkougdou Kabré, A. et al., 2003) (Figure 2). Ces dispositifs traditionnels n'étant pas maîtrisés (pas de climatisation, de contrôle des conditions de pyrolyse, etc.), ils donnent des produits aux caractéristiques variables.

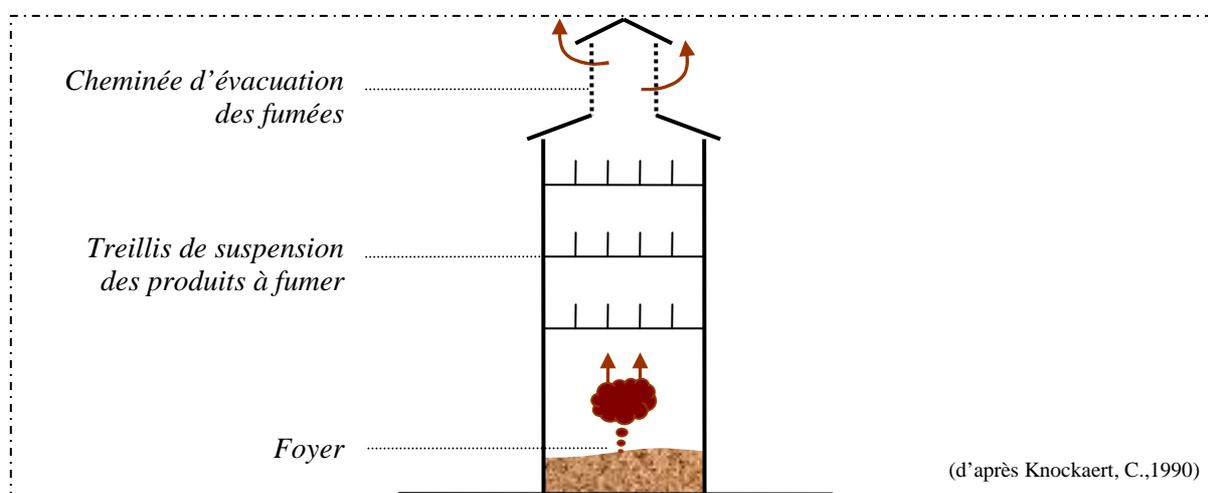


Figure 2 : Schéma de principe d'un générateur à exposition directe (armoire monobloc)

Le développement du fumage industriel a imposé un découplage de l'opération de production de fumée de celle de fumage proprement dit. Ceci a permis d'améliorer les installations industrielles (un générateur peut alimenter plusieurs fumoirs) et d'apporter une réelle maîtrise des conditions de production des fumées. Le fait de générer la fumée en amont de la cellule de fumage permet notamment de pouvoir la purifier à l'aide d'un système filtrant ou épurant et de la mettre à la température souhaitée (Knockaert, C., 1990).

I.3.4.1. Générateur à autocombustion

La fumée est obtenue par pyrolyse de copeaux de bois issus d'une trémie d'alimentation (Figure 3). Ceux-ci arrivent au niveau d'une couronne préchauffée électriquement jusqu'à une température permettant d'initier la pyrolyse. Une fois la période d'ignition terminée, la pyrolyse est autoentretenue et le chauffage électrique est arrêté. Il peut cependant être nécessaire d'utiliser de courtes séquences de chauffages pour relancer la production de fumée si celle-ci est interrompue. Les températures typiques développées par ce type d'appareillages sont de 400 à 450 °C.

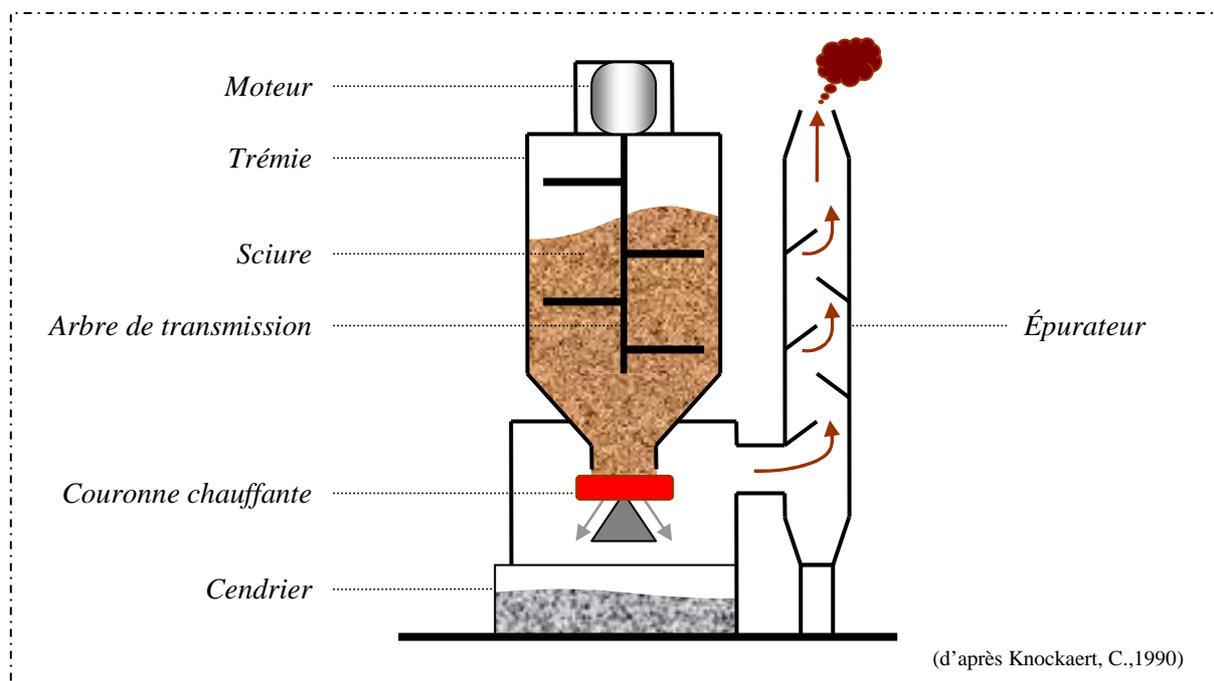


Figure 3 : Schéma de principe d'un générateur à autocombustion

I.3.4.2. Générateur à plaques thermostatées

Dans ce type de générateur (Figure 4), des copeaux de bois tombent périodiquement sur une plaque circulaire maintenue à une forte température (généralement proche de 500 °C). Le bois est pyrolysé, donnant naissance à de la fumée qui est aspirée par tirage externe. Périodiquement, la plaque est débarrassée des résidus de pyrolyse par un dispositif de raclage, afin de permettre l'apport de copeaux neufs et la production de fumée en continu.

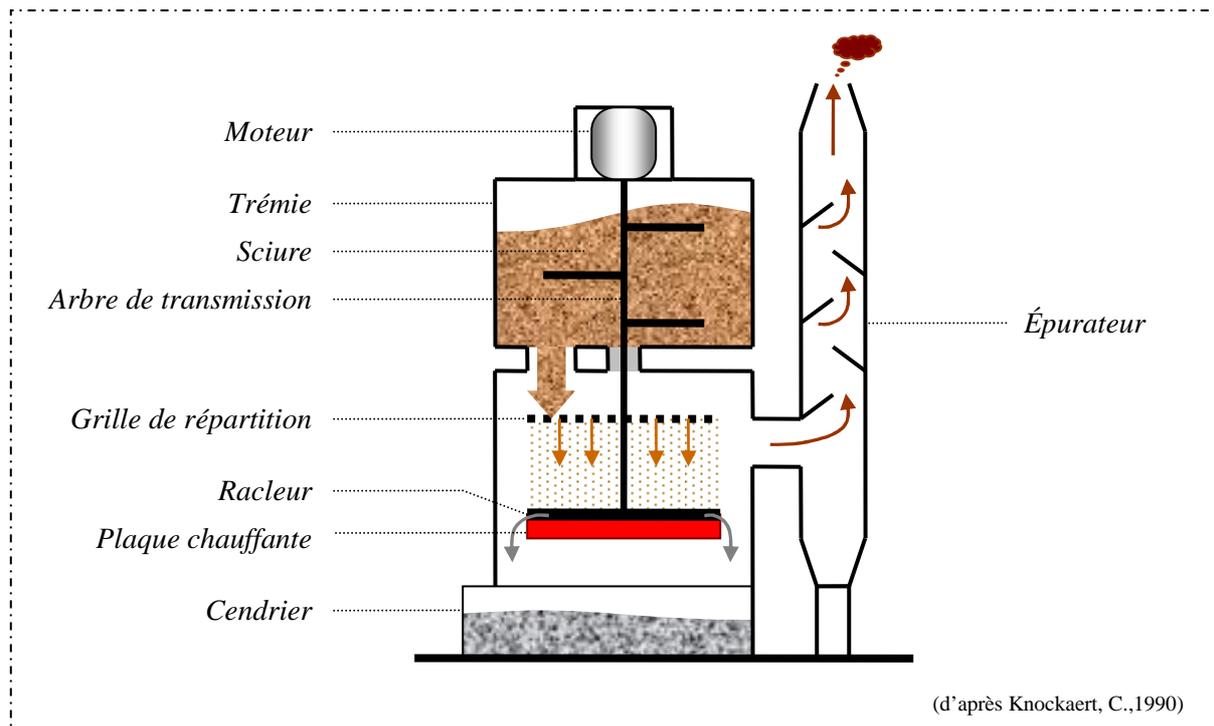


Figure 4 : Schéma de principe d'un générateur à plaque thermostatée

I.3.4.3. Générateur à friction

Les générateurs à friction (Figure 5) produisent de la fumée directement à partir de bûches de bois calibrées. Un moteur entraîne un rotor cranté et le fait tourner à grande vitesse. Simultanément, l'extrémité de la bûche est pressée sur le rotor. L'intense friction produite permet d'amener le bois à température de pyrolyse (Girard, J.P., 1988).

En dépit des nuisances sonores et de la nécessité d'avoir des bûches parfaitement calibrées, ce type de générateur possède l'avantage de permettre d'ajuster facilement la température de pyrolyse en modifiant les conditions d'appui (durée et pression).

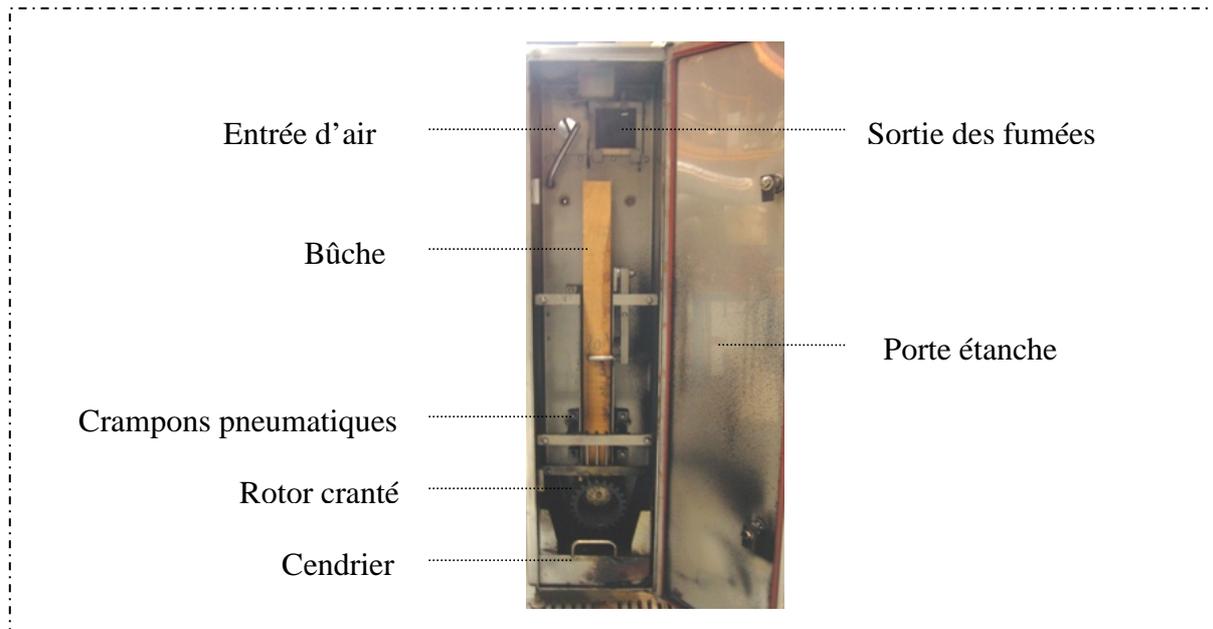


Figure 5 : Générateur de fumée à friction

Une utilisation industrielle de ce type de générateurs peut s'avérer plus coûteuse que celle des autres. D'un point de vue énergétique, la consommation est supérieure à celle d'un générateur à autocombustion mais comparable à celle d'un générateur à plaque thermostatée. Par contre, le coût en matière première s'avère plus élevé, en prenant en compte à la fois la consommation du générateur et le prix des bûches calibrées par rapport aux copeaux (Varlet, V. et al., 2007a). Cependant, ce type de générateur présente des avantages fonctionnels tels qu'une facilité de réglage, de mise en œuvre et de maintenance.

I.3.4.4. Vaporisation de « fumées liquides »

I.3.4.4.1. Les arômes de fumée

Les « arômes de fumée » sont obtenus par condensation de fumées de bois qui peuvent être fractionnées, purifiées, concentrées et immobilisées sur différents supports liquides (huiles végétales) ou solides (maltodextrines ou farines de maïs). La Figure 6 présente un exemple de procédé de fabrication simplifié. Des résidus de bois (principalement des sciures, des herbes et des épices) sont pyrolysés dans des fours spéciaux. Ceux-ci permettent de maintenir l'ambiance à des teneurs en O₂ maîtrisées, à une température maximale de 600 °C (Union Européenne, 2003). La fumée peut être filtrée pour en éliminer la phase particulaire avant d'être condensée dans des tours réfrigérées. La fumée condensée est séparée en plusieurs phases : fraction soluble dans l'eau (appelés « condensats primaires de fumée »), huiles lourdes et goudrons. Les huiles lourdes étant impropres à des utilisations pour l'alimentation

humaine, elles sont recyclées vers le four à pyrolyse. Les goudrons peuvent être utilisés après extraction et purification pour obtenir la « fraction primaire de goudron ».

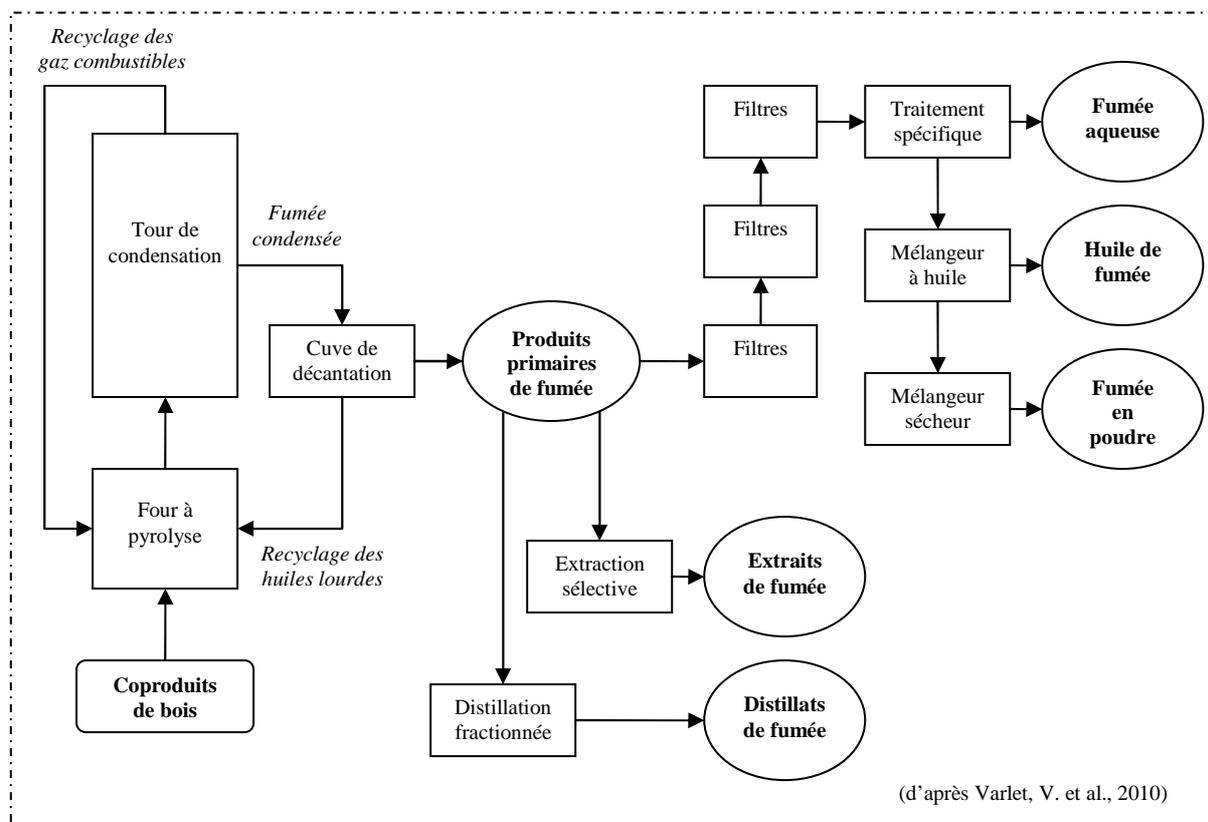


Figure 6 : Diagramme de fabrication d'arômes de fumée

Les produits « primaires de fumée » (regroupant les condensats primaires de fumée et la fraction primaire de goudron) subissent ensuite un ensemble d'étape de purification, fractionnement et éventuellement immobilisation sur différents supports alimentaires pour aboutir aux arômes de fumée. Préciser concrètement le processus de fabrication reste difficile, du fait des secrets industriels qui prévalent dans ce secteur et de la grande diversité d'arômes produits. Cependant, certaines normes encadrent la production des arômes de fumée utilisés au sein de l'Union Européenne. Notamment, elles ne peuvent pas être issues de bois traités chimiquement et ne peuvent être obtenues que par un nombre limité de techniques d'extraction et de séparation (Union Européenne, 2003).

On distingue plusieurs types d'arômes de fumée : les fumées liquides, les huiles de fumée, les fumées en poudre et les co-produits de fumée (qui comprennent les « extraits de fumée » et « distillats de fumée », obtenus par traitement direct des produits primaires de fumée).

Les co-produits de fumée représentent une très large gamme de composition et de caractéristiques organoleptiques. Leur procédé de fabrication permet un très bon contrôle de leur constitution et en fait des produits à l'usage très restreint, un co-produit étant généralement destiné à être utilisé sur une matrice alimentaire spécifique.

Les huiles de fumée et fumées en poudre sont des dérivés de fumée aqueuse. L'huile ou la poudre misent en jeu servent de support à la fumée liquide pour des utilisations spécifiques. Ainsi, les huiles de fumée sont préférées aux fumées aqueuses pour l'incorporation dans des préparations alimentaires grasses (type « émulsions tartinables »).

1.3.4.4.2. Les fumées liquides dans l'industrie du fumage

Les fumées liquides sont les arômes de fumée majoritairement utilisés en substitution du fumage traditionnel pour les produits de la mer. Leur utilisation permet de s'affranchir du fumage tout en apportant les caractéristiques recherchées dans le produit. Elles peuvent être incorporées au filet de poisson suivant différentes méthodes qui ne sont pas équivalentes en terme de législation.

- Le trempage et le douchage sont considérés comme des techniques d'aromatisation du produit frais. En tant que telles, les produits qui en sont issus ne peuvent pas bénéficier de la mention « fumé » sur leur emballage final et doivent mentionner l'arôme de fumée dans liste des ingrédients en tant qu'agent d'aromatisation. Dans un cas il s'agit d'immerger directement le filet dans l'arôme de fumée (50 à 60 secondes) puis de l'égoutter. Dans l'autre, l'arôme dilué est pulvérisé uniformément à la surface du produit à l'aide de sprays plus ou moins fins.

- Les « régénérations de fumées » par vaporisation de fumées liquides sont quant à elles considérées comme des techniques de fumage « vraies ». Elles consistent en une pulvérisation de fumée aqueuse dans un fumoir à l'aide d'air comprimé par des méthodes de brumisation ou de nébulisation (Figure 7). On génère ainsi à l'intérieur d'une enceinte de fumage un brouillard fin généralement constitué de gouttelettes de 15 à 20 μm de diamètre. Le produit à traiter est ainsi exposé à un milieu physiquement proche d'une fumée réelle (voir II.3, p.44).

Cependant, la frontière entre l'aromatisation et la régénération de fumée reste floue à l'heure actuelle. Ceci est dû à un manque de consensus sur la distinction à faire entre un « spray fin » (aromatisation) et une « atomisation » (fumage par régénération de fumée). Certains paramètres définissant cette frontière ne sont pas encore bien définis, principalement en terme de taille des gouttelettes mises en œuvres et de composition de la phase gazeuse (qui

est très riche pour une vraie fumée, mais presque inexistante dans un simple brouillard vaporisé).

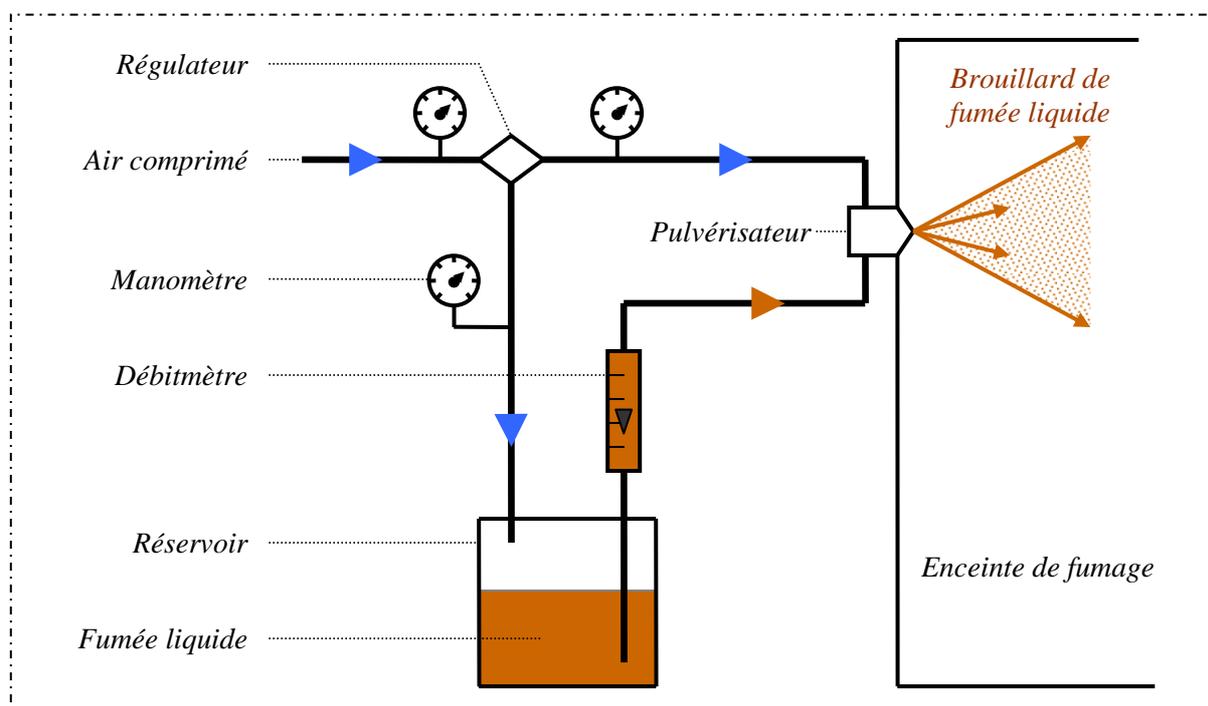


Figure 7 : Schéma de principe d'une installation de vaporisation de fumée liquide

La mise en œuvre de ces « régénérations de fumées » présente l'avantage industriel d'employer un matériel plus facile d'entretien et d'utilisation. De plus, elle élimine le risque d'incendie lié aux générateurs pyrolytiques et offre une grande maîtrise de la composition de la fumée ainsi que de sa répartition sur le produit.

Il est important de noter que les arômes utilisables au sein de l'Union Européenne font partie d'une liste « positive » : toute fumée liquide n'ayant pas fait l'objet d'une autorisation spécifique est interdite. L'obtention d'une telle autorisation implique notamment la production de données de toxicologie écartant les risques pour la santé humaine. La composition de l'arôme doit aussi être fournie et respecter les teneurs maximales admissibles en benzo[a]pyrène et benz[a]anthracène (respectivement 10 µg/kg et 20 µg/kg pour les arômes issus des condensats de fumée primaire).

I.3.5. Exposition du filet à la fumée

On distingue deux types de fumages, définis par la température à l'intérieur du fumoir pendant l'exposition du produit à la fumée : le fumage à chaud et le fumage à froid.

Le fumage à chaud se déroule en deux étapes : les filets non-séchés sont d'abord exposés à une température avoisinant les 30-40 °C pour une durée pouvant aller de 0,5 à 1,5 h. Ensuite, la température de l'ambiance est augmentée graduellement jusqu'à atteindre 70-80 °C, le but étant de cuire le produit (Kołodziejka, I. et al., 2004). Au cours du processus, il peut y avoir une perte de poids assez importante, allant jusqu'à 25% (Knockaert, C., 1990). Ce type de « cuisson-fumage » est typique de l'Amérique du Nord et pays européens nordiques.

Le fumage à froid, ou « séchage-fumage », est celui qui est le plus employé dans les autres pays d'Europe. Les filets préalablement séchés sont exposés à la fumée, à une température généralement comprise entre 17 et 28 °C (Birkeland, S. et al., 2004) pour une durée beaucoup plus longue. Le processus peut en effet durer de 2h à quelques jours, en fonction du produit et des caractéristiques recherchées. Il peut être nécessaire de tempérer la fumée avant son introduction dans le fumoir afin d'éviter qu'elle ne réchauffe l'atmosphère. Le fait de la faire passer par un échangeur thermique permet de réguler la température du fumoir sans avoir à avoir recours à des admissions d'air frais.

Les caractéristiques d'aéroulque de la cellule de fumage vont avoir une grande importance au cours de cette étape, puisque elles vont déterminer le brassage de la fumée, et son temps de mise en contact avec le produit pendant son séjour dans le fumoir. Des cellules ont été développées pour obtenir des circulations d'air horizontales ou verticales.

De plus, certaines techniques ont été développées pour tenter d'accélérer et d'améliorer le dépôt de fumée. On peut notamment citer le concept de fumage électrostatique : une forte tension électrique est appliquée entre le produit et des électrodes positionnées au dessus de lui (Girard, J.P. et al., 1982). Le champ électrique mis en place permet de ioniser positivement les particules de fumée à proximité des l'électrodes. La surface du produit étant reliée à la masse du système, les particules ionisées sont précipitées vers celle-ci, ce qui force leur dépôt. Ce type d'installation permettant d'accélérer le fumage, des prototypes ont été conçus sous forme de tunnels (Figure 8) où les produits à fumer circulent avec un temps de séjour relativement court (Knockaert, C. et al., 1990).

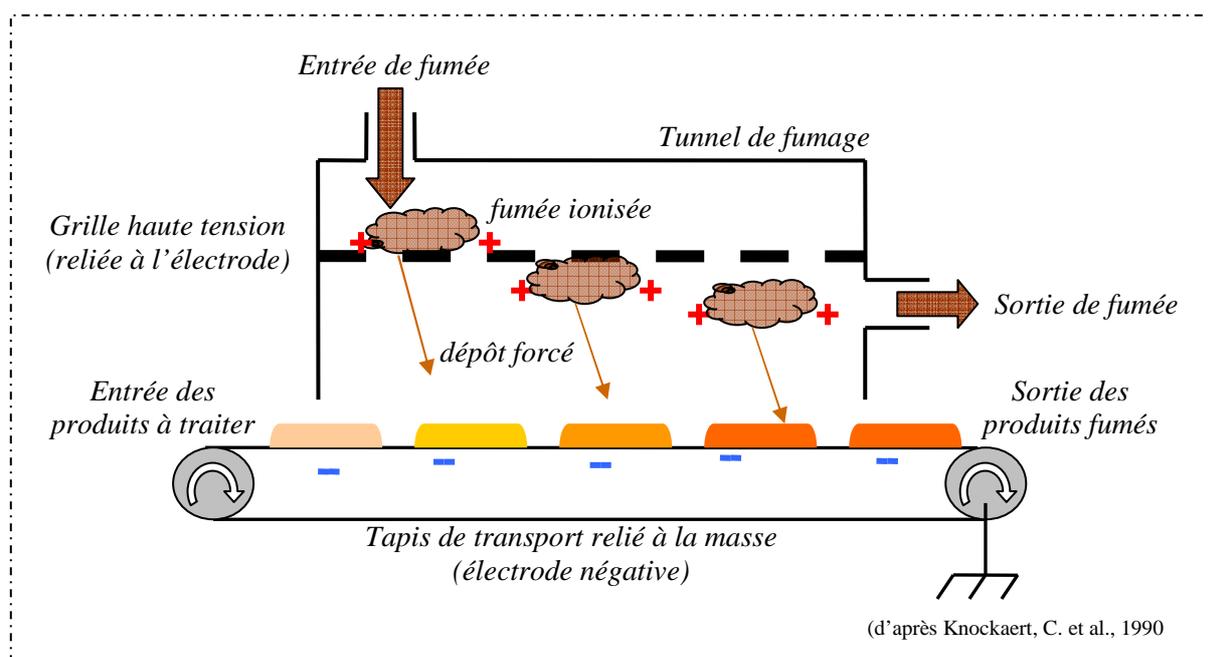


Figure 8 : Schéma de principe d'un tunnel de fumage électrostatique

II. La fumée

II.1. Chimie de la génération de fumée

II.1.1. Composition de la matière première : le bois

Le bois étant la seule matière première impliquée dans la production de la fumée, il est nécessaire de s'intéresser à sa composition qui joue un rôle essentiel sur la nature chimique des composés retrouvés dans la fumée.

Les trois constituants principaux du bois sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Figure 9). Il contient aussi des composés en plus faibles quantités, principalement des résines, minéraux et cires.

Tableau 3 : Composition moyenne des différents types de bois

Type de bois	Dur	Tendre
Cellulose	40 - 60 %	40 - 60 %
Hémicellulose	20 - 30 %	20 - 30 %
-Hexosanes	3 - 6 %	11 - 15 %
-Pentosanes	14 - 19 %	3 - 6 %
Lignine	20 - 30 %	20 - 30 %

(d'après Girard, J.P., 1988)

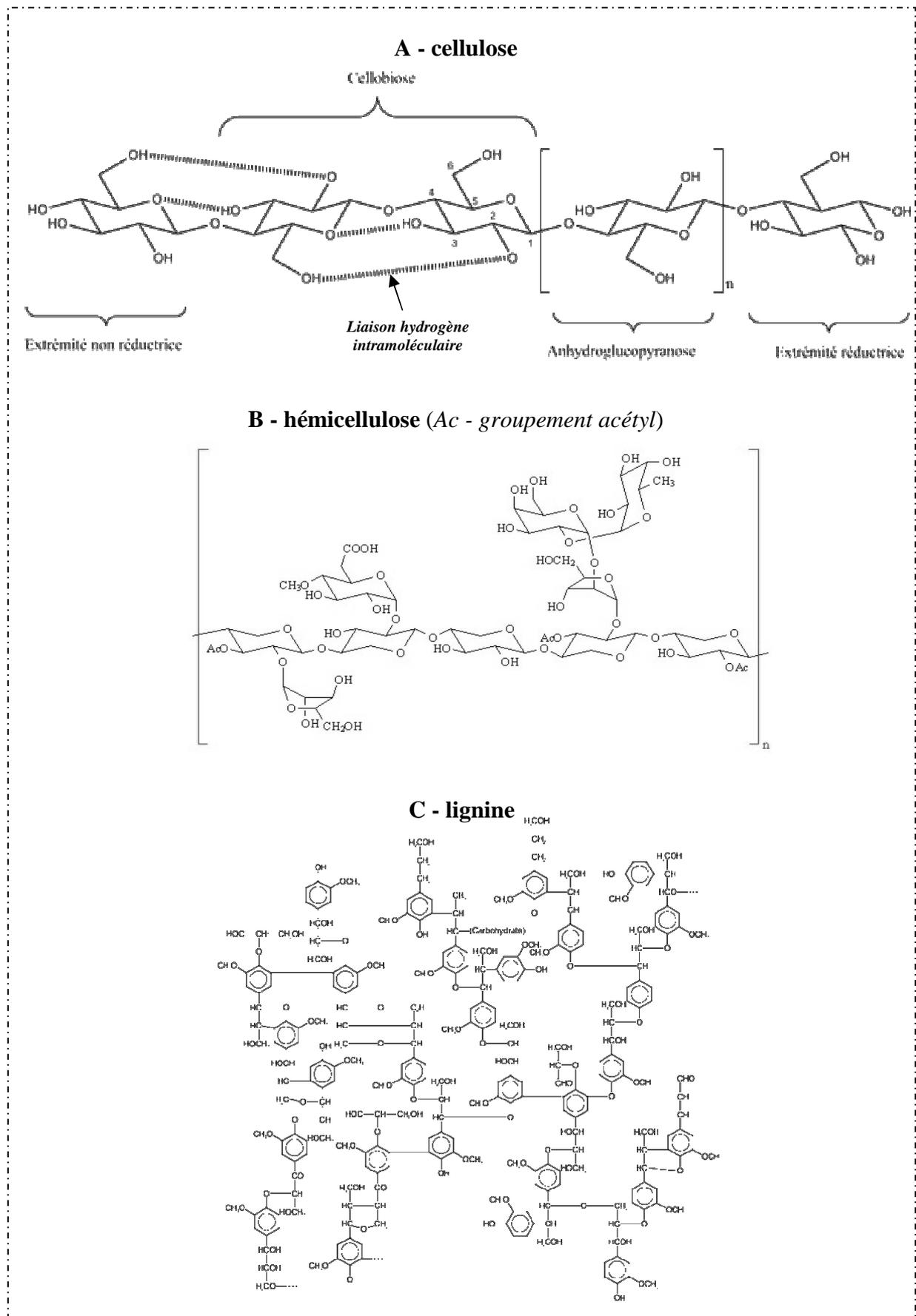


Figure 9 : Structure chimique des principaux constituants du bois

- La structure moléculaire de la cellulose est globalement la même pour tous les types de bois : il s'agit d'un homopolymère linéaire de D-glucoses liés par des liaisons osidiques de type $\beta(1-4)$. Son degré de polymérisation varie de quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités, en fonction de l'espèce végétale dont elle est issue. Les molécules de cellulose peuvent s'associer entre elles par des liaisons hydrogènes pour former des fibres linéaires.

- L'hémicellulose est un ensemble d'hétéropolysaccharides comprenant des pentosanes (principalement xylanes) et des hexosanes (mannanes, galactanes, lévulanes, etc.). Elle est principalement présente dans le bois sous forme linéaire isolée. Elle peut aussi être ramifiée, auquel cas elle s'enroule autour des fibres de cellulose. Avec des monomères pouvant être méthylés, acétylés ou carboxylés et un degré de polymérisation pouvant atteindre 400, l'hémicellulose possède une structure extrêmement complexe et variable d'un bois à l'autre. Les bois durs et les bois tendres diffèrent principalement par leurs teneurs en hexosanes et pentosanes (Tableau 3). Les pentosanes étant plus thermosensibles que les hexosanes, ces différences pourront se traduire par un comportement différent des bois vis-à-vis des conditions de production de fumée.

- La lignine possède une structure mal définie. Il s'agit d'un polymère tridimensionnel de très grande masse moléculaire. Étant formée principalement par des associations de résidus syringyl et guaiacyl, elle peut être considérée comme un polymère réticulé de composés phénoliques.

II.1.2. Réactions de pyrolyse

La pyrolyse de biomasse est à distinguer de la combustion complète qui conduit exclusivement à la production d'eau, de gaz carbonique et de cendres. Elle met en jeu de très grandes quantités d'énergie pour casser les macromolécules en des composés de taille inférieure. L'ensemble des réactions qui interviennent alors aboutit à la formation des composés de trois fractions distinctes : les gaz (H_2 , CO , CO_2 , CH_4 , etc.), le charbon et les goudrons (González, J.F. et al., 2009).

Le charbon est la fraction solide, non volatile, théoriquement absent de la fumée. Il est principalement constitué de carbone fixe (>75%) et présente une structure microporeuse.

Le reste constitue les goudrons, qui peuvent se trouver à l'état liquide ou à l'état gazeux après vaporisation partielle. C'est le cas dans la fumée de bois dont ils sont les constituants

principaux (voir II.3, p.44). Leur condensation frigorifique permet de les isoler sous forme d'un liquide huileux.

En fonction des paramètres opérationnels employés, les mécanismes réactionnels menant aux produits de dégradation finaux seront différents. On distingue les pyrolyses lentes, rapides et flash (Tableau 4). La génération de fumée industrielle entre dans le cadre des pyrolyses dites « lentes » qui favorisent la production de goudrons et, dans une moindre mesure, de charbon. La gazéification ne prédomine qu'à de très fortes températures, elle est surtout observée pour des pyrolyses très intenses et donc très rapides.

Tableau 4 : Principaux paramètres opérationnels des différents types de pyrolyse

	Pyrolyse lente	Pyrolyse rapide	Pyrolyse flash
Température (°C)	300-700	600-1000	800-1000
Vitesse de chauffe (°C.s ⁻¹)	0,1-1	10-200	>1000
Taille de particule pyrolysée (mm)	5-50	<1	<0,2
Temps de pyrolyse (s)	300-550	0,5-10	<0,5

(d'après Demirbaş, A. & Arin, G., 2002)

Au cours de la pyrolyse, on distingue deux étapes qui se déroulent successivement (Balejko, J.A., 1991) :

- une décomposition thermique anaérobie qui se produit au contact du foyer (zone de décomposition). Elle consiste en la dégradation des constituants du bois sous l'effet de la chaleur et conduit à la formation d'un très grand nombre de composés ;

- une diversification des composés générés qui se produit pendant l'éloignement du foyer. Les molécules issues de la décomposition thermique subissent un ensemble de réactions secondaires (oxydation par l'oxygène de l'air ambiant, scission, cyclisation, etc.) qui vont entraîner la génération de nouveaux composés.

II.1.2.1. Décomposition de la cellulose

Bien que la pyrolyse de la cellulose ait été largement étudiée, certains aspects en sont encore mal compris. Il est généralement admis qu'il existe trois voies principales de dégradation : la déshydratation intermoléculaire, la dépolymérisation et la fragmentation. Ces différentes voies sont concomitantes mais chacune d'entre elle est favorisée par certaines conditions de pyrolyse (Figure 10).

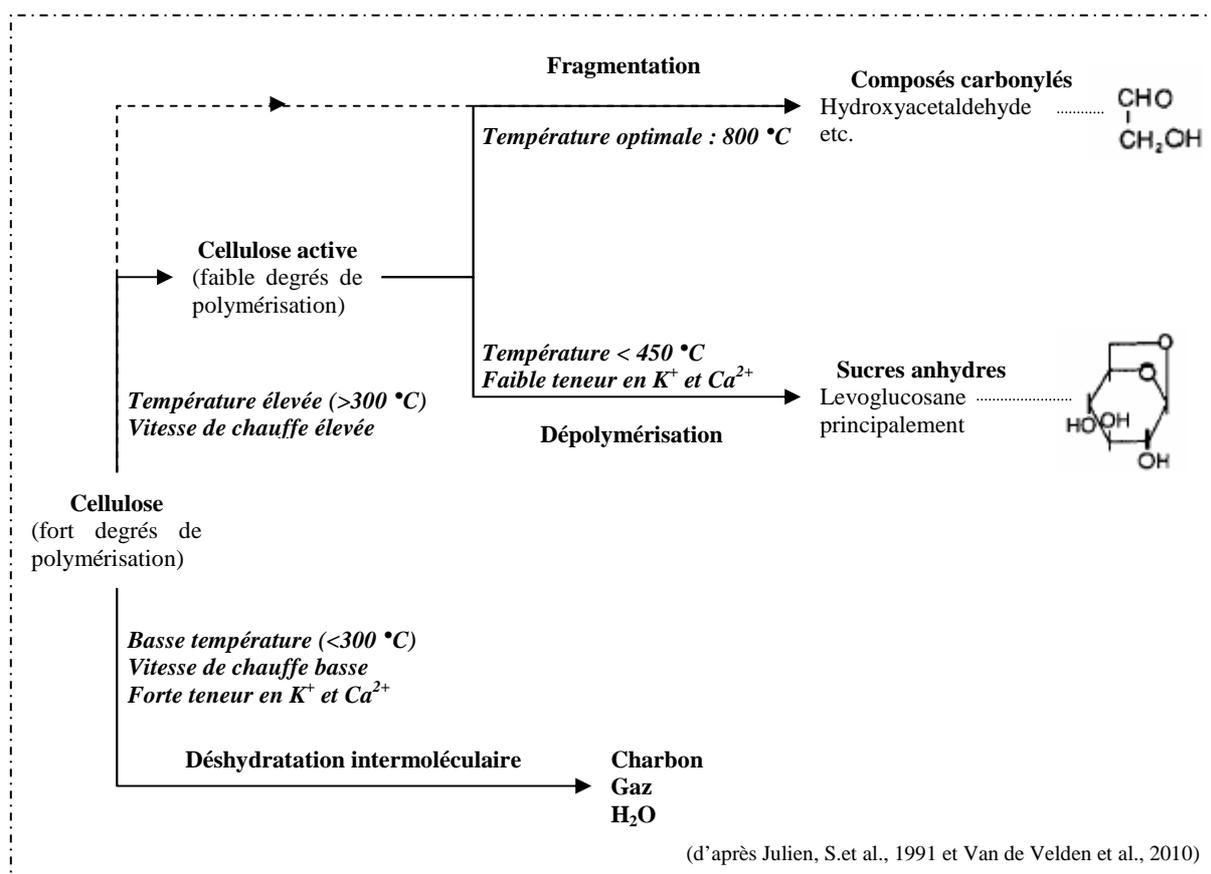


Figure 10 : Mécanismes de pyrolyse de la cellulose selon différents paramètres de température, vitesse de chauffe et présence d'ions

Dans la gamme des températures développées par les générateurs de fumée industriels, la dégradation de la cellulose passe par une étape de déshydratation intramoléculaire qui permet de former la « cellulose active » constituée d'anhydrocellulose (Figure 11). Sous sa forme cétone, celle-ci sera dépolymérisée par transglycosylation, menant à la formation de sucres anhydres (principalement le lévoglucosane).

Le lévoglucosane peut ensuite être réhydraté (Figure 12) pour former des monomères de glucopyranose que seront décomposés à travers un ensemble de réactions de scission, réarrangement, décarbonylation ($-\text{CO}$), décarboxylation ($-\text{CO}_2$) et cyclisation. Le détail de ces mécanismes étant mal connu, les chemins réactionnels proposés dans la littérature restent hypothétiques.

Bien qu'à ces températures la voie de fragmentation directe ne soit pas prédominante, elle participe quand même à la dégradation de la cellulose (éventuellement par l'intermédiaire de la cellulose active). Elle conduit à la formation principale d'aldéhydes, acides et alcools de petite taille.

II.1.2.2. Décomposition de l'hémicellulose

La dégradation pyrolytique de l'hémicellulose se fait de manière analogue à celle de la cellulose. Cependant, comme elle est plus thermosensible, les gammes de températures favorisant la dépolymérisation et les déshydratations sont plus basses (Van de Velden et al., 2010). C'est donc la dépolymérisation qui domine lors de la production de fumée industrielle, conduisant à la formation de composés organiques volatils (en grande partie des furanes) par l'intermédiaire du lévoglucosane ainsi que d'autres sucres anhydres issus spécifiquement des pentosanes (Alén, R. et al., 1996).

II.1.2.3. Décomposition de la lignine

En dessous de 500 °C, la décomposition de la lignine se fait préférentiellement par voie de déshydratation (Figure 13) pour aboutir à la libération de « monomères de lignines » : une grande variété de dérivés du phénol (phénols simples, éthers phénoliques, etc.). Les principaux composés dérivant de ces mécanismes réactionnels sont le guaiacol et le syringol (de par l'abondance des résidus guaiacyl et syringyl dans les structures de lignine, Figure 14), auxquels s'ajoutent néanmoins des produits minoritaires tels que le méthanol, l'acétone et divers acides organiques.

II.1.2.4. Paramètres influençant les décompositions

En plus d'être influencées par les paramètres directement liées à la chauffe du bois (température atteinte, vitesse de chauffe, temps de chauffe), les réactions de décomposition thermiques sont modifiées notamment par la présence de composés inorganiques dans le matériau pyrolysé.

Les composés inorganiques présents en faible quantité dans le bois pourraient modifier significativement les produits de sa pyrolyse. Ces phénomènes ont été mis en évidence principalement à l'aide de systèmes modèles simples. Par exemple, la dégradation thermique d'isolats de cellulose enrichis en phosphore ont mené à de plus fortes productions de furfural, cyclopentenones et charbon que celle de cellulose déminéralisés (Nowakowski, D.J. et al., 2008). Le même type d'effet est constaté pour l'hémicellulose dont le xylane est particulièrement sensible à la présence d'ions (Van de Velden et al., 2010). De même, la présence de certains ions (de Na, K, Mg, Ca, Zn) permet de favoriser certaines voies de dégradation et modifier sensiblement la nature des composés formés. Ce type de résultats indiquerait donc une potentielle importance des éléments minoritaires présents dans le bois lors de sa pyrolyse, alors même que ceux-ci sont peu pris en considération.

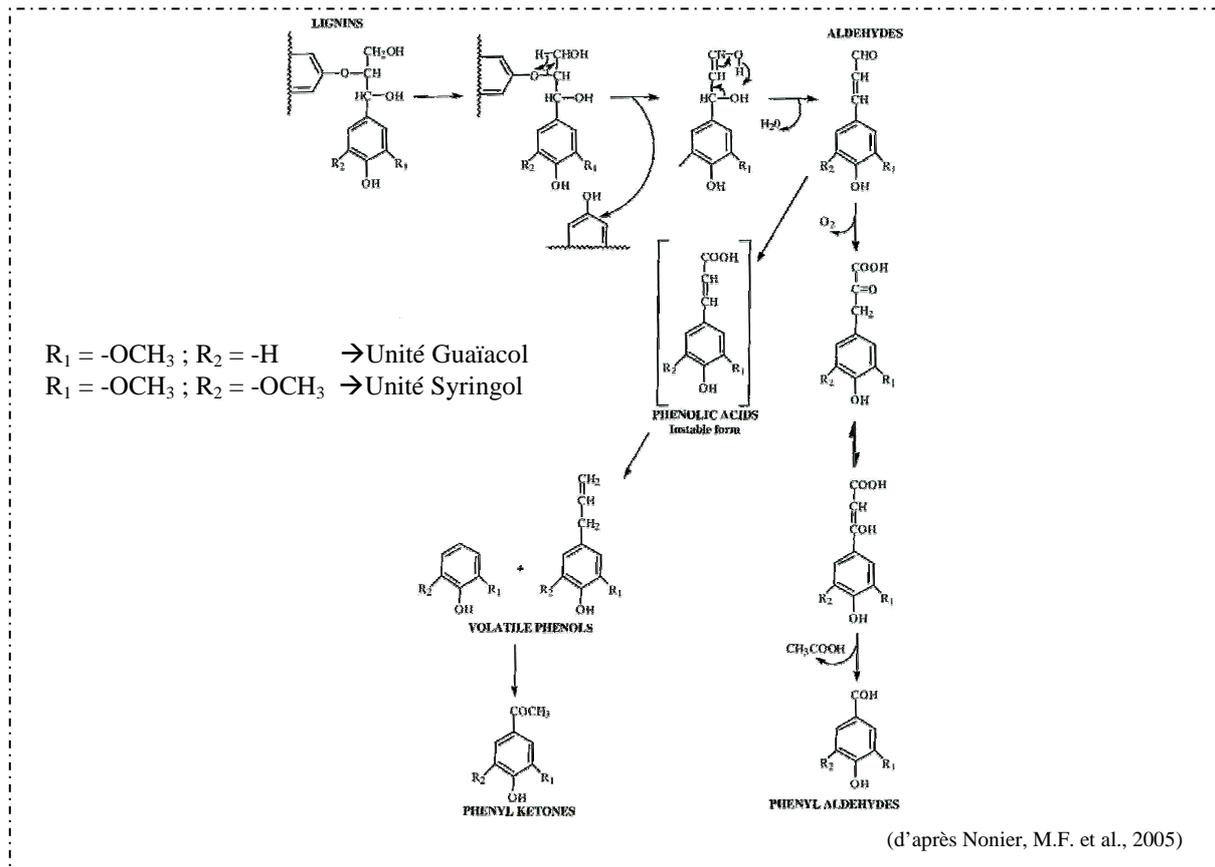


Figure 13 : Mécanismes de décomposition thermique de la lignine

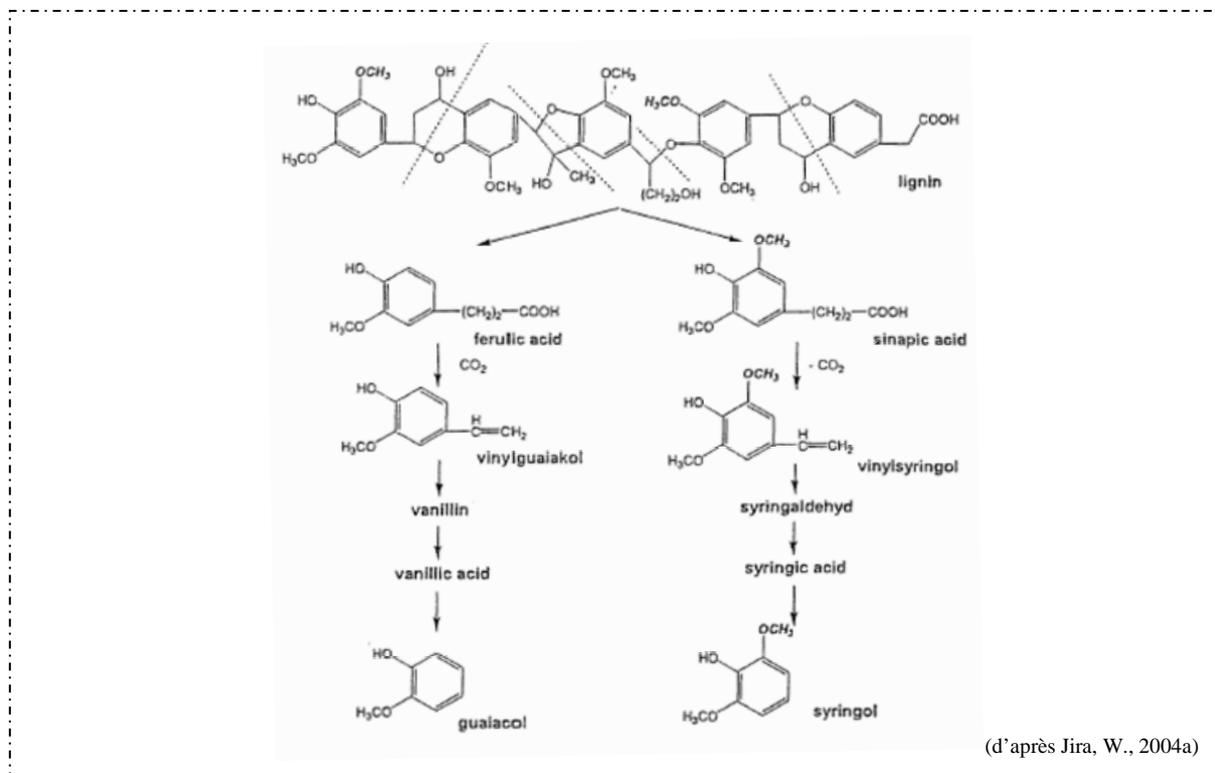


Figure 14 : Génération de guaiacol et syringol par décomposition de lignine

En outre, la pyrolyse des constituants du bois a été principalement étudiée dans des systèmes modèles, en l'absence d'autre matière première. Lors de la génération de fumée industrielle, la décomposition de l'ensemble des polymères du bois de fait de manière simultanée, pouvant donner lieu à des interactions. Même si ces phénomènes sont encore mal connus, des interactions lignine-cellulose ont pu être mises en évidence lors de pyrolyses à haute température (Hosoya, T. et al., 2007) :

- en présence de lignine, la production de lévoglucosane issu de la cellulose est inhibée. Il en résulte une plus grande proportion de charbon et de composés de très faible poids moléculaire.

- en présence de cellulose, la lignine pyrolysée génère moins de charbon. Les produits de décomposition sont alors plus riches en composés volatils comme le guaïacol et ses dérivés.

II.2. Composition chimique de la fumée

II.2.1. Les familles de composés chimiques de la fumée

L'ensemble de ces réactions de production primaire confère à la fumée néoformée une grande variété de composés chimiques. En s'éloignant du foyer les produits libérés se diversifient encore, il en résulte un milieu de composition encore plus complexe.

La fraction non-volatile de la fumée est principalement constituée d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de haut poids moléculaire. *Leurs caractéristiques (structure, voies de formations, facteurs influents, etc.) étant détaillées en IV (page 71) ceux-ci ne seront pas abordés dans cette partie.*

La fraction volatile de la fumée a été très largement étudiée, car elle confère au produit fumé de nombreuses propriétés organoleptiques et technologiques (par action directe ou après réaction avec les composants de la matrice alimentaire). Il faut en premier lieu citer le travail considérable réalisé par Joseph A. Maga qui compila une liste de 410 composés connus dans la fumée de bois comprenant : 48 acides, 22 alcools, 131 composés carbonylés, 22 esters, 46 furannes, 16 lactones, 75 composés phénoliques et 50 composés divers (Maga, J.A., 1987). Depuis, cette liste a encore été allongée avec l'étude de fumées sous différentes formes (gazeuse, liquide, solide). A l'heure actuelle, c'est plus de cinq cents molécules différentes qui ont été identifiées dans la fumée et dont les principales familles sont présentées Figure 15.

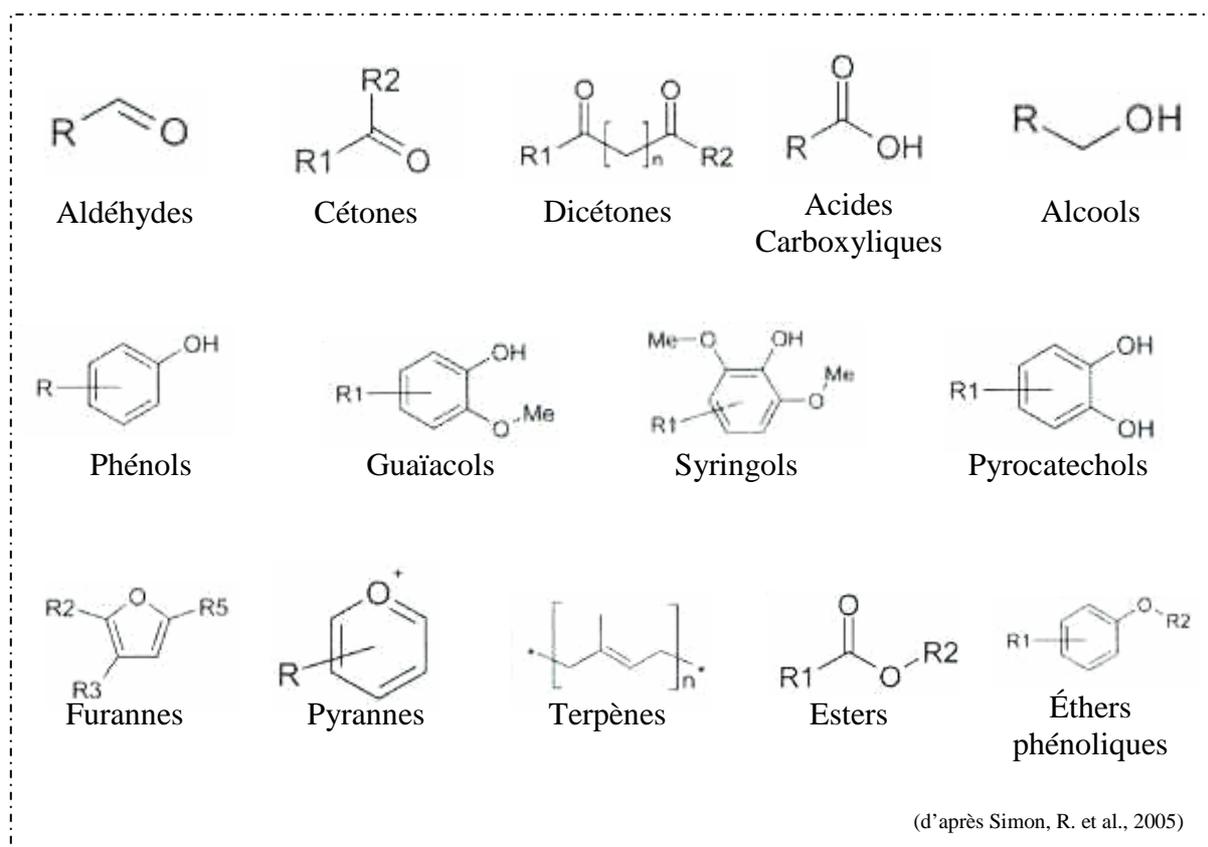


Figure 15 : Groupes et structures chimiques des principaux composés identifiés dans la fumée de bois

Parmi les composés de la fumée, une très grande proportion possède des structures cycliques. Les composés phénoliques, ou « phénols », sont probablement ceux qui ont été les plus étudiés. En effet, ils sont considérés comme étant responsables de la flaveur « fumé » (Maga, J.A., 1987) et constituent un indicateur efficace du procédé de fumage (Sérot, T. et al., 2004) ainsi que des essences de bois utilisées. *Du fait de leur importance prépondérante dans la fumée et le procédé de fumage, les composés phénoliques font l'objet d'une étude spécifique en III (page 46).*

D'autres composés homocycliques peuvent aussi être retrouvés dans la fumée et les produits fumés, comme des dérivés de la cyclopentenone et des terpènes cycliques. Ces derniers étant en particulier présents dans les fumées produites avec ajout d'aiguilles de résineux, d'herbes aromatiques ou d'épices (Guillén, M.D. & Manzanos, M.J., 1999d).

Une part non négligeable des composés de la fumée présentent aussi des structures hétérocycliques, comme des pyrannes et des furannes. Ceux-ci seraient principalement issus

de la thermodégradation de l'hémicellulose du bois (Nonier, M.F. et al., 2005). Le furfural (et ses dérivés) formé par déshydratation des pentoses (Sanders, E.B. et al., 2003) constituent la deuxième famille de composés volatils la plus abondante des fumées. Des hétérocycles azotés ont aussi pu être identifiés dans la fumée, en dépit des faibles quantités d'azote habituellement retrouvées dans le bois. Les principales familles de composés retrouvés sont les pyrroles, les pyrazines, les pyridines et les carbazoles (Figure 16). Ils restent cependant largement minoritaires dans les fumées de bois.

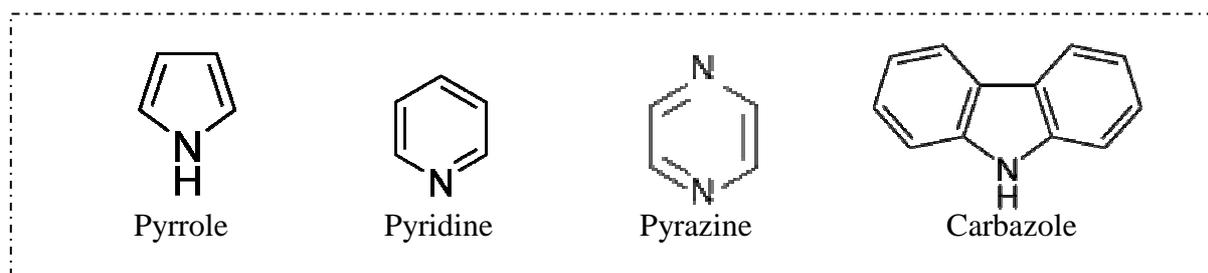


Figure 16 : Principaux hétérocycles azotés présents dans la fumée de bois

Enfin, les composés aliphatiques représentent une part largement minoritaire des composants de la fumée (Barrefors, G. & Petersson, G., 1995a et b ; Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L., 1998). Ce sont principalement des composés de faible masse moléculaire, co-produits de la dégradation des constituants du bois. On retrouve principalement des hydrocarbures ou des alcools.

II.2.2. Facteurs influençant la composition de la fumée

L'influence des conditions de production de fumée sur la composition de celle-ci a été très largement étudiée. Du fait de la grande complexité des phénomènes mis en œuvre, de très nombreux paramètres influents peuvent être identifiés, bien que leur rôle individuel n'ait pas toujours pu être clairement défini.

II.2.2.1. Essence de bois

L'essence de bois utilisée pour produire les fumées alimentaires modifie de manière significative les composés présents dans la fumée, en terme de nature et de proportions respectives. De par la possibilité de produire de la fumée à partir de toutes les formes de bois (bûche, copeaux, sciure) et de pouvoir incorporer des épices et des herbes aromatiques avant la pyrolyse, de nombreuses matières premières ont déjà été étudiées : hêtre (Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L., 1996a ; Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L., 1999a), chêne (Guillén, M.D. &

Manzanos, M.J., 2002 ; Guillén, M.D. & Manzanos, M.J., 2005), bouleau (Barrefors, G. & Petersson, G., 1995a et b ; Barrefors, G. et al., 1996), noyer (Lustre, A.O. & Issenberg, P., 1969), sapin (Barrefors, G. & Petersson, G., 1995a ; Kjällstrand, J. et al., 1998), paille d'orge (Barrefors, G. & Petersson, G., 1995a), pin (Barrefors, G. & Petersson, G., 1995b ; Simoneit, B.R.T. et al., 2000), thym (Guillén, M.D. & Manzanos, M.J., 1999b), cerisier (Fujimaki, M. et al., 1974), mélanges de bois durs (Barrefors, G. & Petersson, G., 1995b ; Lustre, A.O. & Issenberg, P., 1969), etc.

Les bois durs (hêtre, chêne, frêne, noyer, etc.), dont l'hémicellulose contient plus de pentosanes, ont tendance à donner plus d'acides carboxyliques et de dérivés du furanne. La plus forte proportion d'hexosanes des bois tendres (peuplier, bouleau, conifères, etc.) mène à une prédominance d'acide acétique et une génération plus prononcée d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (Simon, R., et al., 2005 ; Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L., 1999a).

Par ailleurs, les variations de structures entre les lignines de bois d'essences différentes entraînent des modifications dans les composés produits au cours de la pyrolyse (Tableau 5). Les bois durs produisent un mélange de guaiacol et syringol (et leurs dérivés respectifs) alors que les bois tendres produisent essentiellement des dérivés du guaiacol. De nombreux auteurs ont utilisé des ratios de composés phénoliques (principalement « guaiacol / syringol » et « guaiacol / phénol ») comme marqueur du type de bois employé lors du fumage. Par exemple, les bois durs mènent à un ratio G/S de l'ordre de 1,5 et un ratio G/P proche de 2 (Guillén, M.D. & Manzanos, M.J., 2005).

Tableau 5 : Pourcentage des principaux composés phénolique de fumées issues de divers bois

Composés phénoliques	Chêne (<i>Q. acuta</i>)	Chêne (<i>Q. seriata</i>)	Cerisier	Bambou	Pin	Cèdre
Guaiacol	45	40	30	36	26	24
4-méthylguaiacol	12	12	9	7	10	11
4-éthylguaiacol	2	2	1	2	1	2
o-crésol	24	23	39	40	40	45
p-crésol	10	10	13	9	15	16
3,5-diméthylphenol	4	4	4	3	1	2
3,4-diméthylphenol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Syringol	4	4	4	3	4	0

- Pourcentages d'aires de pics obtenues par GC-FID de la fraction phénolique

(d'après Fujimaki, M. et al., 1974)

La nature des bois employés étant à ce point déterminante pour la qualité de la fumée et du produit fini, qu'elle a mené à l'utilisation de mélanges de bois pour la production de fumées de meilleure qualité. Alors que ceci est réalisé facilement pour des générateurs mettant en œuvre des copeaux ou de la sciure (par simple mélange), un procédé innovant a dû être mis au point par l'IFREMER pour pouvoir l'appliquer à des générateurs à friction qui utilisent des bûches (Guille Des Buttes, J. et al., 1999). Il permet la fabrication de blocs de matériaux composites à partir des essences de bois choisies pour obtenir une matière première parfaitement maîtrisée produisant une fumée aux qualités recherchées.

II.2.2.2. Température de pyrolyse

L'autre paramètre technologique déterminant pour la génération de fumée est la température de pyrolyse atteinte par le bois, qui influence grandement la teneur de la fumée en composés volatils et non-volatils (Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L., 1996b). Ainsi, les teneurs en acides les plus élevées sont atteintes pour des basses températures, et elles diminuent lors de l'augmentation de la température au delà de 300 °C. La production de composés carbonylés, elle, augmente régulièrement entre 200 et 600 °C. De même, l'augmentation de la température entraîne une augmentation des quantités de composés phénoliques, jusqu'à atteindre un maximum vers 500 °C avant de diminuer à nouveau. Il est important de noter que si les tendances sont valables pour l'ensemble d'une famille chimique, les teneurs individuelles ne varient pas de manière identique pour tous les composés d'un même groupe (Figure 17).

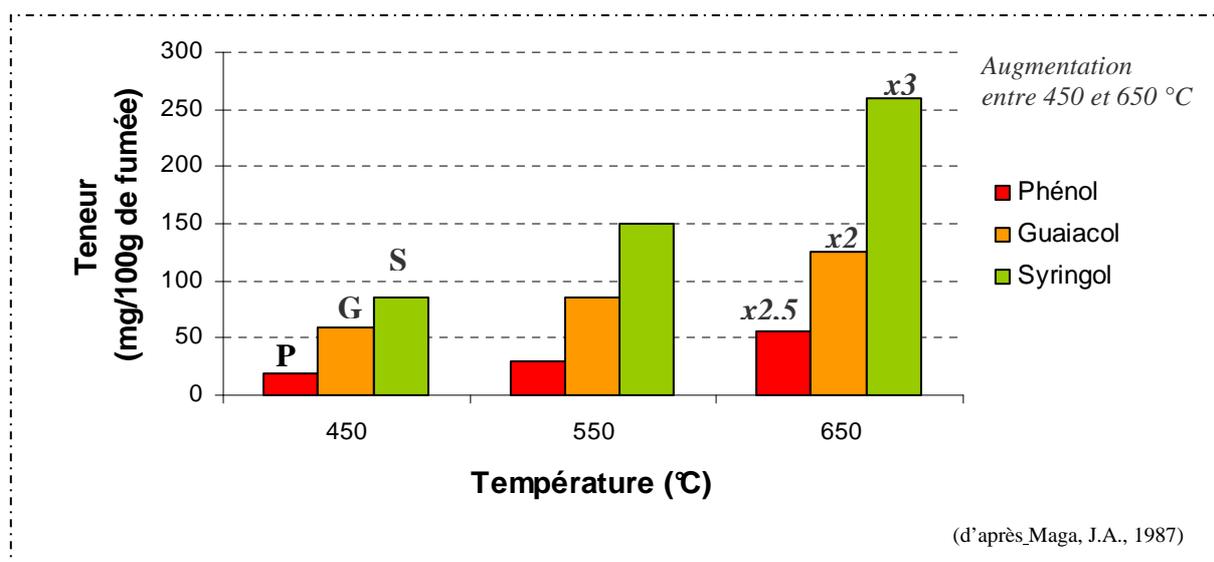


Figure 17 : Teneur en composés phénoliques de fumées générées à différentes températures

L'ensemble de ces données, a permis de définir des températures optimales pour la production de fumées alimentaires entre 400 et 500 °C. Ces niveaux de températures sont à la fois trop élevés pour la production d'acides (qui ont un impact négatif sur la saveur du produit) et trop faibles pour de fortes productions de HAP (qui nuisent à la qualité sanitaire du produit ; voir IV.2, p.72). Par contre, ils favorisent au maximum les composés d'intérêt comme les composés phénoliques, les composés carbonylés et les furannes (Maga, J.A., 1987 ; Alén, R. et al., 1996 ; Nonier, M.F. et al., 2005).

II.2.2.3. Autres paramètres

Dans le cas de génération à partir de copeaux ou de sciures, la granulométrie de la matière première a une action indirecte dans la composition de la fumée. Il est cependant difficile de préciser comment elle joue sur la pyrolyse car elle influence simultanément plusieurs autres facteurs. Notamment, elle va modifier la vitesse et la température de pyrolyse, ainsi que la possibilité d'oxygénation au niveau de la zone de pyrolyse (Rusz, J. & Miler, K.B.M., 1977 ; Clifford, M.N. et al., 1980). Des particules de plus grande taille seront soumises à une pyrolyse plus rapide et plus oxygénée (la circulation d'air étant rendue plus facile par des espaces plus larges entre les particules de bois).

De même, la vitesse de circulation d'air joue un rôle essentiel puisqu'une aération forte va apporter plus d'oxygène, diminuer la température du foyer, refroidir la fumée produite, et la diluer (Lantz, A.W. & Vaisey, M., 1970 ; Chan, W.S. & Toledo, R.T., 1975). La qualité de l'air employé est aussi déterminante, en terme d'humidité et de teneur en oxygène. Ainsi, certains auteurs ont préconisé l'utilisation de fumées riches en oxygène pour un développement optimal de la saveur du produit (Potthast, K., 1982).

L'humidité du bois utilisé peut aussi influencer la composition finale de la fumée. Par exemple, il a pu être montré (Gorbatov, V.M. et al., 1963 cité par Maga, J.A., 1987) qu'une même sciure de bois hydratée à différents niveaux conduisait à des condensats de fumées de compositions différentes, ayant des qualités organoleptiques distinctes (Tableau 6). Cependant, de même que pour la granulométrie du bois, l'humidité du bois possède plusieurs impacts sur le phénomène de pyrolyse, si bien que ses effets directs seuls sont peu documentés. Notamment, en ne faisant varier que l'humidité de la sciure de hêtre pyrolysée, il a été mis en évidence des différences de température maximale atteinte au niveau du foyer ainsi que de vitesse de pyrolyse (Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L., 1999a). Il est donc

difficile d'imputer les différences de teneurs en composés volatils des condensats obtenus (diminution notable de la production de composés phénoliques pour des bois plus humides) à une action directe de l'humidité, ou à la diminution de température induite.

Tableau 6 : Influence de l'humidité de sciure de bois sur la composition et la qualité organoleptique des condensats de fumée obtenus par pyrolyse

Humidité de la sciure (%)	Rendement de production (mg dans le condensat/100 g de sciure de bois)			Qualité organoleptique du condensat
	Phénols	Acides	Formaldéhyde	
1,8	236	3293	122	Insatisfaisante
21,5	136	3288	81	Bonne
24,5	100	3003	78	Bonne
31,2	33	890	-	Presque satisfaisante

(d'après Gorbatov, V.M. et al., 1963 cité par Maga, J.A., 1987)

II.3. Composition de la fumée d'un point de vue physique

La fumée est un système complexe composé d'une phase continue gazeuse dans laquelle est dispersée une phase particulaire (Foster, W. W. et al., 1961). Ces particules sont principalement des gouttelettes liquides de goudrons formées par nucléation et condensation des molécules issues de la pyrolyse. Elles représentent en moyenne 90% de la masse de la fumée (Rusz, J. & Miler, K.B.M., 1977).

En fonction des conditions ambiantes, les composés de fumée vont se répartir entre les différentes phases. Alors que les molécules les plus lourdes seront presque exclusivement portées par les particules, les composés volatils vont pouvoir se partager entre la phase particulaire et la phase gazeuse. La répartition de ces molécules entre les deux fractions de la fumée suit un équilibre thermodynamique qui peut être changé par modification de l'environnement (principalement en terme de température ambiante). La fumée constitue donc un système en évolution constante (Figure 18). Par exemple, à mesure que la fumée se refroidit en s'éloignant de la source de pyrolyse, les phénomènes de condensation augmentent. Ceci peut entraîner une augmentation de la taille des particules, et un appauvrissement de la phase gazeuse en certains composés (Burtscher, H., 2004). Inversement, en cas d'appauvrissement de la fraction gazeuse au cours du processus de fumage, la phase particulaire va servir de pool de réserve et libérer des composés volatils pour maintenir l'équilibre (Girard, J.P., 1988).

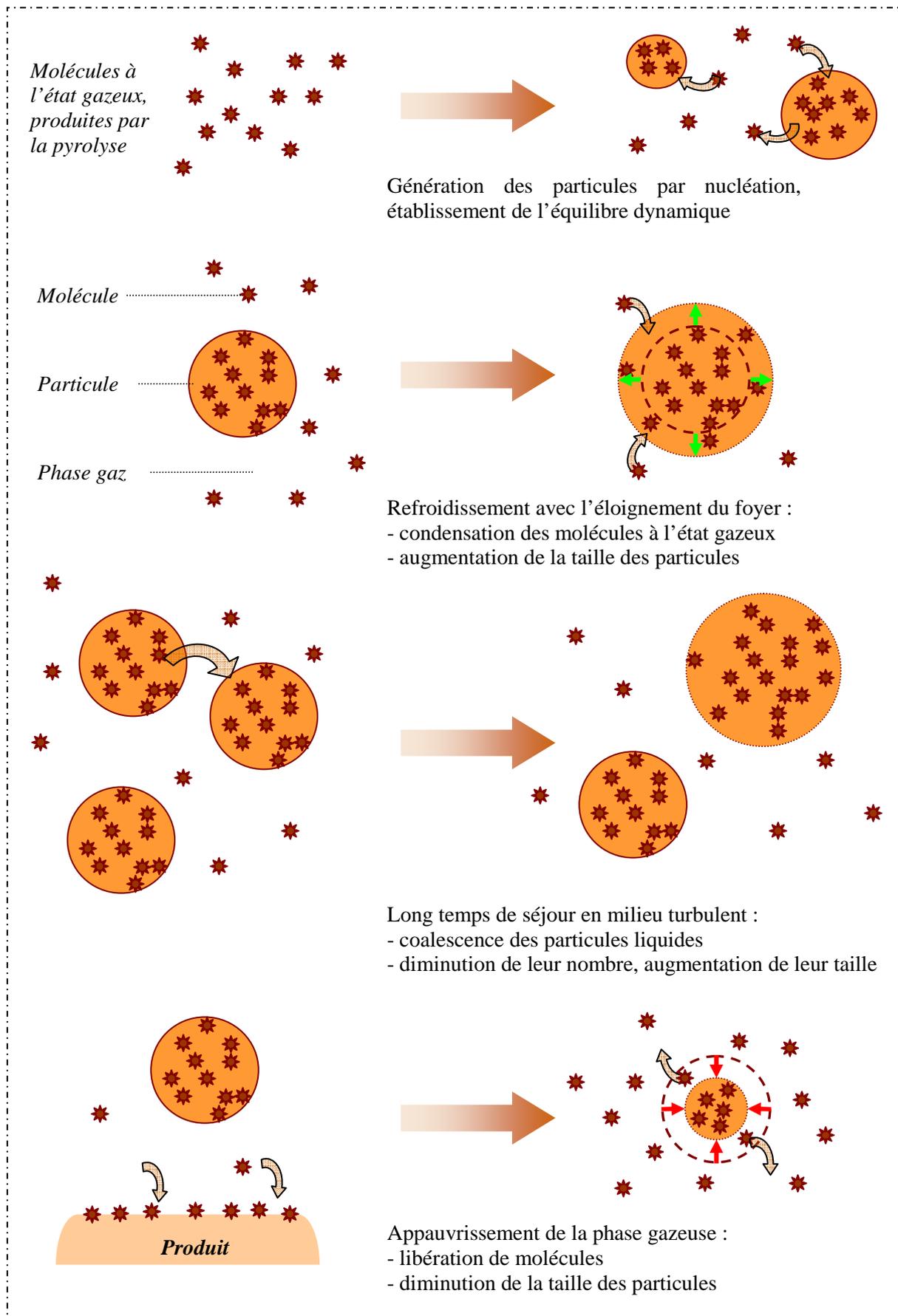


Figure 18 : Évolutions possibles de la fumée au cours du processus de fumage

Bien que la phase particulaire soit plus importante en terme de masse et de richesse en composés volatils (Kornreich, M.R. & Issenberg, P., 1972), il a pu être prouvé que dans le cadre d'un fumage classique, les propriétés aromatisantes et colorantes sont obtenues par l'action de la phase gazeuse. Foster a réalisé une série d'expérience (Foster, W.W. et al., 1961 ; Foster, W.W. & Simpson, T.H., 1961) visant à comparer l'efficacité du fumage classique (exposition du produit à la fumée contenant une phase particulaire et gazeuse) à des fumages partiels (fumée contenant uniquement la phase particulaire ou uniquement la phase gazeuse). Il a ainsi pu être montré que le seul dépôt direct de particules de fumées en surface ne permet pas d'obtenir les caractéristiques d'un produit issu de fumage classique. Inversement, les caractéristiques de produits fumés avec une fumée exclusivement gazeuse tendent vers celles de produits fumés classiquement.

Pour autant, la phase particulaire de la fumée n'en reste pas moins essentielle pour la maîtrise du procédé de fumage. Son rôle secondaire de « réservoir » de la phase gazeuse au cours du procédé rend sa présence et sa concentration déterminante pour le processus de fumage : plus elle est diluée dans de l'air, moins le fumage sera rapide. C'est cela qui explique que le fumage « gazeux » soit plus lent que le fumage « classique », bien qu'ils conduisent à des produits comparables (Foster, W.W. & Simpson, T.H., 1961). De plus, la composition de la phase particulaire reste un bon indicateur de la composition globale de la fumée.

III. Les composés phénoliques

III.1. Généralités

Les composés phénoliques représentent une vaste famille de molécules qui ont une caractéristique commune : la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (O'Connell, J.E. & Fox, P.F., 2001). Ils représentent une très grande diversité et à l'heure actuelle, plus de 8000 composés phénoliques sont connus (Bravo, L., 1998), rendant difficile leur classification. Ils sont habituellement classés en fonction de leur nombre d'atomes de carbones et de leur structure (Figure 19).

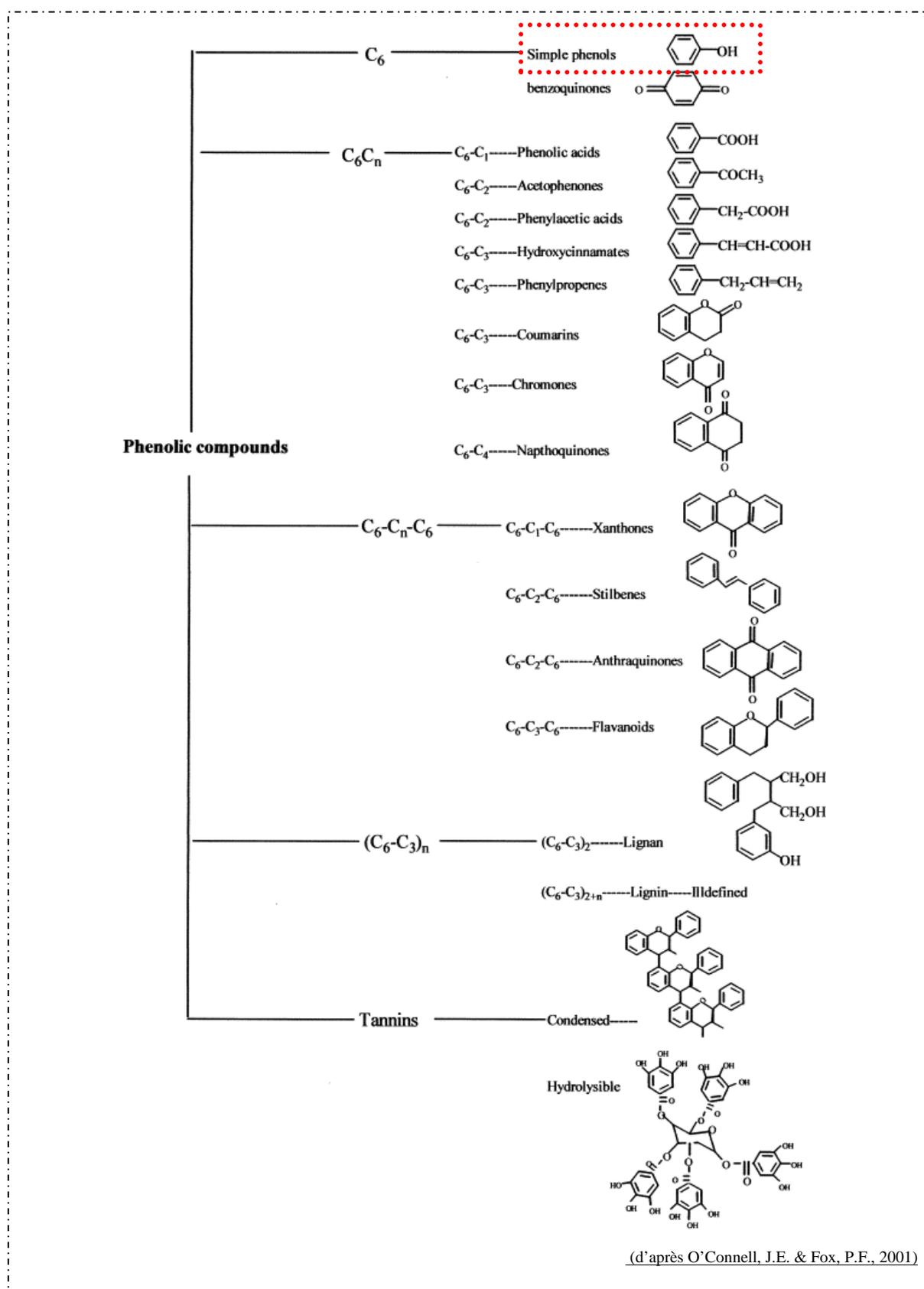


Figure 19 : Classification des composés phénoliques et composés dérivés en fonction de leur nombre de cycles et de leur structure

Un grand nombre de composés phénoliques jouent un rôle déterminant dans les caractéristiques organoleptiques des aliments. Par exemple, les anthocyanes sont responsables des colorations allant du rouge au bleu de certains fruits et de leurs produits dérivés (Heredia, F.J. et al., 2010). Les tanins peuvent quant à eux être responsables de l'astringence des vins par précipitation des glycoprotéines salivaires (Haslam, E. & Lilley, T.H., 1988).

Les composés phénoliques le plus impliqués dans les caractéristiques finales des produits fumés sont des molécules volatiles jouant un rôle dans l'odeur et l'arôme du produit : les phénols simples qui sont principalement de monophénols. On peut distinguer parmi eux plusieurs groupes : « phénol et dérivés » (principalement des dérivés alkylés comme les crésols) ; « guaiacol et dérivés » (dont l'isoeugénol, l'eugénol et dérivés de la vanilline) ; « syringol et dérivés » et enfin « catéchol et dérivés ». On retrouve également dans la fumée d'autres dérivés du phénol comme des acides phénoliques et des esters phénoliques dont il a été vu qu'ils peuvent être des précurseurs des composés phénoliques principaux.

III.2. Propriétés des phénols simples

III.2.1. Toxicité

La première propriété des phénols simples qu'il faut mentionner est leur toxicité. Celle-ci a été largement mise en évidence suite à leur usage à l'état pur par les industries chimiques (par exemple, utilisation du phénol en combinaison avec le formaldéhyde pour produire des résines comme la bakélite, ou utilisation des crésols pour la fabrication d'herbicides).

Leur action se ferait au travers de différents mécanismes de perturbation cellulaire et notamment, en tant qu'agent découplant de la chaîne respiratoire. Ils peuvent capter et faire diffuser des électrons à travers les membranes phospholipidiques, annulant ainsi le gradient de protons transmembranaire mitochondrial ce qui a pour conséquence l'arrêt de la synthèse d'ATP (Norinder, U., et al., 2006 ; Fujita, T., et al., 2001).

Ils peuvent aussi avoir une action génotoxique, en formant des dérivés assez réactifs pour se fixer à la molécule d'ADN après action du cytochrome P-450 (Dean, B.J., 1978). Cependant, il a pu être prouvé par des études menées à partir de condensats de fumées que l'apport des phénols par la consommation d'aliments fumés était largement en dessous des seuils toxiques pour l'Homme (Sternitzke, A. et al., 1992).

Enfin, il a pu être montré que certains composés phénoliques pouvaient subir une nitrosation dans la matrice alimentaire sous l'action de nitrates et nitrites (Leis, J.R. et al.,

1998 ; González-Mancebo, S. et al., 1999), donnant naissance à des ions hydroxyphenyl-diazonium ayant une action génotoxique directe (Ohshima, H. et al., 1989). Cette toxicité induite reste néanmoins négligeable dans les produits de poissons fumés du fait de l'interdiction de l'ajout de sels nitrités dans le poisson qui limite la formation de nitrocomposés.

III.2.2. Actions antimicrobiennes

Bien que les phénols de la fumée ne semblent pas pouvoir avoir d'effet adverse pour la santé humaine (aux doses liées à la consommation de produits fumés), leurs propriétés toxiques leur confèrent des actions désirables vis-à-vis des flores d'altération du poisson. L'étude des activités anti-microbienne des fumées et condensats de fumée ont été réalisés principalement sur les bactéries indésirables typiques des produits de la mer comme *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*.

Il est à présent connu que même si les composés carbonylés et acides organiques jouent un rôle dans les propriétés antimicrobiennes de la fumée, les phénols en sont les principaux responsables (Vitt, S.M. et al., 2001). Ceux-ci ont tendance à se répartir préférentiellement dans la membrane cellulaire, et interagissent avec ses constituants (Lambert, R.J.W., et al., 2001). Ils peuvent ainsi modifier la perméabilité membranaire et entraîner la mort cellulaire en causant l'efflux d'ions K^+ ainsi que d'autres constituants cytoplasmiques dont l'ATP (Brul, S. & Coote, P., 1999). Ce sont les bactéries Gram positives qui sont plus sensibles à ces actions membranaires et il a pu être montré que l'isoeugénol présent dans des fumées liquides (Faith, N.G. et al., 1992) ou que l'eugénol ajouté dans des viandes de boeuf (Hao, Y.Y. et al., 1998) ont sur *L. monocytogenes* un effet non seulement bactériostatique mais aussi bactéricide. Les bactéries Gram négatives étant plus résistantes à ces mécanismes (Suñen, E., 1998), on constate chez elles des effets moins drastiques qui se limiteront à une perturbation du fonctionnement cellulaire (complexation de substrat, inactivation d'enzyme ou chélation de métaux ; Cowan, M.M., 1999).

De plus, l'action antimicrobienne des phénols de la fumée ne se limite pas aux bactéries. En effet, dans le cas de produits comme les fromages dont les flores d'altération sont préférentiellement des moisissures (principalement les *Penicillium*, *Aspergillus* et *Mucor*), la fraction phénolique de la fumée a un effet inhibiteur sur leur développement et leur production de toxines (Wendroff, W.L. & Wee, C., 1997).

On peut enfin noter que ces propriétés des composés phénoliques vis-à-vis des microorganismes s'ajoutent (sans pour autant sembler être synergique) avec les effets bactériostatiques des autres étapes du process comme le salage du filet de poisson (Niedziela, J.C. et al., 1998).

III.2.3. Prévention de l'oxydation

Les acides gras (et principalement les acides gras polyinsaturés) présents dans le filet de poisson gras sont très oxydables. Quelle que soit son mécanisme initiateur (auto oxydation, photo oxydation, oxydation enzymatique, etc.) l'oxydation des acides gras entraîne la libération d'un grand nombre d'aldéhydes, cétones et alcools volatils. Bien qu'une partie de ceux-ci participent à des notes aromatiques « fraîches », ils vont plutôt largement contribuer aux notes indésirables de « rance » (Hsieh, R.J. & Kinsella, J.E.,1989). Or, l'apparition de la rancidité du produit est une donnée à maîtriser car c'est souvent elle qui sera le premier facteur limitant la durée de vie du produit (Frankel, E.N., 1993).

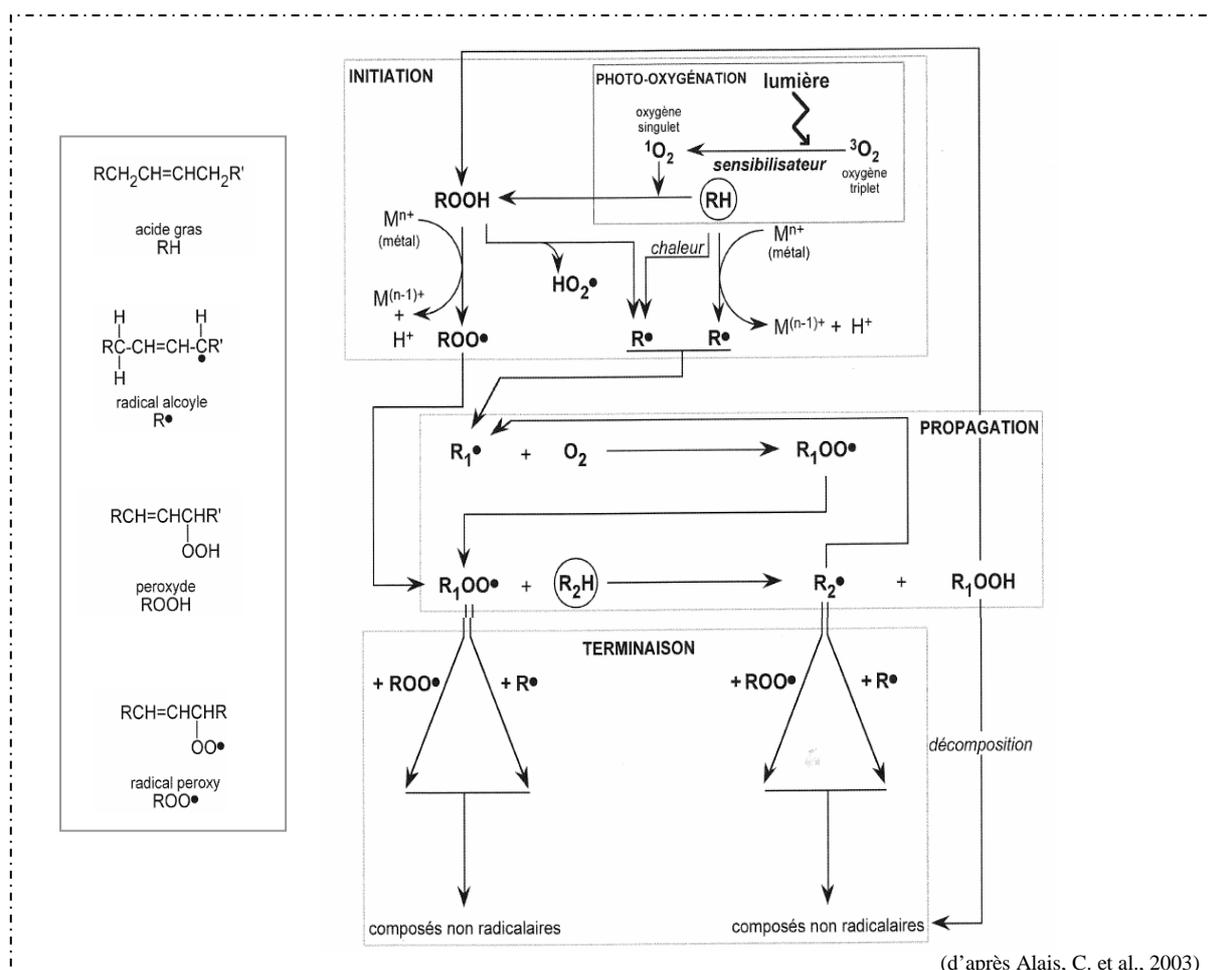


Figure 20 : Mécanisme général des réactions d'oxydation des lipides

Empêcher totalement l'oxydation (Figure 20) dans les produits alimentaire est impossible à réaliser car cela nécessiterait l'élimination de toute trace d'oxygène et de substance oxydante. Cependant, le fumage permet de la ralentir de manière significative. Cet effet a été initialement identifié en 1933 sur du bacon fumé, dont le rancissement de surface apparaissait beaucoup plus tard que pour du bacon frais. Le pouvoir antioxydant de la fumée a par la suite été attribué aux composés phénoliques qu'elle contient. L'activité antioxydante de ceux-ci a alors été largement démontré sur des phénols individuels et en mélange, isolés à partir de fumées (Kjällstrand, J. & Petersson, G., 2001a et 2001b), de fumées liquides (Soldera, S. et al., 2008), des produits d'origine végétale (Lee, S.-J. et al., 2005 ; Tawaha, K. et al., 2007 ; Vichapong, J. et al., 2010), etc.

Les phénols agissent principalement comme des antioxydants « vrais » : en cédant un atome d'hydrogène pour rétablir un radical généré lors de l'initiation de l'oxydation (Figure 21). Ils bloquent ainsi la réaction de propagation (Villière, A., 2005). Bien que le composé phénolique se retrouve alors sous forme radicalaire, celle-ci est stabilisée par des phénomènes de résonance et il n'est donc plus assez réactif pour continuer lui-même la réaction de propagation. Ils peuvent par ailleurs agir « en amont » de la réaction d'oxydation en tant que fixateurs d'espèces réactives comme le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et certains ions métalliques (Yeung, S.Y. et al., 2002).

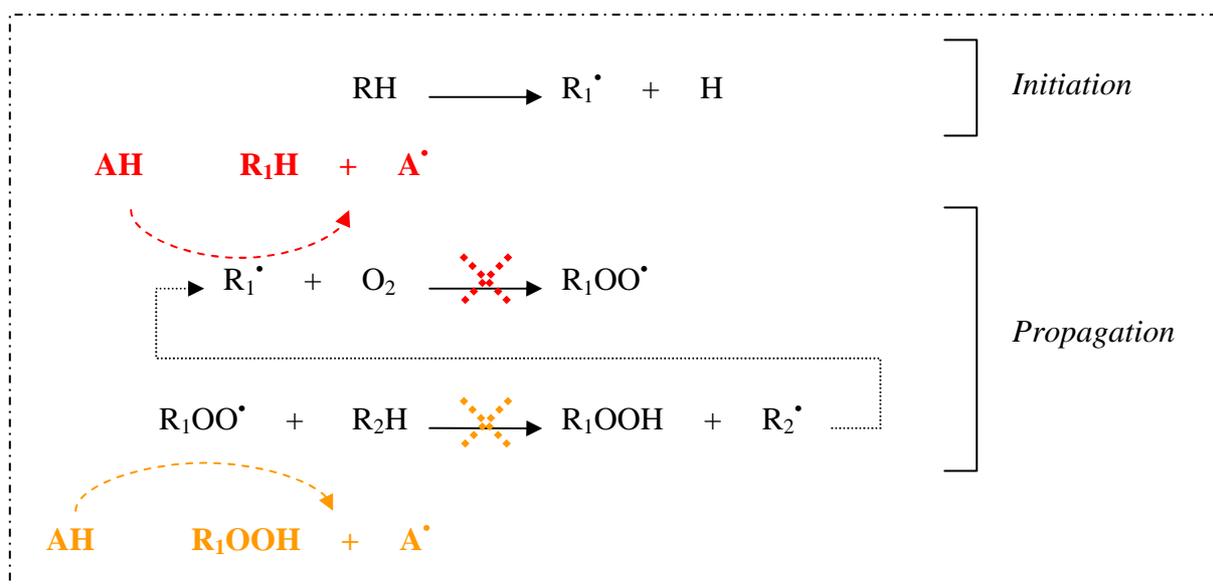


Figure 21 : Mécanisme d'action des phénols (AH) dans l'oxydation lipidique

Il a été reporté de manière générale que les phénols à haut point d'ébullition (comme le syringol et ses dérivés) ou les polyhydroxyphénols (comme le pyrogallol) ont un pouvoir antioxydant plus prononcé. Cependant, la structure des composés est elle aussi déterminante. Par exemple dans le cas de dérivés du guaiacol, syringol et dihydroxybenzenes, un substituant alkyle en position *para* permet d'augmenter l'activité antioxydante, en particulier pour les molécules possédant des double liaisons conjuguées comme l'isoeugénol (Bortolomeazzi, R. et al., 2007).

Il est aussi à noter que dans certaines conditions (principalement dans des fortes concentrations et à forte température) des composés phénoliques peu substitués peuvent perdre leur activité antioxydante, et même jouer un rôle pro-oxydant.

III.2.4. Coloration

Il est généralement admis que les phénols participent à la coloration finale du produit de fumage. Cependant, leur rôle semble rester marginal en comparaison des nombreux autres facteurs impliqués. Bien entendu, la couleur originelle du filet frais est déterminante, et donc l'espèce du poisson considéré ainsi que son état physiologique (Sainclivier, M, 1985a). Les étapes technologiques précèdent le fumage peuvent avoir un impact significatif sur la couleur, notamment le salage. Par exemple, une injection de saumure augmentera la teneur en eau du filet, ayant un effet de « dilution » sur les caroténoïdes de la chair de poisson, et l'éclaircissement de celle-ci (Birkeland, S. et al., 2004). Mais aussi, un salage à sec trop rapide diminuera la brillance finale du produit par des phénomènes de croûtage de surface.

Lors du fumage à proprement parler, la couleur du filet est modifiée par différents phénomènes, physiques et chimiques (Clifford, M.N. et al., 1980). D'une part, les particules de fumée liquide (dont la couleur peut aller du jaune orangé au brun noir) vont pouvoir colorer le produit par simple dépôt gravimétrique.

D'autre part, une partie des molécules de la fumée peut réagir avec les constituants du muscle et générer *in situ* des composés colorés. Notamment, les réactions de Maillard ayant lieu entre les acides aminés des protéines de poisson (principalement la lysine ; Chen, L.-B. & Issenberg, P., 1972) et les composés carbonylés de la fumée aboutissent à la formation de mélanoidines colorées. Les composés phénoliques possédant une fonction carbonyle (comme le syringaldéhyde) vont donc avoir une influence directe, bien que marginale, sur la production de composés colorant par l'intermédiaire de ces réactions.

Par ailleurs, les composés phénoliques et carbonylés peuvent réagir entre eux pour former des substances résineuses réticulées, les phénoplastes (Figure 22). Cette polymérisation de surface participe directement à l'aspect brillant des produits fumés (Girard, J.P., 1988).

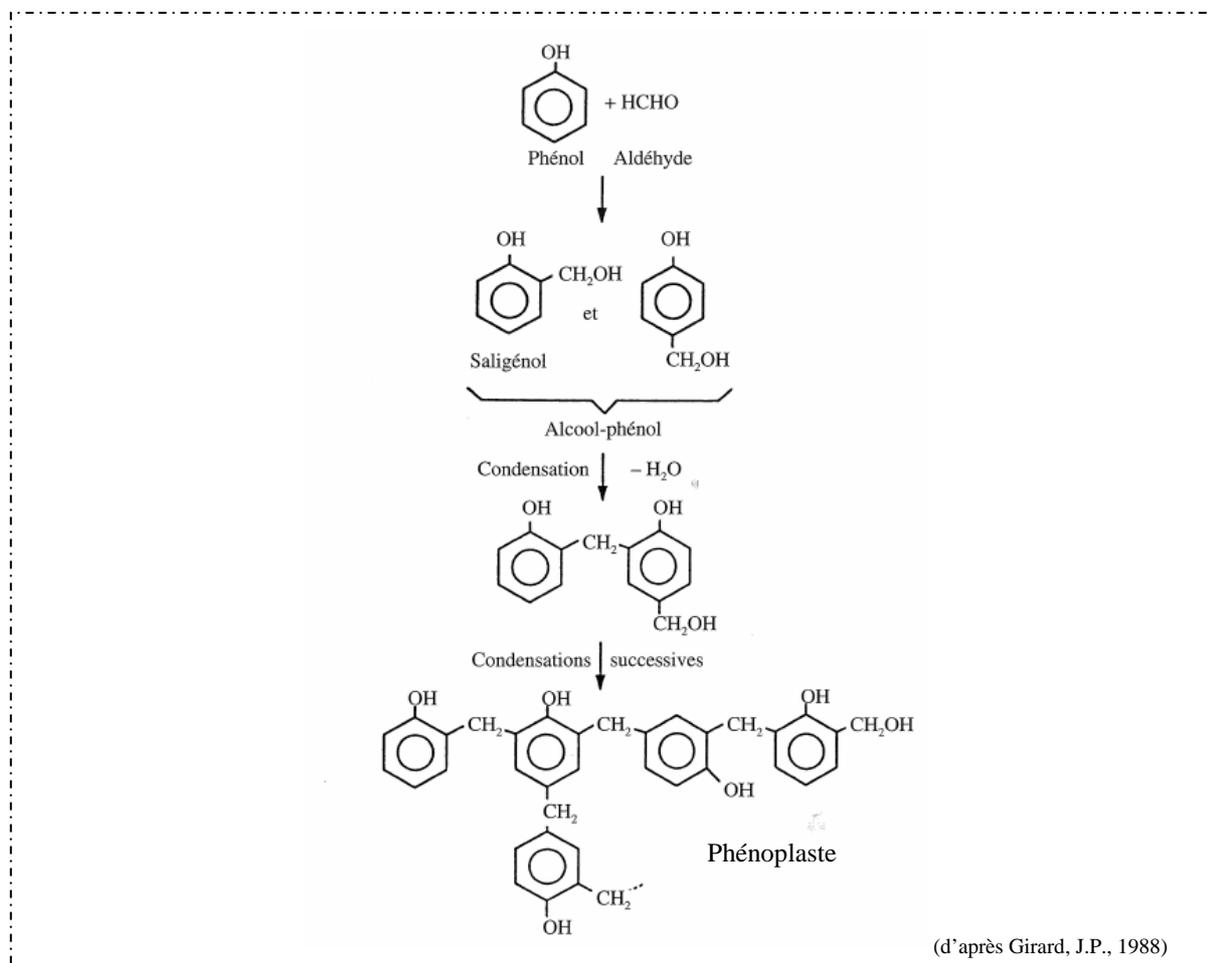


Figure 22 : Mécanisme de formation des phénoplastes par réaction entre aldéhydes et phénols

III.2.5. Aromatisation

Depuis longtemps, les phénols de la fumée ont été décrits comme étant responsables de l'odeur caractéristique de fumée (Hamm, R., 1977, Maga, J.A., 1987). De nombreuses études ont été menées qui ont démontré l'importance odorante des composés phénoliques à travers différentes stratégies d'étude : individuellement, en mélanges ou dans des milieux complexes.

Des études ont été menées pour établir les caractéristiques odorantes individuelles des phénols retrouvés dans la fumée (Tableau 7). Que ce soit par analyse olfactométrique ou par

évaluation sensorielle après dilution dans des milieux simples, ce type de données montre parmi les phénols simple une grande diversité de notes aromatiques, plus ou moins proches de l'odeur de fumée.

Tableau 7 : Caractéristiques odorantes de composés phénoliques

Composés phénoliques	Seuils de perception odorants		Odeurs	
	dans l'eau ($\mu\text{g/L}$)	Réf.	Descripteurs (matrice)	Réf.
Phénol	5900	a	Phénolique (raisin)	e
o-crésol	650	a	Piquant (fumée)	f
m-crésol	680	a	Piquant (fumée)	f
p-crésol	55	b	Animal (fromage)	g
Guaïacol	3 à 21	a	Fumé (fromage)	g
4-methylguaïacol	90	a	Fumé (fumée)	f
4-ethylguaïacol	50	c	Épice, coco (vin)	h
4-vinylguaïacol	3	b	Phénolique (raisin)	e
Vanilline	20 à 200	a	Vanille (raisin)	e
Syringol	1850	a	Chimique (vin)	i
Eugénol	6 à 30	d	Phénolique, floral (raisin)	e

(D'après (a)-Fazzalari, F.A., 1978 ; (b)-Buttery, R.G. et al., 1988 ; (c)-Swan, J.S. & Burtles, S.M., 1978 ; (d)-Buttery, R.G. et al., 1990 ; (e)-López, R. et al., 2004 ; (f)-Maga, J.A., 1987 ; (g)-Frank, D.C. et al., 2004 ; (h)-Charles, M. et al., 2000 ; (i)-Ferreira, V. et al., 2002, cités par Varlet, V., 2007b)

Cependant, l'évaluation des propriétés odorantes de composés individuels s'avère insuffisante dans le cas de produits à l'arôme complexe contenant de nombreux composés volatils. En effet, la perception d'une odeur est générée lors de l'activation des récepteurs olfactifs (situés sur le plafond de la fosse nasale, au niveau de l'épithélium olfactif) par les molécules volatiles. L'activation des récepteurs se fait de manière pseudo-spécifique : un récepteur peut être activé par de nombreuses molécules et chaque molécule peut se fixer à plusieurs récepteurs. Dès lors que l'odeur est constituée par un mélange de composés volatils, des phénomènes d'interactions apparaissent : antagonismes et compétitivités vis-à-vis des récepteurs (Oka, Y. et al, 2004). Un mélange odorant n'est donc jamais perçu comme la simple somme des odeurs de ses constituants, et il est globalement impossible d'identifier une molécule spécifique dans un mélange présentant plus de quatre composés odorants (Livermore, A. & Laing, D.G., 1998 ; Jinks, A., & Laing, D.G., 2001).

C'est pourquoi les études menées sur les qualités aromatiques de l'ensemble de la fraction phénolique après son isolation sont intéressantes : elles prennent simultanément en compte un plus grand nombre de molécules odorantes (Fujimaki, M. et al., 1974 ; Olsen, C.Z., 1977). Il a ainsi pu être montré que cette famille de composés constitue bien la « base » de l'arôme de fumée et qu'elle permet d'obtenir les principales notes aromatiques caractéristiques de la

fumée. Cependant, l'ajout d'autres types de composés reste nécessaire pour parvenir à une qualité d'arôme satisfaisante (Tableau 8).

Tableau 8 : Rôle aromatique de différentes fractions de fumée

Fractions de fumée	Arôme	Qualité aromatique
Phénolique	Fumé monotone	Bonne
Phénolique + Carbonylé	Fumé parfumé	Très bonne
Phénolique + Carbonylé + Non carbonylé	Fumé parfumé	Excellente
Phénolique + Neutre + Basique	Fumé brûlé	Excellente

(d'après Fujimaki, M. et al., 1974)

Par ailleurs, certains des travaux les plus cités sur les composés odorants issus de la fumée ont porté sur l'évaluation sensorielle de fractions phénoliques obtenues par distillation de fumées liquides à différentes températures (Maga, J.A., 1987 ; Tóth, L. & Potthast, K., 1984) :

- la fraction isolées entre 60 et 90°C (dont : phénol, crésols, guaiacol, 4-méthylguaiacol et 4-éthylguaiacol) a une flaveur décrite comme « chaude et amère »;

- celle obtenue entre 91 et 132°C (principalement : syringol, méthylsyringol, (E) et (Z)-isoeugénol) a une flaveur caractéristique de fumée et représente donc la part la plus déterminante de son arôme ;

- la fraction distillée entre 133 et 200°C a des propriétés « chimiques et acides » jugées de qualité médiocre pour un produit de fumage.

Cependant, ces classes sont à relativiser en regard des résultats parfois contradictoires obtenus par d'autres auteurs travaillant également sur les différentes fractions de la fumée. Notamment, alors que certains auteurs soulignent l'importance des notes apportées par les dérivés du guaiacol (Fiddler, W. et al., 1970 ; Lustre, A.O. & Issenberg, P., 1970), d'autres considèrent leur influence comme peu significative (Kostyra, E. & Baryłko-Pikielna, N., 2006). De même pour le syringol et ses dérivés qui ont été pointés dans certains cas comme étant les composés odorants les plus importants de l'arôme de fumée (Kim, K. et al., 1974 ; Olsen, C.Z., 1977) et dans d'autres comme n'étant pas réellement déterminants (Kostyra, E. & Baryłko-Pikielna, N., 2006). Les phénols de plus faible masse moléculaire (phénol et crésols) ont aussi donné lieu à des controverses puisque leurs contribution sensorielle a pu être décrite comme négative (Kim, K. et al., 1974) ou positive (Kostyra, E. & Baryłko-Pikielna, N., 2006) dans différentes études.

Plus récemment, l'utilisation de méthodes « d'omission » a permis de préciser le rôle des composés phénoliques au sein du mélange complexe des composés aromatiques de la fumée. Ces méthodes consistent à utiliser la chromatographie en tant que méthode préparative afin d'éliminer spécifiquement une ou plusieurs molécules d'un extrait aromatique. C'est le cas de la technique appliquée par Varlet, V. (2007b) aux composés aromatiques de fumées liquides : le GC-COOL (« Gaz Chromatography - Concentration Omission of Odorants at Liquid state »).

Dans un premier temps, des extraits aromatiques de fumée liquide sont obtenus et injectés en chromatographie en phase gazeuse. En sortie de colonne, une vanne permet d'aiguiller les effluents vers un piège frigorifique ou vers la sortie. Après élution de l'ensemble de l'extrait, le piège contient l'ensemble de l'extrait aromatique, moins les composés sélectivement exclus. Les différents extraits (extrait complet et extraits avec différentes combinaisons de composés volatils éliminés) sont ensuite évalués et comparés par un panel sensoriel entraîné, après déposition sur une matrice de poisson frais. Ainsi, c'est l'ensemble des interactions potentielles qui sont théoriquement prises en considération : à la fois celle des molécules odorantes avec la matrice, mais aussi celles des molécules odorantes entre elles (au niveau de l'épithélium olfactif).

Ces travaux ont permis de confirmer l'importance de la contribution des composés phénoliques à l'odeur des produits fumés, tout en détaillant partiellement leurs influences individuelles. Ainsi, le o-crésol et p-crésol participent à l'odeur globale de fumée, et pas uniquement aux notes « chaudes » et « amères » qui leur sont souvent associées. Par ailleurs, le guaïacol, le syringol et le p-crésol sont les composés testés dont l'élimination cause la plus grande perte de qualité aromatique de l'extrait d'origine. Pourtant les notes aromatiques altérées par leur suppression ne sont pas celles qui leur sont associées individuellement. Par exemple : la perte du guaïacol, perçu individuellement comme « fumé » entraîne surtout une diminution des notes de « gras » de l'extrait aromatique.

Bien qu'elles puissent être contradictoires, en particulier concernant sur le rôle individuel de chaque phénol, les données disponibles relatives à leur contribution à la flaveur de fumée convergent toute à la même conclusion : les phénols constituent la famille chimique clef des propriétés sensorielles des produits de fumage.

III.2.6. Interactions avec la matrice poisson

Bien qu'il ait été prouvé que c'est par l'intermédiaire de la phase gazeuse que les phénols de la fumée se déposent sur la surface des produits, les phénomènes de sorption mis en jeu

n'ont que très peu été étudiés. De fait, les données disponibles concernant l'adsorption, l'interaction et la pénétration des composés de la fumée avec les différents composants de filet de poisson sont limitées et parfois contradictoires.

Selon certains auteurs (Foster, W.W. & Simpson, T.H., 1961 ; Rusz, J. & Miler, K.B.M., 1977 ; Sainclivier, M., 1985b) c'est la teneur en eau du produit qui est le facteur déterminant : la fraction volatile de la fumée n'interagirait qu'avec l'eau, tandis que les gouttelettes de fumée liquides ne se déposeraient que sur des surfaces sèches. Ainsi, le début du fumage serait principalement « chimique » avec des phénomènes de sorption moléculaires et la fin du fumage (après déshydratation de surface du produit) impliquerait principalement du dépôt particulaire. Certains auteurs considèrent ainsi que la plus rapide coloration observée chez les filets de poisson les plus humides est due à un passage plus efficace des composés colorants dans le produit (carbonyles et phénols). C'est pourquoi pour la plupart de ces études, les auteurs utilisent exclusivement des phases aqueuses pour simuler des processus de fumages et piéger la phase gazeuse de fumées.

Il est généralement bien admis que la vitesse d'enrichissement en composés de fumée est élevée en début de fumage et décroît au cours du temps (Foster, W.W. & Simpson, T.H., 1961 ; Girard, J.P., 1988). Pourtant, la raison de ce phénomène et le rôle éventuel de l'eau ne sont pas clairement établis. Il pourrait s'agir d'une part d'une déshydratation de surface progressive qui tend à limiter les phénomènes de sorption. D'autre part, cela pourrait être dû à une saturation de surface en composés de la fumée. Dans ce cas là, ce sont les phénomènes de diffusion internes qui deviendraient le facteur limitant : à mesure que les molécules adsorbées en surface migrent vers le cœur du produit, celles de la phase gazeuse peuvent se déposer à leur tour.

Il a pu être montré par ailleurs que le taux de lipides dans le poisson pouvait influencer la teneur du produit en composés de la fumée, mais les données disponibles sont contradictoires. Pour certains auteurs (Cardinal, M. et al., 2001 ; Birkeland, S. et al., 2004), une augmentation de la teneur en lipides de la matrice s'accompagne d'une diminution des teneurs en phénols obtenues après fumage. En effet, une matrice contenant plus de lipide contient proportionnellement moins d'eau, ce qui limite d'autant la capacité de rétention en phénols de celle-ci. D'autres, à l'opposé constatent une plus forte teneur en phénols dans des produits plus gras (Rusz, J. & Miler, K.B.M., 1977). Ceci s'expliquerait non pas par les phénomènes de sorption et diffusion à l'échelle moléculaire, mais par les dépôts particuliers : lorsque le

produit a été partiellement déshydraté, la présence de lipides en surface augmenterait le dépôt des particules de fumées.

Les études menées pour tenter d'appréhender des phénomènes de sorptions comparables utilisent principalement des flux de gaz enrichis dans lesquels baigne la matrice d'étude. Après un temps de contact défini, une extraction de la matrice est réalisée pour déterminer la quantité de composés passés de la phase gaz à la matrice (Górna-Binkul, A. & Buszewski, B., 1997).

Les phénomènes se produisant après passage des composés phénoliques vers le filet de poisson sont encore moins bien connus. La plupart des études disponibles dans la littérature portent sur les interactions entre les composés volatils et les protéines dans des milieux aqueux modèles (Seuvre, A.-M. et al., 2006 ; Pérez-Juan, M. et al., 2007). En comparant les quantités de composés volatils apparaissant dans l'espace de tête au dessus de la solution en présence et en absence de ligand protéique, il est possible de déterminer si une partie des composés volatils est retenue par les protéines. Il est aussi possible d'étudier en s'intéressant aux modifications structurales ou conformationnelles induites chez les protéines, par exemple par des dosages de groupements fonctionnels ou par suivi de la fluorescence du tryptophane (Rawel, H.M. et al., 2006).

Ces expériences ont été principalement mises en place pour des aldéhydes dont la capacité à réagir avec les protéines est largement documentée. Ainsi, de nombreuses protéines extraites de matrices alimentaires ont pu être testées dont la viande (Pía Gianelli, M. et al., 2005), le lait (Meynier, A. et al., 2004) ou encore le poisson (Chopin, C. et al., 2007). Il a ainsi pu être montré que parmi les protéines de muscle de porc, les propriétés de liaison aux aldéhydes étaient différentes et variaient avec les conditions de mise en solution. La fraction sarcoplasmique se révèle plus apte à former des liaisons que les protéines myofibrillaires (Pérez-Juan, M. et al., 2006). Les rares phénols simples à avoir été inclus dans ces études sont ceux qui possèdent des fonctions carbonyles, notamment la vanilline (Burova, T.V. et al., 2003).

Bien que certaines données soient disponibles sur les interactions de composés phénoliques avec des ligands protéiques, celles-ci sont difficilement extrapolables au contexte du fumage. Il s'agit principalement de phénols complexes issus de plantes (flavonoïdes, tannins, etc.) interagissant avec des protéines variées (végétales, laitières, salivaires, bovines) mettant en évidence des formations de liaisons hydrophobes ou covalentes (Yuksel, Z. et al.,

2010 ; Rawel, H.M. et al., 2002 ; Obreque-Slier, E. et al., 2010 ; Kroll, J. & Rawel, H.M., 2001).

On peut noter tout de même l'étude de Chen, L.B. & Issenberg, P. (1972) qui ont montré que la fraction phénolique isolée de la fumée pouvait réagir avec les groupements animés de protéines. Cependant, les auteurs eux-mêmes soulignent que la dénomination de « fraction phénolique » n'implique pas que celle-ci ne contienne que des composés phénoliques. Les effets constatés peuvent provenir de composés non-phénoliques présents, et notamment des composés carbonylés (ou plus probablement encore, des phénols possédant des fonctions carbonyles). Ces résultats n'indiquent donc pas nécessairement qu'il existe des interactions entre les phénols simples et les protéines. Par ailleurs, certains auteurs (Sainclivier, M. 1985b) considèrent qu'il est impossible pour certains phénols d'interagir avec les composants du poisson : les phénols possédant une substitution en position para sur leur cycle.

III.3. Techniques d'analyse des phénols simples

III.3.1. Analyses spécifiques des composés phénoliques

Il est possible d'envisager l'analyse de la fraction phénolique issue de la fumée seule, grâce à des méthodes d'isolation sélective et d'analyse spécifique (Figure 23).

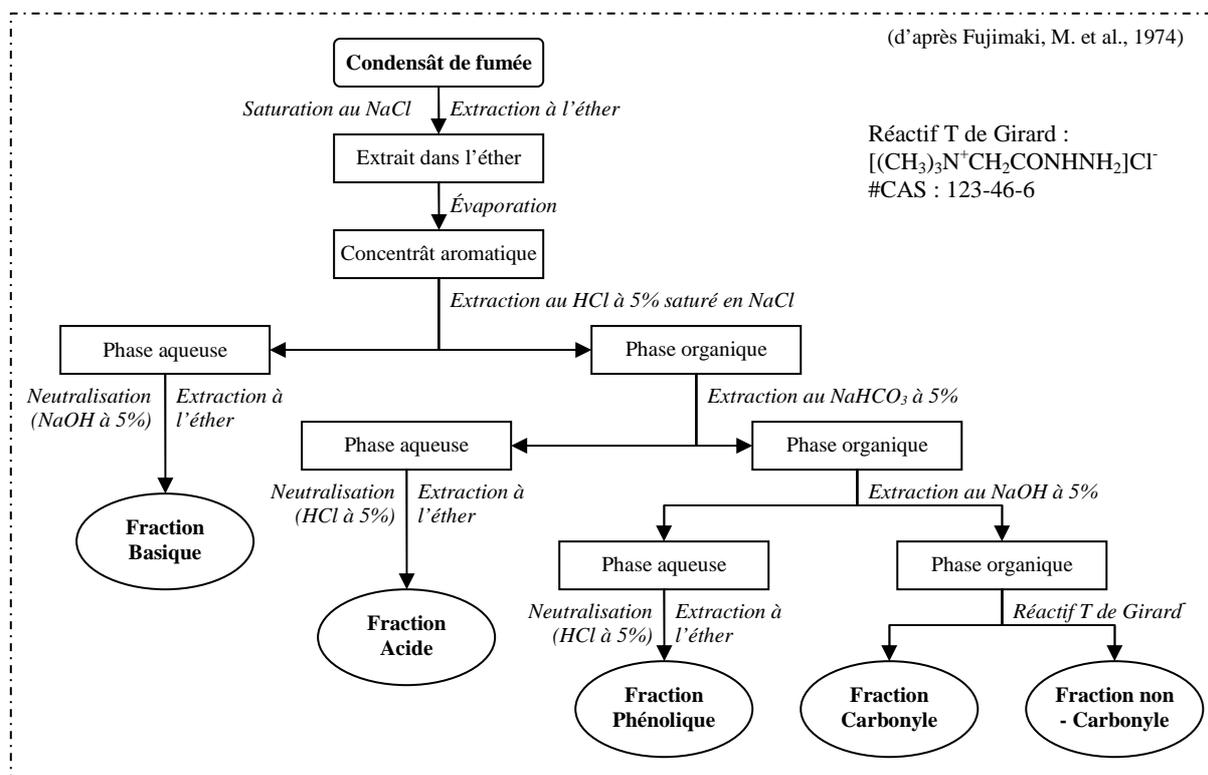


Figure 23 : Fractionnement des composés volatiles de condensats de fumée

Ainsi, des protocoles d'extraction ont été élaborés qui permettent d'analyser indépendamment les différentes fractions de condensats de fumée (Fujimaki, M. et al., 1974). Le dosage des composés phénoliques totaux dans la fraction isolée peut alors être réalisé notamment par spectrophotométries : après développement d'une coloration avec la 4-aminoantipyridine (4-amino-2,3-diméthyl-1-phényl-3-pyrazolin-5-one ; #CAS : 83-07-8) en présence de ferricyanure de potassium (AFNOR, 1996 ; Cardinal, M. et al., 2004).

III.3.1. Analyses des composés volatils

Il existe de nombreuses techniques d'analyse des composés volatils constituant l'arôme des aliments. Celles-ci ont pu être appliquées avec succès à l'étude des composés volatils des produits de fumage, et en particulier des composés phénoliques simples. Nous verrons que les techniques classiques d'analyse des composés volatils sont parfaitement applicables à l'étude des composés phénoliques, bien qu'elles puissent spécifiquement y être adaptées.

III.3.1.1. Extraction des composés volatils

III.3.1.1.1. Extraction depuis le produit

Comparativement à la distillation classique, où l'échantillon est simplement chauffé pour en vaporiser les molécules aromatiques, l'hydrodistillation sous vide (DSV) ou à pression réduite possède l'avantage de diminuer les températures d'ébullition dans le système. Ceci permet de limiter l'altération des constituants de la matrice et la génération d'artefacts au cours de l'extraction. Les composés volatils vaporisés depuis le produit passent dans des pièges cryogéniques (par exemple des doubles enveloppes contenant de l'azote liquide) placés en série. Les composés recondensés dans les pièges sont ensuite récupérés par des rinçages aux solvants organiques qui sont ensuite concentrés par évaporation partielle. Bien que cette méthode soit efficace (Stephan, A. et al., 2000 ; Lee, G.H. et al., 2001) elle nécessite de longs temps d'extraction ainsi que des grands volumes de solvants.

L'extraction-distillation simultanée (SDE - « Simultaneous Distillation-Extraction ») permet de réduire les quantités de solvants nécessaires par rapport à la DSV. Elle repose sur l'utilisation d'un appareil mis au point par Likens et Nickerson (Figure 24) et d'un solvant volatil non miscible dans l'eau (Likens, S.T. & Nickerson, B., 1964). L'échantillon aqueux et le solvant volatil sont portés à ébullition dans des ballons séparés et leurs vapeurs sont

mélangées dans le corps de l'appareil. Les vapeurs de solvant se chargent en composés volatils issus de l'échantillon avant d'être condensées par le système réfrigérant. La partie basse de l'appareil permet le recyclage du solvant et de l'eau condensés vers les ballons d'origine *via* un système de siphons. La séparation de phase empêche le mélange de l'échantillon et du solvant d'extraction. Le système étant fermé et le recyclage permanent, on aboutit à l'appauvrissement progressif de la phase aqueuse en composés volatils, au fur et à mesure que ceux-ci passent dans la phase organique.

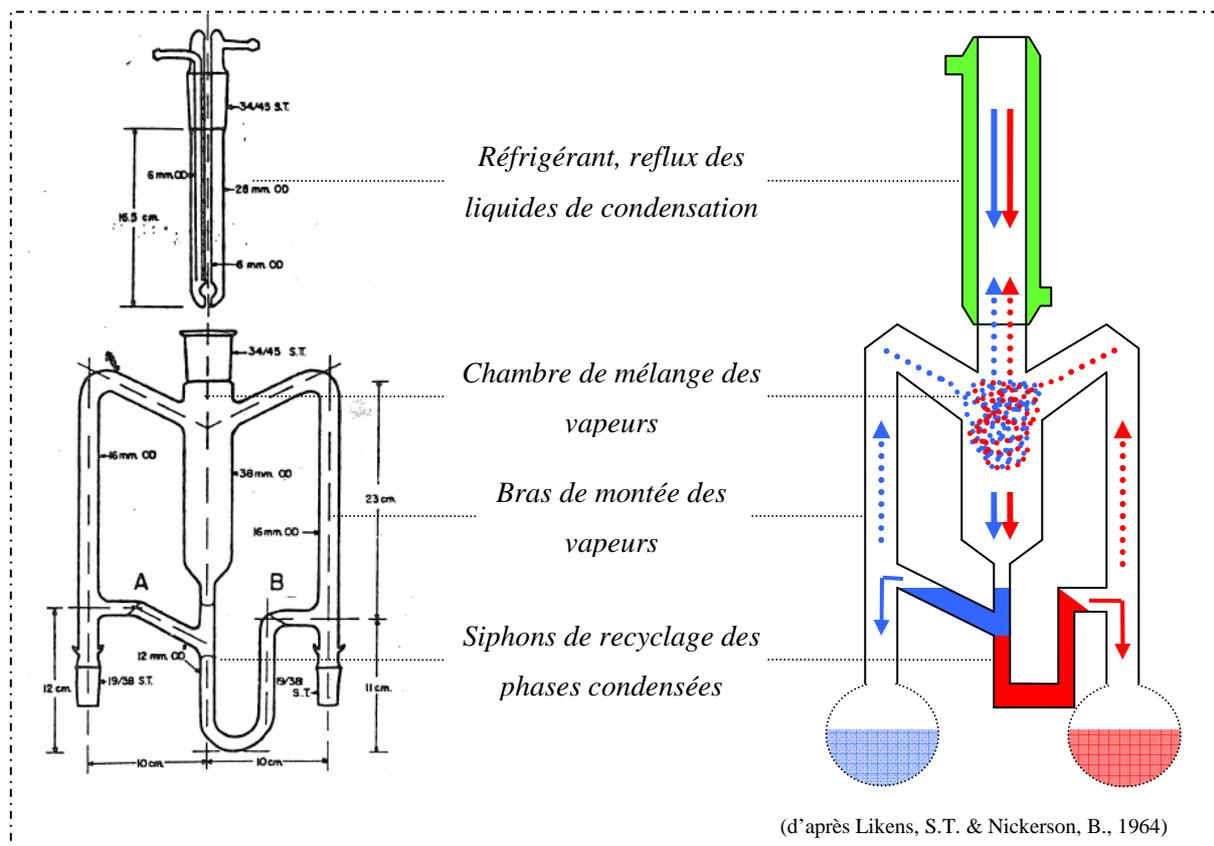


Figure 24 : Appareil de Likens-Nickerson et schéma de principe associé

Même si les volumes de solvant de récupération sont plus faibles que pour la DSV, une étape de concentration ultérieure reste nécessaire, pendant laquelle une partie des analytes volatils peuvent être perdus. Cette perte en composés volatils doit être minimisée par l'emploi de solvants volatils et de méthodes adaptées comme la distillation sur colonne Vigreux, la concentration par l'appareil de Kuderna-Danish ou l'évaporation sous courant d'azote gazeux (Fernandez, X. & Cabrol-Bass D., 2007).

L'évaporation de flaveur assistée par solvant (SAFE - « Solvent Assisted Flavor Evaporation ») est une technique alternative pour obtenir des extraits aromatiques (Engel, W. et al., 1999). Un appareillage spécifique permet de placer l'échantillon sous vide (10^{-3} Pa) avec chauffage modéré (30 °C) pour en extraire spécifiquement les composés les plus volatils, tout le limitant leur condensation à l'intérieur du montage. Ils sont piégés en sortie dans des pièges refroidis à l'azote liquide. Le principal avantage de cette méthode est la réduction des artefacts liés au chauffage et aux molécules peu volatiles co-extraites avec d'autres méthodes qui utilisent des températures plus élevées. Elle reste cependant peu utilisée car elle nécessite l'emploi d'un dispositif spécifique complexe et conduit à la production d'extraits en phase aqueuse qui doivent subir des étapes d'extraction ultérieures pour pouvoir être analysés.

III.3.1.1.2. Extraction depuis l'espace de tête

Les analyses de l'espace de tête permettent de se rapprocher des conditions de flairage d'un produit alimentaire par un individu. En effet, elles permettent d'étudier les molécules volatiles présentes dans l'air au dessus du produit et qui constituent son odeur. Ces méthodes possèdent globalement les mêmes avantages : absence de solvant, rapidité d'extraction, facilité de mise en place et préparation d'échantillon réduite. L'échantillon est placé dans un flacon hermétique contenant un certain volume d'air. Une partie de ses composés volatils va passer dans la phase gazeuse présente autour du produit : l'espace de tête. Ce sont ces molécules passées à l'état gazeux qui sont étudiées.

Originellement, il existe deux approches de l'analyse de l'espace de tête. En mode « statique », l'extraction est réalisée après une durée d'incubation nécessaire à l'établissement de l'équilibre thermodynamique entre le produit et l'espace de tête. La technique « d'espace de tête direct » (DHS - « Direct Headspace » ou SHS - « Static Headspace Sampling ») consiste à prélever une fraction de l'espace de tête à l'équilibre (à l'aide d'une seringue à gaz) et à l'injecter directement en chromatographie. Malgré une très grande simplicité, cette technique reste peu utilisée à cause de sa faible sensibilité (Bart, J.C.J., 2001), ce qui est particulièrement problématique pour l'analyse des arômes où les molécules les plus influentes peuvent se trouver à l'état de trace.

En mode « dynamique », un gaz inerte est employé pour entraîner les composés de l'espace de tête vers un piège où ils sont retenus (souvent un adsorbant maintenu à faible température). L'équilibre entre l'échantillon et l'espace de tête étant en permanence déplacé vers l'espace de tête, il en résulte un appauvrissement du produit en composés volatils (Figure

25). A la fin de l'extraction et après séchage du piège, celui-ci est chauffé pour libérer les analytes retenus qui sont alors envoyés vers le système de chromatographie. La méthode de « purge and trap » (P&T) fonctionne sur ce principe et a pu être employée sur différents produits fumés avec succès (Cardinal, M. et al., 1997 ; Jørgensen, L.V. et al., 2001).

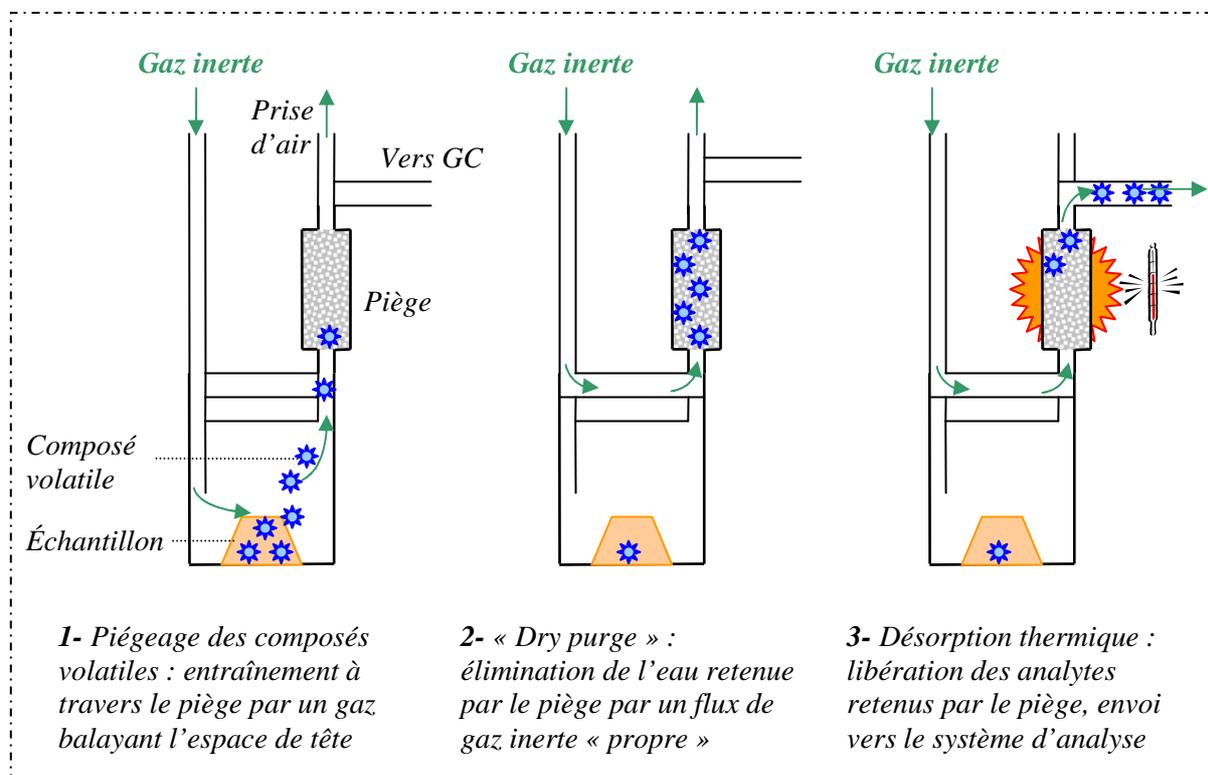


Figure 25 : Déroulement simplifié d'une extraction d'espace de tête dynamique

Les techniques de sorption directe dans l'espace de tête peuvent être considérées comme étant à l'interface des techniques « dynamiques » et « statiques ». Elles piègent directement les molécules volatilisées sur un polymère adsorbant placé dans l'espace de tête, par des phénomènes d'interactions réversibles (de type Van der Waals et électrostatiques). Elles aboutissent à l'établissement d'un équilibre (produit / espace de tête / polymère) tout en permettant une concentration des analytes pour améliorer leur sensibilité. Parmi ces méthodes, la micro-extraction en phase solide de l'espace de tête (HS-SPME - « HeadSpace Solid Phase MicroExtraction ») est à notre connaissance la seule utilisée pour les produits alimentaires fumés (Sérot, T. & Lafficher C., 2003 ; Gómez-Estaca, J. et al., 2011 ; Guillén, M.D. & Errecalde, M.C., 2002b ; Guillén, M.D. et al., 2006).

La fibre SPME utilisée pour l'extraction est constituée d'un support de silice inerte sur lequel est fixée une couche d'un polymère dont la polarité est variable (selon la nature de la

fibre utilisée). Elle est introduite dans l'espace de tête à l'équilibre pendant une durée qui permet aux molécules volatiles de s'y adsorber. Une fois la fibre « chargée » en composés d'arôme, elle est introduite directement dans l'injecteur du chromatographe, libérant les analytes par désorption thermique.

La HS-SPME se révèle plus sensible que le SHS car elle concentre partiellement les molécules à analyser en les accumulant sur la fibre. Elle est par ailleurs plus facile à mettre en place que le « purge and trap ». Cependant, comme elle repose sur l'établissement d'un équilibre entre plusieurs phases, elle n'est que semi-quantitative. Ainsi, une attention particulière doit être portée à l'optimisation de l'extraction, car l'efficacité de la méthode repose sur divers paramètres, dont principalement : la nature du polymère utilisé, la température de l'espace de tête, les durées d'équilibre et d'extraction, la quantité d'échantillon, etc.

La composition en des composés volatils de poissons fumés a notamment été étudiée après extraction avec des phases de type DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane) (Gómez-Estaca, J. et al., 2011), mais les quelques études ciblant plus spécifiquement les composés phénoliques ont mentionné une meilleure efficacité des fibres en polyacrylate (PA) (Guillén, M.D. & Errecalde, M.C., 2002b ; Sérot, T. & Lafficher C., 2003 ; Guillén, M.D. et al., 2006). Globalement, les temps d'extractions utilisés sont de l'ordre de l'heure, avec une température d'incubation de 50 °C qui permet de limiter l'altération du produit et l'apparition de composés néoformés.

III.3.1.1.3. Représentativité des extraits aromatiques

Les extraits aromatiques comportent couramment un très grand nombre de composés issus du produit d'origine. Or, du fait des disparités de seuils de perception, ce ne sont pas les composés majoritaires qui contribuent le plus fortement à l'odeur du produit. De même, du fait des synergies et compétitivités se produisant au niveau des récepteurs olfactifs, les composés le plus odorants ne seront pas les seuls à déterminer l'odeur du produit. Dans ces conditions, on comprend qu'il est important de pouvoir garantir que les extraits étudiés possèdent des caractéristiques sensorielles proches de celle du produit étudié.

La représentativité odorante d'extraits aromatiques est évaluée par des panels d'analyse sensorielle avec des tests d'appariement ou de similarité, le produit d'origine pouvant servir de référence. Elle permet de sélectionner la méthode et les conditions d'extraction qui

préservent le mieux l'intégrité de l'odeur (ou de l'arôme si elle est évaluée en voix rétronasale).

Les extraits peuvent être présentés de différentes façons aux juges : directement dans le solvant s'il n'est pas toxique, à l'état gazeux dans des sacs de téflon (Mehinagic, E. et al., 2003) ou des seringues (Rannou, C., 2006), à travers un port d'olfactométrie dont la colonne est désactivée (Rega, B., 2003), sur des mouillettes (Sarrazin, C. et al., 2000), ou encore redéposés sur une matrice.

Une étude menée sur du saumon fumé (Varlet, V. et al., 2007) a permis de mettre en évidence que l'extraction-distillation simultanée est adaptée à ce type de produit : elle est à la fois quantitative et représentative. Dans le cas de cette étude, la qualité aromatique des extraits obtenus a été évaluée en dépôt sur du poisson frais (après changement de solvant), afin de prendre en compte les interactions arôme-matrice existantes dans le produit réel.

III.3.1.2. Analyses Chromatographiques

III.3.1.2.1. Séparation

L'analyse des composés aromatiques extraits peut être réalisée par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC - « High Performance Liquid Chromatography »). Celle-ci possède l'avantage de pouvoir être réalisée à basse température, préservant les composés thermosensibles et évitant les étapes de derivatization (voir ci-après) nécessaires pour les composés les moins volatils. Des dérivés de phénols de spiritueux ont pu être analysés par HPLC couplée à des détecteurs à fluorescence (Canas, S. et al., 2003), de même que les phénols de fumée de cigarette (Moldoveanu, S.C. & Kiser, M., 2007). Cependant, cette dernière étude a montré que la HPLC se révèle pertinente uniquement en analyse « de routine ». L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (GC - « Gas Chromatography ») couplée à la spectrométrie de masse (MS - « Mass Spectrometry ») est justifié pour des analyses plus poussées car elle permet de détecter et discriminer un plus grand nombre de phénols. Dans ce cas là, les colonnes capillaires apolaires offrent une bonne séparation des composés généralement présents dans la fumée ou les produits fumés. Elles sont donc plus utilisées que les autres (Sérot, T. et al., 2004 ; Guillén, M.D. et al., 2006).

La qualité de la séparation chromatographique des phénols peut être améliorée par une derivatization (Kornreich, M.R. & Issenberg, P., 1972). L'emploi du BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide ; #CAS : 25561-30-2) permet de remplacer

l'hydrogène de la fonction hydroxyle des phénols par un groupement triméthylsilyl (-Si(CH₃)₃), la réaction pouvant être facilitée par un catalyseur comme la pyridine et un chauffage de l'échantillon proche de son point d'ébullition. Les dérivés obtenus sont plus volatils et moins susceptibles d'interagir par des liaisons hydrogènes, donnant lieu à des pics chromatographiques mieux résolus, élués plus rapidement et plus symétriquement (Bhattacharyya, A.C. et al., 1968).

Une meilleure séparation des analytes peut aussi être obtenue à l'aide d'appareils permettant une double séparation chromatographique (Figure 26). Ceux-ci utilisent deux colonnes successives afin de résoudre les co-élutions résultantes de la première séparation par élution sur une colonne de nature différente (Geus, H. & Boer, J., 1996).

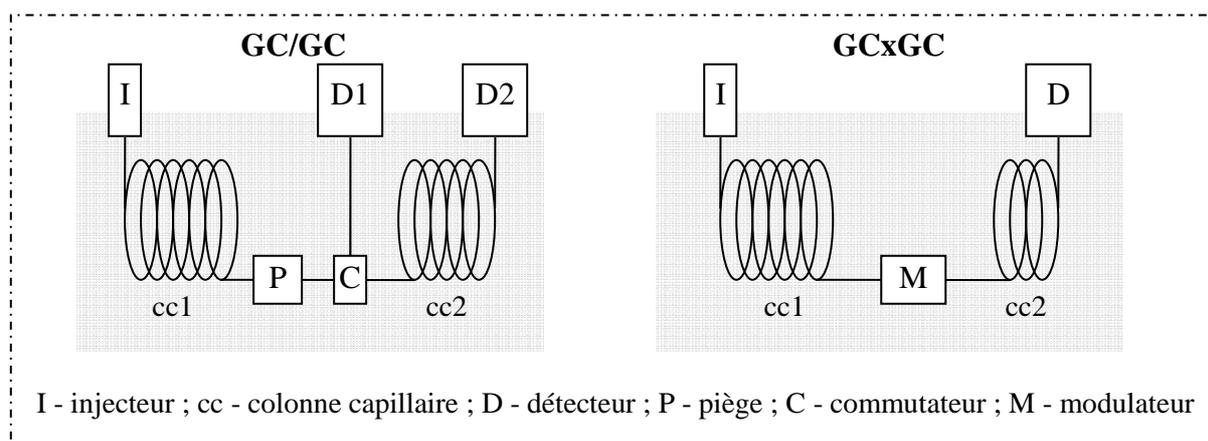


Figure 26 : Schéma de principe des appareillages de GC/GC et GCxGC

Dans le cas de « heart-cutting » ou chromatographie bidimensionnelle (GC/GC ou MDGC - « MultiDimensional Gas Chromatography »), des portions de chromatogrammes contenant des co-élutions sont envoyées sélectivement sur la deuxième colonne (Dunn, M.S. et al. 2004). Un piège cryogénique placé en sortie de colonne retient une fraction de l'éluât et la libère -via un commutateur- vers la deuxième colonne.

Pour la chromatographie bidimensionnelle totale (GCxGC ou « Comprehensive two-dimensional chromatography »), c'est la totalité de l'échantillon qui est séparée sur la première colonne et sur la seconde (Schoenmakers, P. et al., 2003). Pour cela, un modulateur sert d'interface aux deux colonnes en jouant cycliquement le rôle de collecteur et d'injecteur. Pendant toute l'analyse, il piège les composés sortant de la première colonne et les envoie ensuite dans la deuxième colonne, avec une fréquence d'échantillonnage (quelques secondes) qui permet de conserver la première séparation (Figure 27).

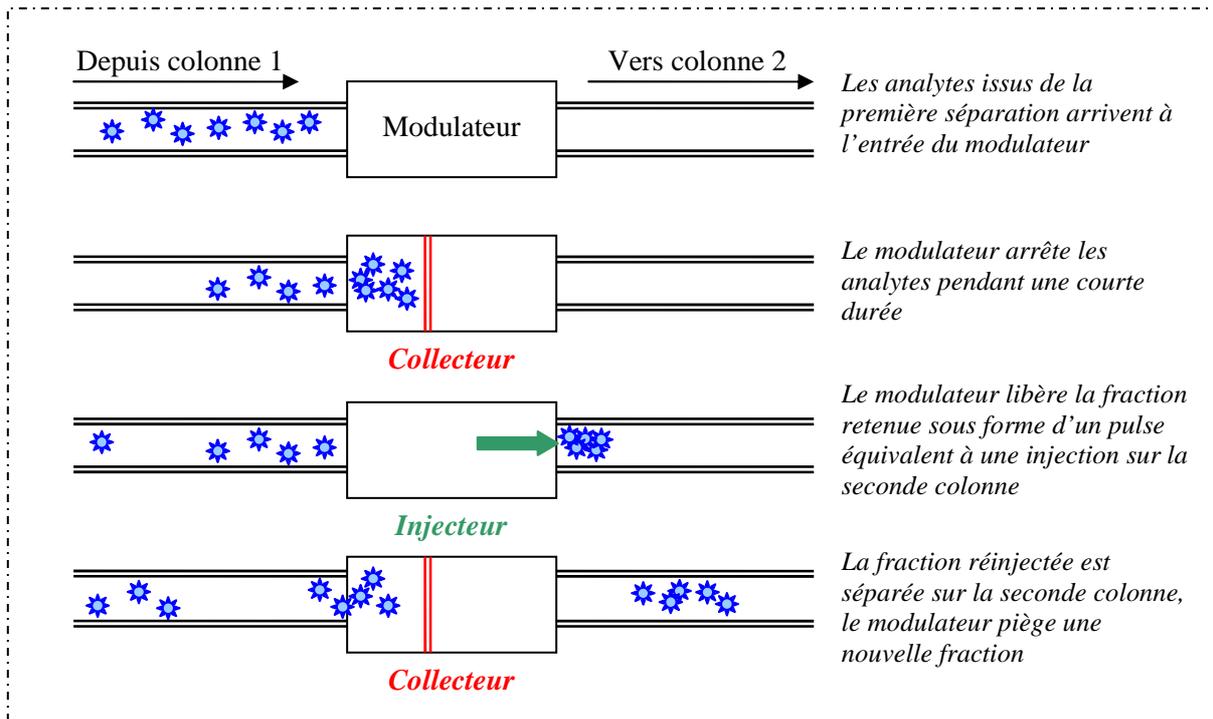


Figure 27 : Fonctionnement séquentiel d'un modulateur de GCxGC

Les modulateurs thermiques tendent à être les plus répandus de par leur efficacité et leur simplicité (Adahchour, M. et al., 2008). Une alternance de jets de gaz froid (CO_2 ou N_2 dans le cas de composés volatils) et chaud sur la colonne permet de retenir et libérer rapidement les composés circulant dans la colonne (Figure 28).

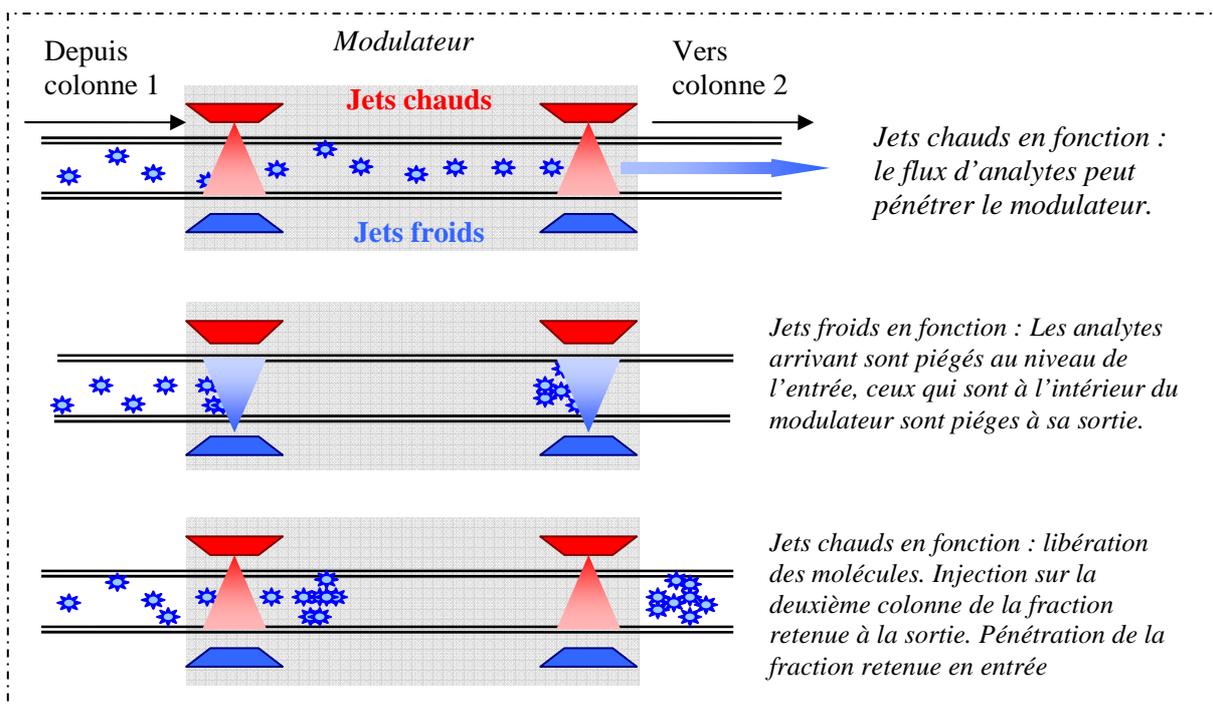


Figure 28 : Fonctionnement d'un modulateur thermique à double jets

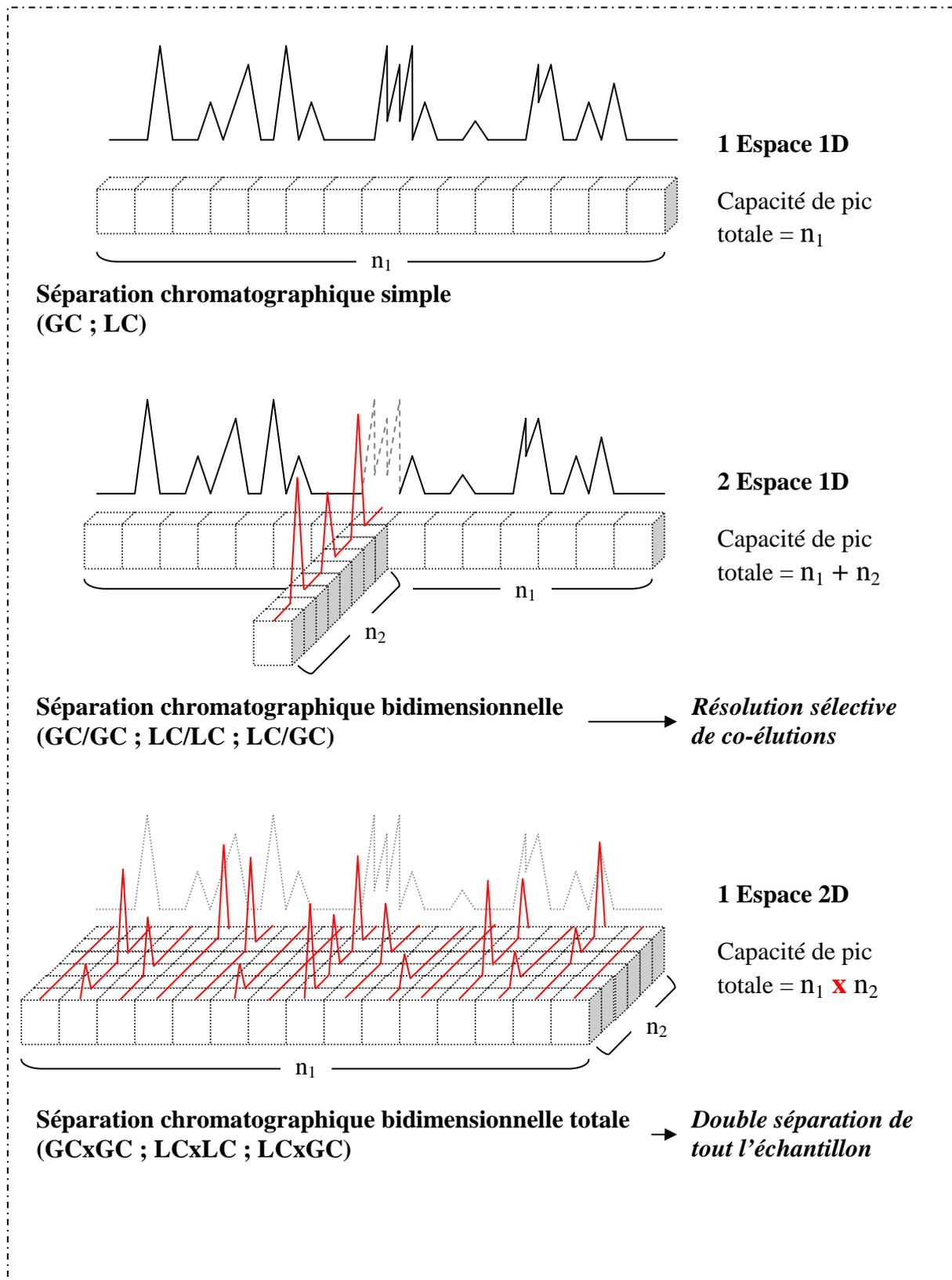


Figure 29 : Principe des séparation chromatographiques bidimensionnelles et bidimensionnelle totale

Le heart-cutting possède l'avantage de fournir une meilleure seconde séparation, puisque celle-ci est réalisée dans des conditions classiques (par opposition à la deuxième dimension de la GCxGC qui est réalisée sur des colonnes courtes avec des temps d'élutions rapides de type « fast-GC » supposant l'élution réalisée en conditions isothermes). De plus, elle peut être couplée à la détection olfactométrique, très utilisée dans l'analyse des arômes (d'Acampora Zellner, B. et al., 2008 ; Sasamoto, K. & Ochiai, N., 2010).

Cependant, la GCxGC permet théoriquement d'étudier des mélanges plus complexes, car sa capacité de pics est supérieure (Figure 29). Qui plus est, le fait d'utiliser des séparations chromatographiques différents dans les deux dimensions permet de générer des chromatogrammes « structurés ». Dans l'espace en deux dimensions du chromatogramme, les composés élués seront positionnés en fonction de leur famille chimique et de leurs propriétés, ce qui peut contribuer à l'identification de composés inconnus (Marriott, P. & Shellie, R., 2002).

On peut enfin noter la récente apparition dans la bibliographie de ce qui représente probablement la prochaine étape de l'évolution des appareillages de chromatographie en phase gazeuse multidimensionnelle : des systèmes mixtes pouvant réaliser conjointement de la GCxGC et GC-GC. Ainsi, l'ensemble de l'échantillon est séparé en deux dimensions (GCxGC) et des portions contenant des co-élutions trop prononcées pour être résolues ainsi peuvent être isolées pour subir une seconde séparation plus poussée (GC-GC) (Maikhunthod, B. et al., 2010).

III.3.1.2.2. Détection et analyse

Classiquement, la détection des composés après élution est réalisée par détecteur à ionisation de flamme (FID - « Flamme Ionisation Detector ») et/ou spectrométrie de masse (MS - « Mass Spectrometry »). Les analyseurs de masse les plus communément utilisés en sortie de GC sont les quadripôles et les trappes à ions.

Dans le cas de quantification à partir du signal de spectromètre de masse, il est préférable d'utiliser un mode de fonctionnement qui ne détectera que des ions spécifiques des composés cibles (SIM - « Single Ion Monitoring » dans le cas de quadripôles ; SIS - « Single Ion Storage » dans le cas de trappes à ions). En effet, le ciblage d'ions permet d'augmenter la sensibilité et de limiter le bruit de fond (Fernandez, X. & Cabrol-Bass D., 2007).

Dans le cas de GCxGC, les spectromètres de masse de type quadripôle et trappe à ion ne sont pas adaptés. En effet, la séparation chromatographique réalisée sur la deuxième colonne

est une séparation rapide de type « fast-GC » qui donne des pics très étroits (de l'ordre de 200 ms). La faible fréquence d'acquisition de ces appareils pose plusieurs problèmes (Figure 30) :

- ♦ le tracé chromatographique n'est pas suivi avec précision, ce qui fausse la quantification en associant à chaque pic des aires mal évaluées ;
- ♦ le nombre de spectres de masse obtenu sur un pic est insuffisant, ce qui donne lieu à des identifications imprécises ;
- ♦ le fonctionnement en « scan » peut causer une mauvaise acquisition des spectres (« distorsion spectrale ») qui rendra encore plus difficile l'identification par spectre de masse.

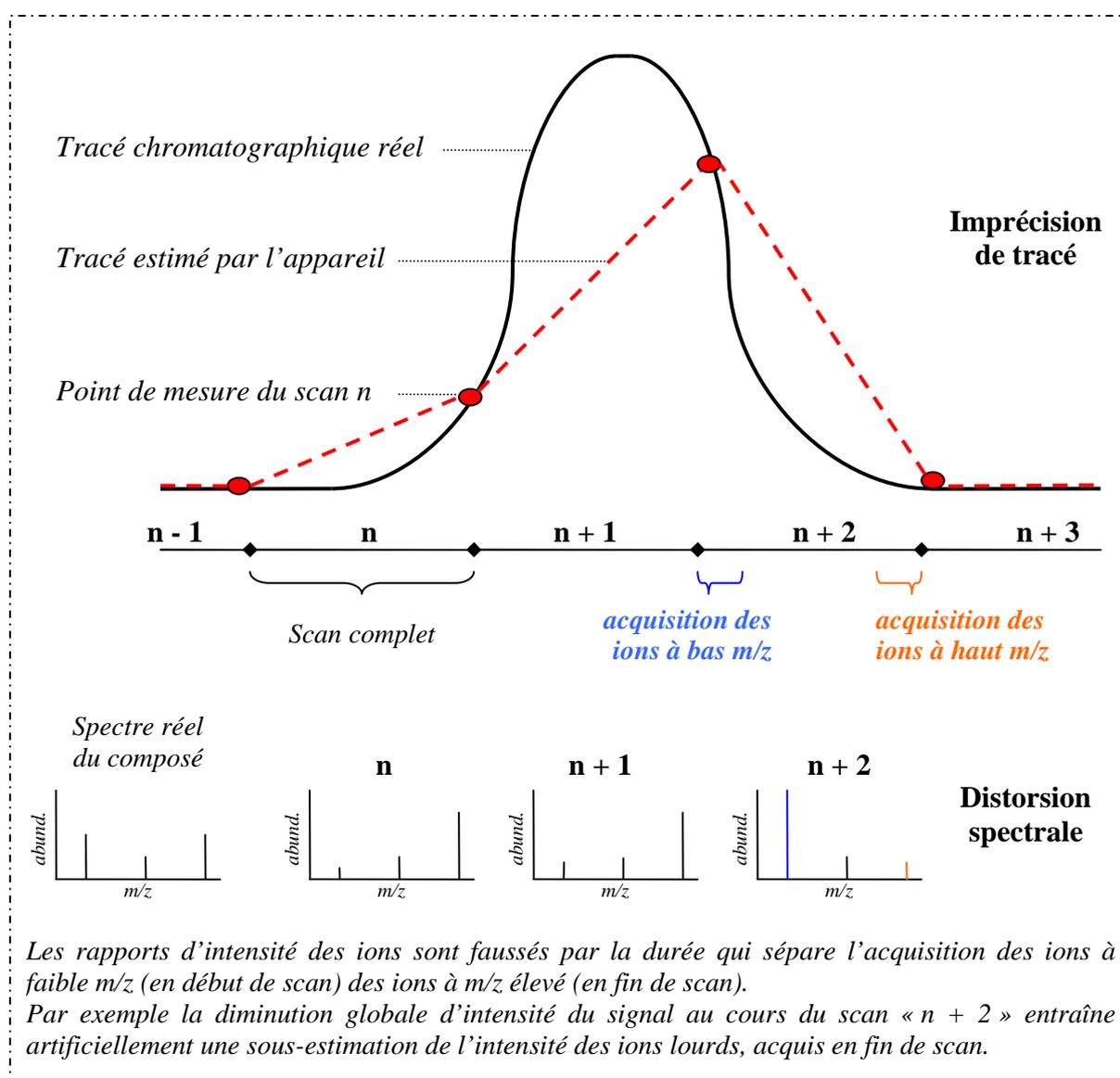


Figure 30 : Limitations des spectromètres de masse à basse fréquence en couplage avec de la GCxGC

Bien qu'il soit possible d'augmenter la vitesse d'acquisition d'un quadripôle (en diminuant la plage d'unités de masse atomique balayée lors d'un scan ou la résolution de mesure), les fréquences atteintes par des quadripôles classiques restent limitées. C'est ce besoin d'une meilleure fréquence d'acquisition qui a imposé l'arrivée sur le marché de quadripôles « rapides ». Cependant, leur usage semble pour l'instant encore limité à des plages de mesures de quelques centaines d'unités de masse atomique (Song, S.M. et al., 2004 ; Adahchour, M. et al., 2008).

L'analyseur de masse de choix pour la GCxGC est donc à l'heure actuelle le détecteur à temps de vol (TOF - « Time Of Flight »). Il permet le suivi simultané de l'ensemble des ions de la plage de mesure, donnant lieu à une fréquence d'acquisition constante quelle que soit son étendue. Il est possible d'obtenir 500 spectres complets (0-1000 amu) par secondes avec une résolution d'une unité de masse atomique. Ainsi, non seulement le suivi du tracé réel du signal est assuré, mais en plus l'identification des composés est plus fiable. De plus, à l'aide de logiciels adaptés, la grande densité d'information obtenue permet une déconvolution des pics chromatographiques : des algorithmes permettent de résoudre des co-élutions par traitement informatique. En déterminant la contribution des différentes molécules impliquées dans le pic réel, le calcul permet de reconstituer les pics individuels tels qu'ils seraient en l'absence de co-élution (Zeng, Z.-D. et al., 2011).

IV. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

IV.1. Caractéristiques générales

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représentent un ensemble de molécules organiques hydrophobes formées principalement de carbone et d'hydrogène organisés en cycles benzéniques condensés. Ce sont des composés environnementaux ubiquitaires qui ont deux origines principales. Les HAP d'origine pétrogénique sont générés naturellement lors de formation des combustibles fossiles, et possèdent une forte proportion de ramifications alkyles. Les HAP d'origine pyrogénique sont produits par combustion incomplète de matière organique (Samanta, S.K., 2002). Les HAP environnementaux peuvent donc être d'origine naturelle (feux de forêts, activité volcanique) mais sont principalement anthropiques du fait des effluents industriels, de l'incinération de déchets, l'utilisation de moteurs à combustion, etc. (Figure 31).

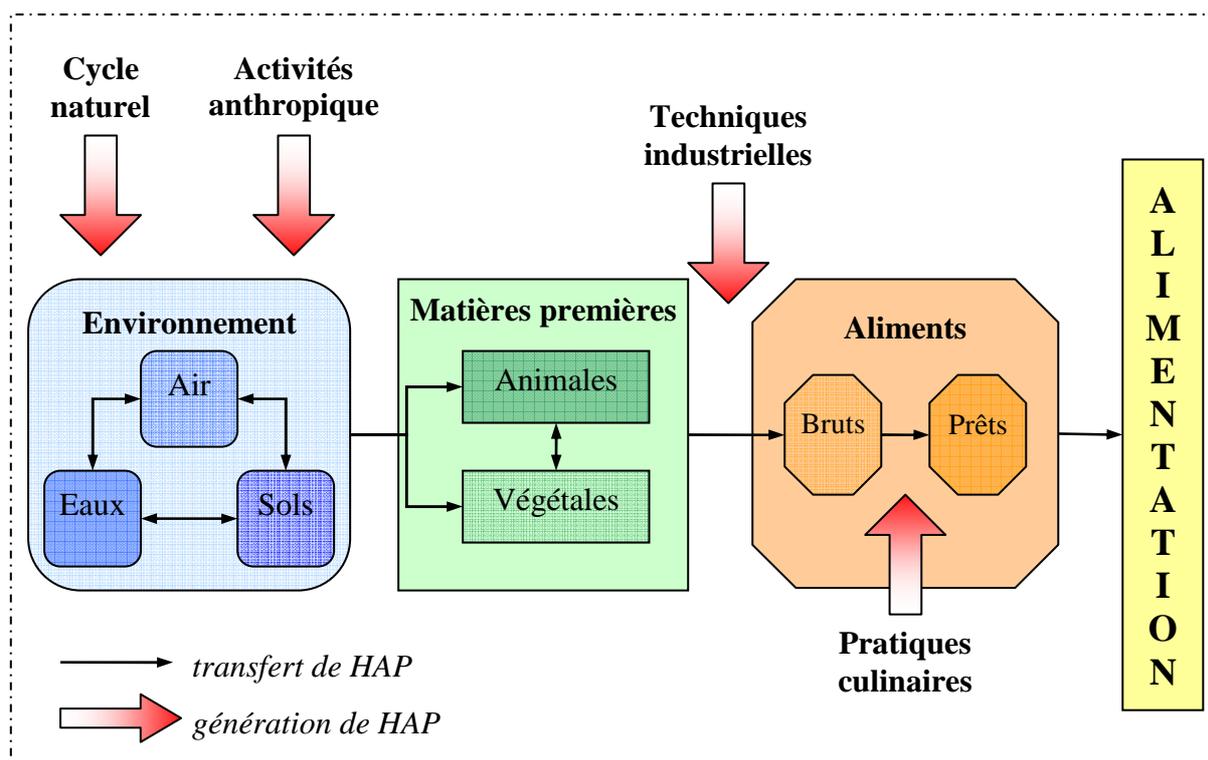


Figure 31 : Origines de la contamination de l'alimentation humaine par les HAP

Ces molécules sont considérées comme des polluants organiques persistants (POP) selon les critères du protocole d'Aarhus (1998) et de la convention de Stockholm (2001) :

- toxicité (un ou plusieurs impacts avérés sur la santé humaine) ;
- persistance dans l'environnement (résistants aux dégradations biologiques naturelles) ;
- bioaccumulation et bioamplification (concentration dans les tissus vivants et le long de la chaîne alimentaire) ;
- transport à longue distance.

Selon leur nombre de cycles benzéniques, on distingue les HAP légers qui contiennent jusqu'à trois cycles des HAP lourds qui en comportent quatre et plus.

IV.2. Toxicité

IV.2.1. Métabolisme et toxicité

Les molécules natives de HAP ne possèdent pas de pouvoir mutagène. C'est une fois absorbées par l'organisme qu'elles peuvent acquérir un pouvoir toxique, suite à l'action d'enzymes endogènes dont notamment le cytochrome P-450 (Figure 32).

Originellement, cette enzyme joue un rôle dans la détoxification de produits xénobiotiques : en les convertissant en dérivés hydrosolubles, elle les rend plus facilement éliminables par l'organisme (Andreoli, R. et al., 1999 ; Simon, P. et al., 2000 ; Ferrari, S. et al., 2002 ; Giessing, A.M.B. et al., 2003). Une partie des HAP qui entrent dans ces chaînes de réactions sera donc métabolisée et éliminée sous des formes diverses, par exemple après conversion en poly-hydroxy-HAP dans le foie (Larsen, J.C. & Larsen, P.B., 1998). Leurs métabolites et produits de dégradation sont ensuite retrouvés dans l'urine et les fèces sous forme conjuguée.

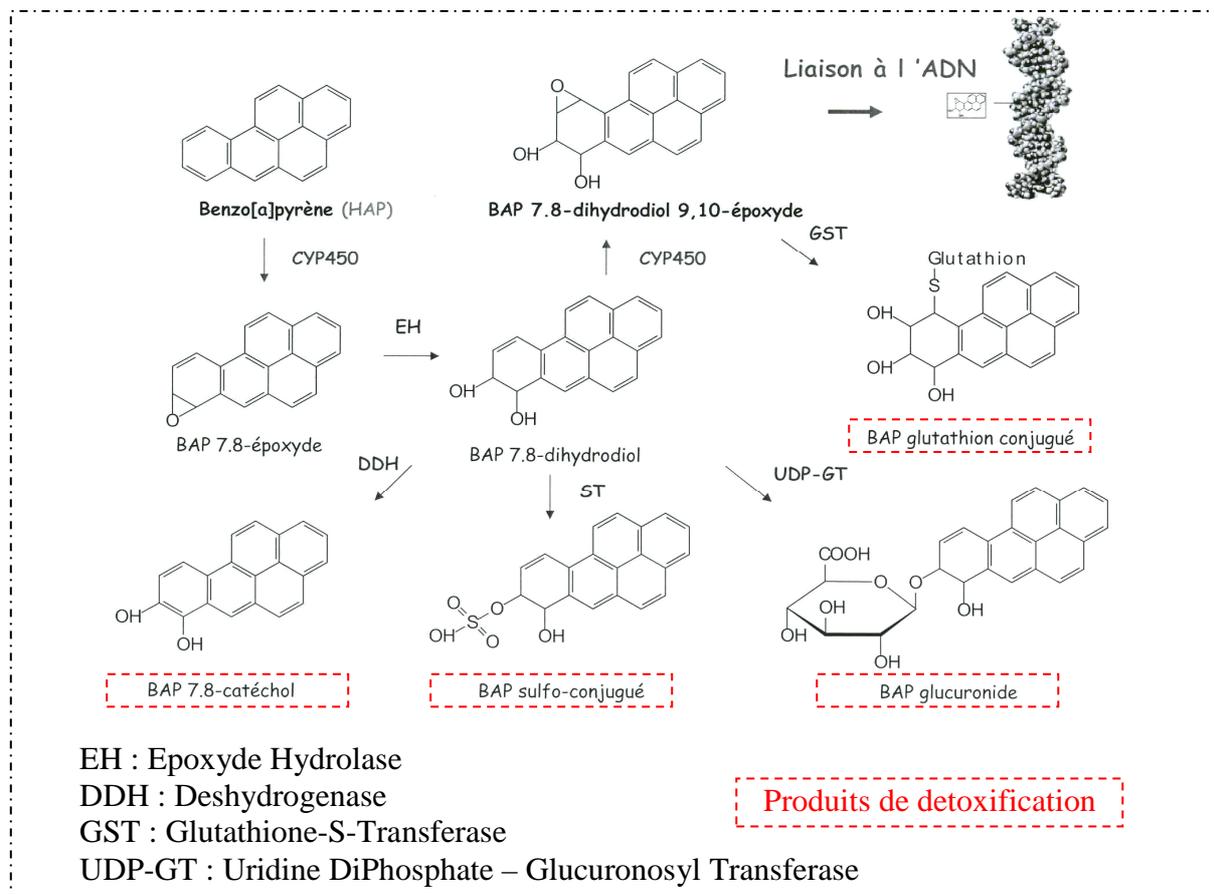


Figure 32 : Mécanisme de formation diolépoxydes toxiques et de métabolites excrétés par l'organisme à partir du benzo[a]pyrène

Cependant, une partie des HAP subissant l'action du cytochrome P-450 suivra d'autres voies métaboliques jusqu'à mener à la formation de diolépoxydes extrêmement réactives. Ces composés néoformés peuvent alors se fixer à la molécule d'ADN de manière covalente (Tamakawa, K., 2004). Ces liaisons altéreront ensuite la répllication du matériel génétique et pourront entraîner des mutations sources de cancérogenèse, par exemple par inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Baird, W.M. et al., 2005).

Les travaux démontrant ces mécanismes d'action sont arrivés tardivement après la mise en évidence des problèmes de cancers liés aux HAP. La première mise en évidence d'effets cancérigènes liés aux HAP pourrait dater de 1775. Une importante occurrence de cancers du scrotum causée par exposition aux goudrons de fumée chez les ramoneurs fut constatée par Sir Percivall Pott dans un hôpital Londonien. Les premières études toxicologiques montrèrent d'abord la toxicité de dérivés de combustion (induction de carcinomes chez le lapin par le goudron de charbon : Yamagiwa, K. & Ichikawa, K., 1915) avant que les HAP ne puissent être isolés et testés individuellement. En 1930, le benzo[a]pyrène put être directement identifié comme responsable de la toxicité de goudrons (Kennaway, E.L., 1924 ; Kennaway, E.L., 1930).

Le pouvoir toxique des HAP sur l'organisme est augmenté par certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques. En effet, même si leurs propriétés individuelles sont légèrement variables (selon leur structure et principalement le nombre de cycles ainsi que la présence de ramifications éventuelles) ce sont dans l'ensemble des molécules très liposolubles. Leur coefficient de partage octanol/eau est relativement élevé ($\text{Log}(K_{ow})$ compris entre 4 et 7 ; Mackay, D., et al., 1992) ce qui explique leur tendance à gagner les tissus riches en lipide après pénétration dans l'organisme. De cette affinité pour les tissus gras proviennent en partie leur tendance à la bioaccumulation. De plus, la liposolubilité leur confère une bonne disposition à traverser la membrane cellulaire et pénétrer dans les cellules où ils pourront avoir leur action adverse sur l'ADN.

IV.2.2. Évaluation de la toxicité

Les études toxicologiques menées sur les différents HAP individuels ont montré qu'il existait une large gamme de toxicité parmi les différents congénères de cette famille. Afin de tenir compte de ce facteur important lors de l'évaluation de la toxicité potentielle de denrées, le concept d'équivalent toxique (TEQ - « Toxic Equivalent Quantity ») a été développé. Plutôt que de ne prendre en compte que les masses de chaque molécule potentiellement toxique présente dans un mélange, les masses sont pondérées en fonction des toxicités individuelles. Cela suppose que tous les mécanismes d'action toxicologiques sont identiques, qu'il n'y a pas de phénomènes de synergie ou d'antagonisme dans le mélange et enfin que les effets toxiques individuels sont additifs.

En se fondant sur des données toxicologiques, des auteurs (Krewski, D., et al, 1989 ; Nisbet, I.C.T. & LaGoy, P.K.,1992 ; Malcolm, H.M. & Dobson, S.,1994) ont établis des échelles de facteurs d'équivalence toxique (TEF - « Toxic Equivalent Factor ») qui servent de coefficient au calcul du TEQ :

$$TEQ_{\text{mélange}} = \sum (TEF_i \times Masse_i) \quad \text{avec } i \text{ les différents HAP du mélange}$$

Les TEF des différents HAP sont habituellement exprimés par rapport à une référence considérée comme étant la plus toxique et dont le TEF est fixé à 1. Il s'agit généralement du benzo[a]pyrène. Par exemple, un TEF de 0,1 pour le benz[a]anthracène indique que les études tendent à prouver que celui-ci est dix fois moins toxique.

La saisine AFSSA n°2000-SA-0005 du 29 juillet 2003 propose une liste de 11 HAP (Figure 33) à prendre en compte pour le calcul du TEQ de produits alimentaires (Tableau 9). Les TEF associés sont tirés de l'étude de Nisbet et Lagoy (1992) avec une modification : le TEF du Dibenz[a;h]anthracène a été ramené de 5 à 1 car les anciennes données ayant permis de fixer cette valeur paraissaient surestimées en regard d'études plus récentes.

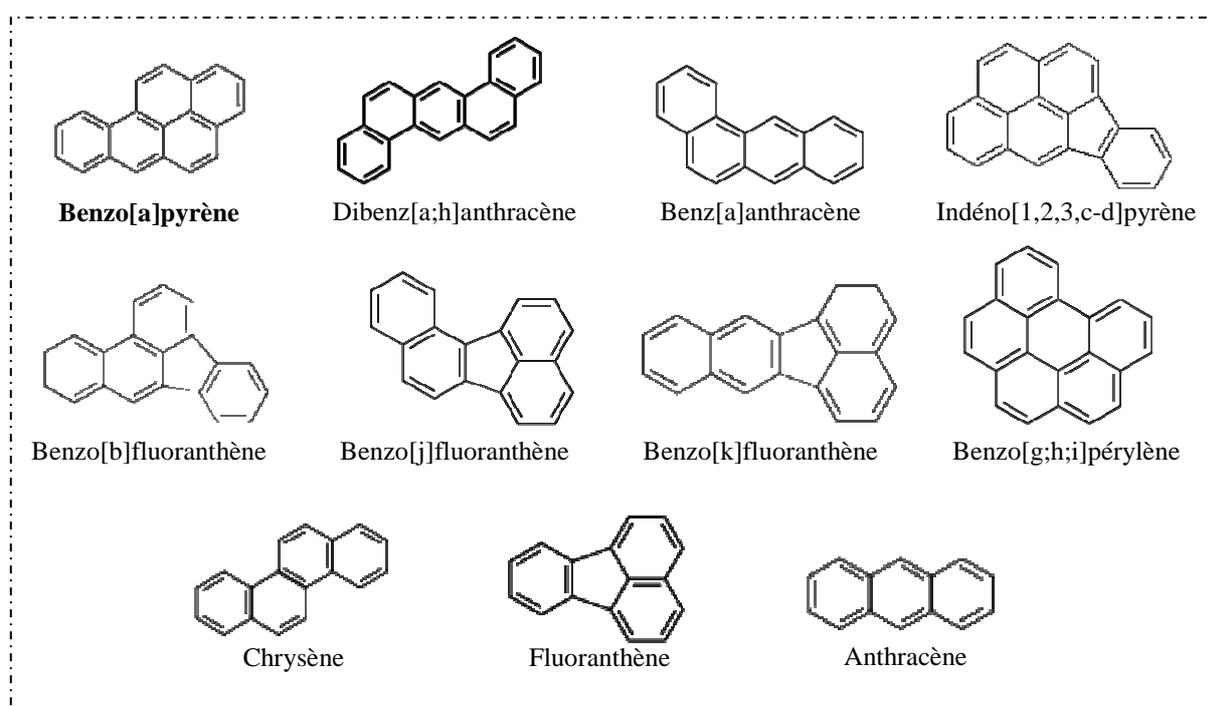


Figure 33 : Structures des 11 HAP cités par la saisine AFSSA n°2000-SA-0005

Tableau 9 : Liste des TEF associés aux 11 HAP cités par la saisine AFSSA n°2000-SA-0005

HAP	TEF
Benzo[a]pyrène	1
Dibenz[a,h]anthracène	1
Benz[a]anthracène	0,1
Indéno[1,2,3,c-d]pyrène	0,1
Benzo[b]fluoranthène	0,1
Benzo[j]fluoranthène	0,1
Benzo[k]fluoranthène	0,1
Benzo[g,h,i]pérylène	0,01
Chrysène	0,01
Fluoranthène	0,01
Anthracène	0,01

IV.2.3. Exposition de l'homme

Chez l'homme, l'exposition aux HAP peut se faire de différentes manières. Il est important de noter que chez les fumeurs, la consommation de tabac représente 90 à 95% de l'exposition aux HAP (Menzie, C.A., et al., 1992), la fumée de tabac étant très riche en HAP. D'autre part, l'absorption cutanée peut aussi représenter une voie majoritaire dans certaines situations (par exemple pour certains métiers d'industries mettant en œuvres des combustions).

Ces apports particuliers de HAP mis à part, l'exposition humaine se fait principalement par l'inhalation de l'air et l'ingestion de produits alimentaires. Les niveaux apportés par l'air ambiant varient grandement selon des paramètres tels que le niveau d'urbanisation et de trafic routier (Marvin, C.H., et al., 1999). De plus, l'adsorption par l'organisme après inhalation des particules porteuses de HAP peut varier selon la granulométrie de celles-ci et leur composition (et donc l'affinité des HAP pour elles).

La contamination des aliments intervient de nombreuses façons. Les matières premières peuvent être contaminées via l'atmosphère (Rojo Camargo, M.C. & Toledo, M.C.F., 2003) et les sols qui peuvent atteindre des niveaux élevés de contamination, en particulier à proximité d'industries (Berset, J.D. et al., 1999 ; Bakker, M.I. et al., 2000). Ainsi, les organismes destinés à l'alimentation peuvent être contaminés par leur environnement (Rey-Salgueiro, L. et al., 2008a). Ceci peut être dû à des phénomènes ponctuels, comme dans le cas des mollusques marins, dont les niveaux de contamination habituellement faibles peuvent augmenter fortement suite à des marées noires (Andral, B., et al., 2004). Même les animaux

d'élevage à l'environnement contrôlé peuvent être contaminés par leur alimentation, comme cela a été montré chez les saumons (Easton, M.D.L., et al., 2002).

De plus, les HAP étant soumis à des phénomènes de bioaccumulation dans les organismes (par stockage dans les tissus gras), ils ont tendance à se concentrer le long de la chaîne alimentaire. On parle de bioamplification, qui peut amener à de forts niveaux de HAP dans certains organismes destinés à l'alimentation (Figure 34).

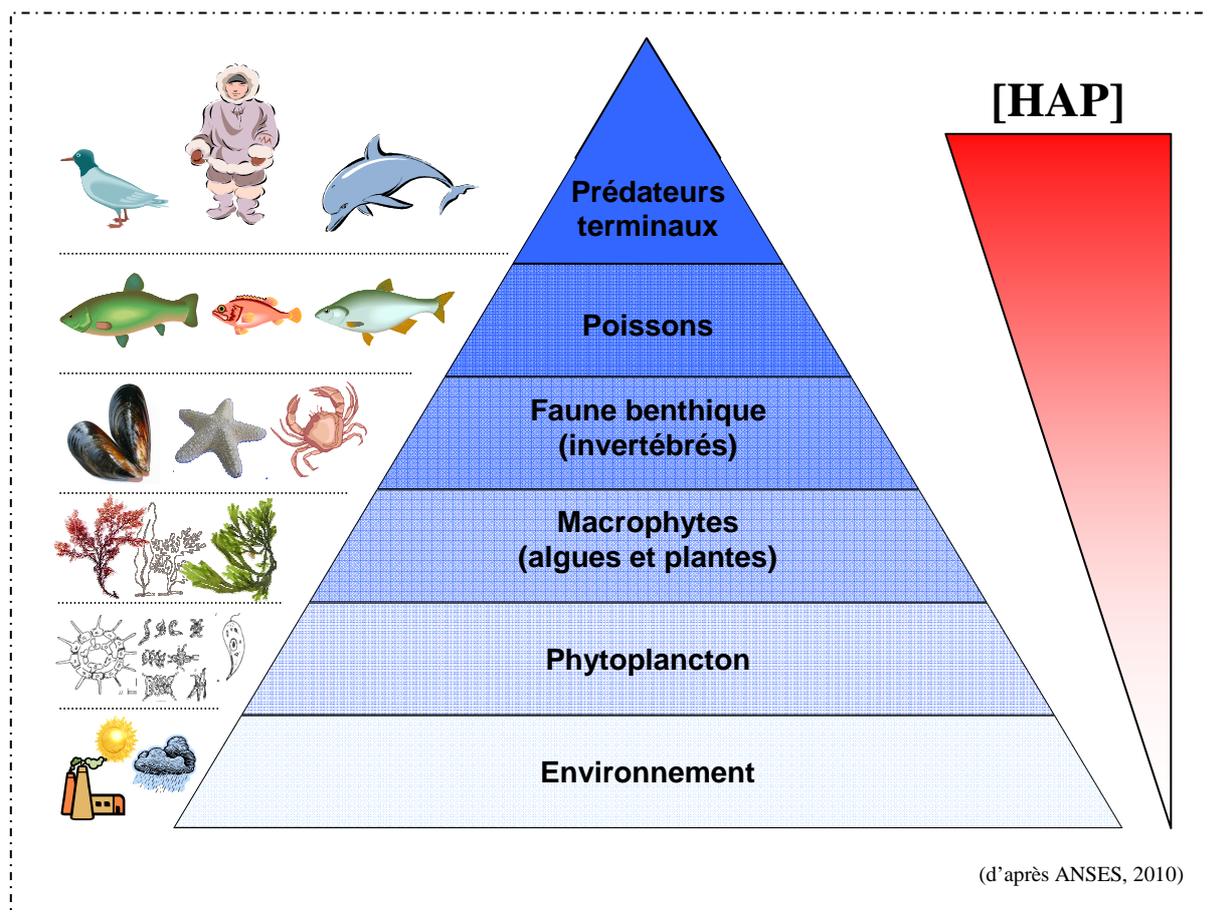


Figure 34 : Bioamplification des HAP dans la pyramide trophique marine

Par ailleurs, les aliments peuvent être encore enrichis en HAP par les étapes de transformation, qu'elles soient culinaires ou industrielles (Philips, D.H., 1999). Des procédés industriels tels que la torréfaction (Koffi Houessou, J. et al., 2005) ou le raffinage des huiles (Pupin, A.M. & Toledo, M.C.F., 1996 ; Moret, S. & Conte, L.S., 2000 ; Barranco, A. et al., 2003 ; Lacoste, F. et al., 2003) peuvent induire des contamination supplémentaires. Pour ce qui concerne le fumage, il a été identifié comme source de HAP dans des aliments fumés de natures et d'origine variées : fromages (Pagliuca, G. et al., 2003), marcs (Da Porto, C. et al.,

2005), produits carnés (Sikorski, Z.E., 1989 ; Janoszka, B. et al., 2004), produits marins (Kannapan, S. et al., 2000), etc.

Les pratiques culinaires incriminées dans l'exposition des consommateurs aux HAP sont celles qui emploient de fortes températures telles que la friture, le grillage, le toastage et le barbecue (Zabik, M.E. et al., 1996 ; Wu, J. et al., 1997 ; Mottier, P. et al., 2000 ; Rey-Salgueiro, L. et al., 2008b). Du fait de l'absence de maîtrise du procédé, les contaminations obtenues sont largement variables mais elles peuvent atteindre des niveaux élevés.

IV.3. Génération des HAP dans la fumée

IV.3.1. Mécanismes de production

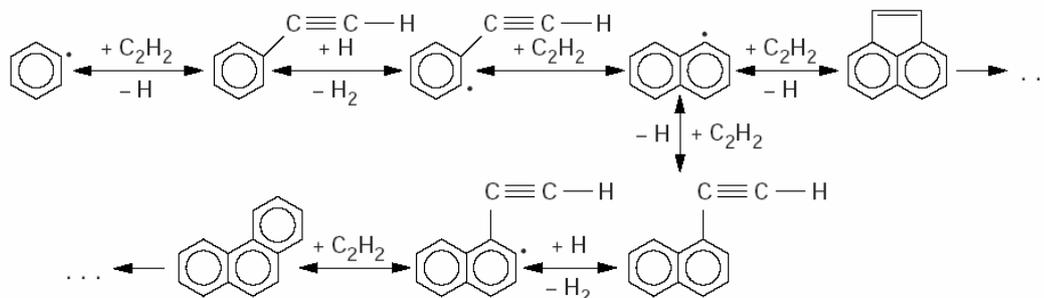
Bien que les mécanismes réactionnels menant à la production de HAP à partir de matière carbonée aient été largement étudiés, la présence des HAP dans les fumées alimentaires est encore mal expliquée. En effet, les études ont été menées principalement sur des processus pyrolytiques à très haute température, bien supérieures à celles mises en jeu dans l'industrie du fumage.

Il est bien accepté à l'heure actuelle qu'une très grande partie de la production des HAP passe par l'addition de radicaux alkyles sur la base d'un premier cycle benzénique. De nombreux auteurs ont donc proposé des voies de formation de celui-ci à partir de différents composés carbonés (voie en $C_4 + C_2$; voie en $C_3 + C_3$; voie en $C_4 + C_1$) (Cole, J.A. et al., 1984 ; Miller, J.A. & Melius, C.F., 1992). Celles-ci font intervenir des dérivés de l'acétylène qui sont facilement produits à partir de la pyrolyse de bois. Cependant, ces phénomènes ont pu être observés et modélisés pour des systèmes à haute température (plus de 600 °C) produisant des flammes, deux caractéristiques que l'on ne retrouve normalement pas dans les générateurs de fumée « alimentaire ».

Il est possible d'envisager la production des HAP à partir des cycles benzéniques présents originellement dans le bois, en particulier dans la lignine (voir II.1.1, p.30). En effet, durant la pyrolyse, les effets de thermodégradation affectent préférentiellement les hétérocycles furannes et pyranes, alors que les noyaux benzéniques plus stables gardent leur intégrité cyclique (Sainclivier, 1985b).

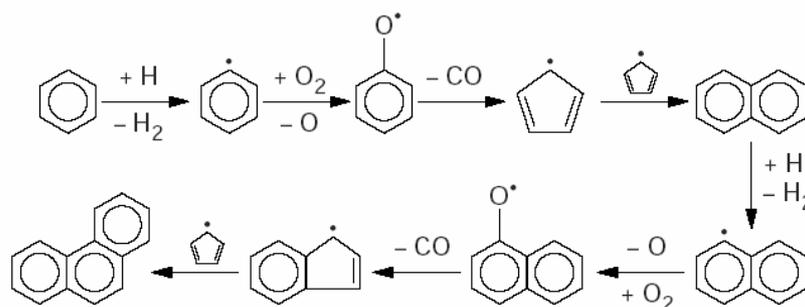
Ces noyaux benzéniques peuvent alors entrer dans un ensemble de réactions connues sous l'acronyme « HACA » pour « Hydrogen Abstraction - Carbon Addition » (Frenklach, M. & Wang, H., 1990). Ce processus compte deux étapes principales répétitives : d'abord, arrachement d'un hydrogène sur un composé aromatique suivi de l'addition d'acétylène sur le

radical formé (Figure 35-A). D'autres voies de synthèse des HAP à partir du noyau benzène existent par ailleurs, par combinaison de radicaux C_5H_5 (Figure 35-B) ou par addition du radical phényl directement sur un noyau benzène préexistant (Figure 35-C).



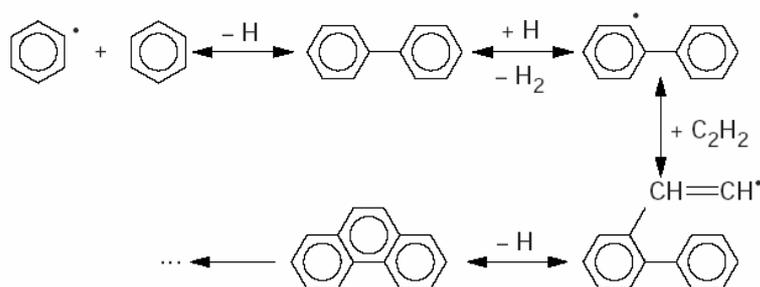
A - Schéma réactionnel de production avec mécanisme HACA

(d'après Frenklach, M. et al., 1984)



B - Schéma réactionnel de production par des radicaux C_5H_5

(d'après Dias, V. & Vandooren, J., 2004)



C - Schéma réactionnel de production par addition de benzène et radical phényl

(d'après Frenklach, M. et al., 1986)

Figure 35 : Principaux schémas réactionnels de production de HAPs à partir du noyau benzène

Les études portant sur des systèmes proches de la pyrolyse du bois dans les générateurs de fumée sont principalement celles qui portent sur la pyrolyse de tabac. En effet, on retrouve dans la feuille de tabac la plupart des constituants du bois, même si leurs ratios ne sont pas les mêmes. Dans ce cas là, c'est aussi principalement la génération des HAP à haute température qui est très documentée (Chortyk, O.T. & Schlotzhauer, W.S., 1973 ; Rodgman, A., 2001). Il s'avère qu'alors, les mécanismes décrits précédemment semblent envisageable, que ce soit par cyclisation directe ou par l'intermédiaire d'espèces chimiques réactives (Baker, R.R., 1987 ; Rodgman, A. et al., 2000 ; Smith, C.J., 2000).

Cependant, certaines études récentes tentent d'expliquer leur occurrence dans des fumées de tabac obtenues à de plus faibles température (<600 °C). Il a pu être montré notamment que la génération des HAP se ferait préférentiellement dans la zone de décomposition anaérobie puisque l'apport d'oxygène dans le système réduit significativement leur génération (McGrath, T.E. et al., 2001). Ils ne seraient cependant pas obtenus directement par thermodégradation et réarrangement de la matière première, mais produits par le chauffage secondaire des goudrons issus de la pyrolyse primaire de la matière végétale (McGrath, T.E. et al., 2007), en particulier par condensation et réarrangement de composés aliphatiques (McGrath, T.E. et al., 2003). Ces résultats justifient les recommandations d'utiliser de basses températures de pyrolyse pour la production de fumée car les goudrons obtenus en dessous de 600 °C sont moins susceptibles de produire des HAP (McGrath, T.E. et al., 2001). Enfin cette série d'études montre que les parois cellulaires semblent être les précurseurs privilégiés pour ces réactions, ce qui pourrait confirmer l'implication des noyaux aromatiques préexistants dans la lignine (McGrath, T.E. et al., 2005).

L'ensemble de ces mécanismes prouve la complexité que représente la compréhension de la formation des HAP contaminant la fumée au moment de sa production. Les températures développées par ces systèmes, la complexité de la matière première pyrolysée et les éventuelles hétérogénéités de température font que les mécanismes sous-jacents restent à l'heure actuelle mal définis.

IV.3.2. Variations de la contamination des fumées

Même si le processus de production de HAP est mal connu, il a clairement été prouvé depuis longtemps que les paramètres technologiques sont capables de l'influencer et relèvent donc d'une importance déterminante pour la contamination finale du produit.

Ainsi, il a été montré une claire relation linéaire entre la température de pyrolyse et la production de HAP, en particulier du benzo[a]pyrène, dans un domaine allant de 400 à 1000 °C (Potthast, K., 1978). Il peut donc exister des différences de teneur en HAP dans la fumée et le produit fini en fonction du type de générateur utilisé, puisqu'ils n'opèrent pas tous à la même température. Une comparaison directe des générateurs modernes a montré que la plaque thermostatée induisait moins de contamination dans le saumon fumé (Varlet, V., et al., 2007a).

De même que l'essence de bois influence grandement la formation de composés odorants (voir II.2.2.1, p.40), celle-ci peut considérablement changer la teneur en HAP individuels et en HAP totaux. Par exemple, la teneur en HAP de viandes fumées dans des conditions identiques peut varier d'un ordre 10 selon l'essence de bois utilisée pour générer la fumée : 47,94 µg/kg pour du pommier contre 470,91 µg/kg pour de l'épicéa (Stumpe-Viksna, I. et al., 2008). En effet, les bois résineux ont tendance à produire plus de HAP, phénomène que l'on retrouve dans le cas d'un fumage particulier : « le fumage noir ». Pour ce type de fumage, l'emploi de bois résineux pyrolysés à haute température (700 à 900 °C) permet de rendre le produit plus noir, mais entraîne aussi une forte contamination en HAP (Potthast, K., 1982 ; Müller, W.D., 1991).

Il est possible de tirer partie de l'influence des paramètres technologiques sur la contamination de la fumée en HAP pour réduire leur présence dans le produit fini. Ainsi, l'emploi de générateurs externes permet de diminuer significativement les contaminations par rapport au fumage traditionnel et aux armoires monobloc qui mènent à de fortes et très variables teneurs en HAP (Chandrasekhar, T.C. & Kaveriappa, K.M., 1985). Les goudrons et HAP peu volatils doivent parcourir une plus grande distance avant d'atteindre le produit, ce qui permet leur refroidissement et leur condensation (Polligné, I. et al., 2001).

Le découplage de la génération de fumée et du fumage rend possible la mise en place de système d'épuration pour réduire encore les teneurs en HAP dans la fumée au moment de son utilisation. Qu'il s'agisse de filtres, d'épuration électrostatique, de rideaux d'eau ou de biofiltres, le but recherché est principalement d'éliminer une partie de la phase particulaire de la fumée puisque c'est celle-ci qui est porteuse composés les plus lourds, et donc d'une grande partie des HAP (Rusz, J. & Miler, K.B.M., 1977 ; Hollenbeck, C.M., 1997). Inversement, la mise en place de fumage électrostatique augmente la contamination en HAP dans le produit, puisqu'elle favorise le dépôt des particules de fumée (Sirami, J., 1981).

L'utilisation de fumées liquides peut être considérée comme le stade le plus avancé de ces techniques de purification de la fumée et il a été montré qu'elle menait à de faibles taux de contamination en HAP (Hattula, T. et al., 2001). En effet, l'utilisateur peut connaître a priori la composition de la fumée utilisée afin de connaître son niveau de contamination avant même de traiter le produit. De plus, il est possible de réduire de manière significative la concentration des HAP en milieu liquide, et donc de purifier les fumées liquides. Par exemple, des polymères adsorbants directement immergés en milieux aqueux permettent un piégeage des HAP dissous, avec la possibilité d'augmenter drastiquement l'efficacité d'épuration du polymère par des techniques d'empreinte moléculaire (Krupadam, R.J. et al., 2010). L'adsorption significative des HAP contenus dans des fumées liquides sur de simples films de polyéthylène de basse densité a aussi été constatée (Šimko, P. et al., 1993 ; Chen., S. & Chen, S., 2005). Ceci permet de réduire significativement la contamination des fumées liquides avant leur mise en œuvre par une simple étape de stockage dans le contenant adapté.

IV.4. Législation relative aux HAP dans les aliments

En 2002, le SCF (« Scientific Committee on Food ») de l'Union Européenne a pris en considération 33 congénères de HAP (Scientific Committee on Food, 2002). Parmi eux, 15 HAP génotoxiques et carcinogènes ont été mis en avant comme devant être prioritaires en terme de surveillance et d'évaluation des risques sanitaires : benz[*a*]anthracène, benzo[*b*]fluoranthène, benzo[*j*]fluoranthène, benzo[*k*]fluoranthène, benzo[*ghi*]pérylène, benzo[*a*]pyrène, chrysène, cyclopenta[*cd*]pyrène, dibenz[*a,h*]anthracène, dibenzo[*a,e*]pyrène, dibenzo[*a,h*]pyrène, dibenzo[*a,i*]pyrène, dibenzo[*a,l*]pyrène, indéno[1,2,3-*cd*]pyrène et 5-méthylchrysène.

Le JECFA (« Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ») est arrivé à des conclusions sensiblement identiques en 2005, en recommandant cependant l'ajout du benzo[*c*]fluorène (JECFA, 2005). En effet, même si les données faisant état de sa présence dans les aliments restent rares, les études de toxicité sur le rat tendent à prouver qu'il peut induire des cancers par exposition orale.

Jusque récemment, le benzo[*a*]pyrène seul était utilisé comme indicateur des contaminations des produits alimentaires en HAP cancérigènes. Ceci justifie le fait qu'il ait été le seul à faire l'objet d'une législation et de teneurs maximales admissibles dans les aliments. Cependant, suite à une recommandation relative à la poursuite des recherches sur les taux de HAP dans certaines denrées alimentaires (2005/108/CE, Union Européenne, 2005a), il

est clairement établi par l'EFSA (« European Food Safety Authority ») que ce n'est pas un indicateur fiable.

En 2008, après évaluation de la possibilité d'utiliser les TEF/TEQ ou des sommes de HAP ciblés (Tableau 10), l'EFSA recommande l'utilisation de l'indicateur « HAP4 » représentant la somme des benzo[a]pyrène, chrysène, benz[a]anthracène et benzo[b]fluoranthène (EFSA, 2008).

Tableau 10 : Groupes de HAP évalués par l'EFSA comme indicateurs de contamination

HAP cancérigène	« HAP8 »	« HAP4 »	« HAP2 »
benz[a]anthracène	X	X	
benzo[b]fluoranthène	X	X	
benzo[k]fluoranthène	X		
benzo[ghi]pérylène	X		
benzo[a]pyrène	X	X	X
chrysène	X	X	X
dibenz[a,h]anthracène	X		
indéno[1,2,3-cd]pyrène	X		

Ces recommandations feront évoluer la législation européenne en vigueur qui ne concerne pour l'instant que le benzo[a]pyrène (Tableau 11). A l'heure actuelle, les teneurs maximales acceptables dans les aliments sujets à contamination ont été fixées par la commission de régulation 208/2005 de l'Union Européenne (spécifique aux HAP) et reprises par la commission de régulation 1881/2006 (relative à un grand nombre de contaminants alimentaires) (Union Européenne, 2005b ; 2006).

Tableau 11 : Réglementation européenne en vigueur concernant la contamination en HAP des produits alimentaires, seul le benzo[a]pyrène est concerné

Produit	Concentration maximale ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids frais)
Huiles et matières grasses pour consommation humaine directe ou utilisation en tant qu'ingrédient alimentaire	2,0
Aliments pour enfants et nourrissons	1,0
Viandes fumées et produits de viande fumée	5,0
Muscle de poisson fumé et produits de la pêche fumés, à l'exception des bivalves	5,0
Muscle de poisson non fumé	2,0
Crustacés et céphalopodes non fumés	5,0
Bivalves	10,0

Cependant, l'amendement de cette dernière fixera les nouvelles contaminations admissibles dans certains produits alimentaires à la fois pour le benzo[a]pyrène

individuellement, mais aussi pour la somme des quatre HAP constituant le groupe « HAP4 » (Tableau 12).

Tableau 12 : Extrait de la réglementation européenne à venir concernant la contamination en HAP des produits alimentaires

Produit	Concentration maximale ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids frais)	
	Benzo[a]pyrène	Σ HAP4
Viandes fumées et produits de viande fumée ; viandes frites et produits de viandes frites	5,0 (jusqu'au 31/08/2014)	30,0 (10/09/2012 à 31/08/2014)
	2,0 (à partir du 01/09/2014)	12,0 (à partir du 01/09/2014)
Muscle de poisson fumé et produits de la pêche fumés (à l'exclusion des suivants)	5,0 (jusqu'au 31/08/2014)	30,0 (10/09/2012 à 31/08/2014)
	2,0 (à partir du 01/09/2014)	12,0 (à partir du 01/09/2014)
Sprat fumé et sprat fumé en conserve ; bivalves	5,0 (à partir du 01/12/2012)	30,0 (à partir du 01/12/2012)
Bivalves fumés	6,0 (à partir du 01/12/2012)	35,0 (à partir du 01/12/2012)

Bien que ça ne soit pas le cas en France, on peut aussi préciser que certains pays européens (notamment l'Italie, l'Allemagne, l'Espagne, etc.) appliquaient déjà des limites réglementaires à certains HAP dans les aliments (principalement, huiles, viandes et poissons fumés) (Wenzl, T. et al., 2006). Lorsque ces règlements spécifiques ne sont pas moins limitatifs que les normes européennes, ils restent applicables localement.

Les bas niveaux de contamination tolérés ont imposé depuis quelques années l'emploi de méthodes d'analyses ayant des limites de détection (LOD - « Limit Of Detection ») et de quantification (LOQ - « Limit Of Quantification ») très basses. A présent, l'évolution de la législation vers la prise en compte systématique d'un plus grand nombre de HAP exige de ces méthodes d'analyse plus de sélectivité et sensibilité.

IV.5. Techniques d'analyse des HAP

L'analyse des HAP est rendue possible dans un large éventail de milieux -tant environnementaux qu'alimentaires- de par la diversité des techniques disponibles. Les différences de composition existantes entre matrices alimentaires ont mené à une grande diversification des voies de préparation, d'extraction et d'analyse des HAP présents dans les aliments.

La Figure 36 présente les méthodes et techniques employées (principales et émergentes). Il faut cependant garder à l'esprit que cette représentation synthétique ne rend pas compte de

l'ensemble des possibilités exploitées à l'heure actuelle. Notamment, certaines méthodes permettent de réaliser conjointement une étape d'extraction et de purification de l'échantillon (par exemple, extraction en phase supercritique avec présence d'un adsorbant C₁₈).

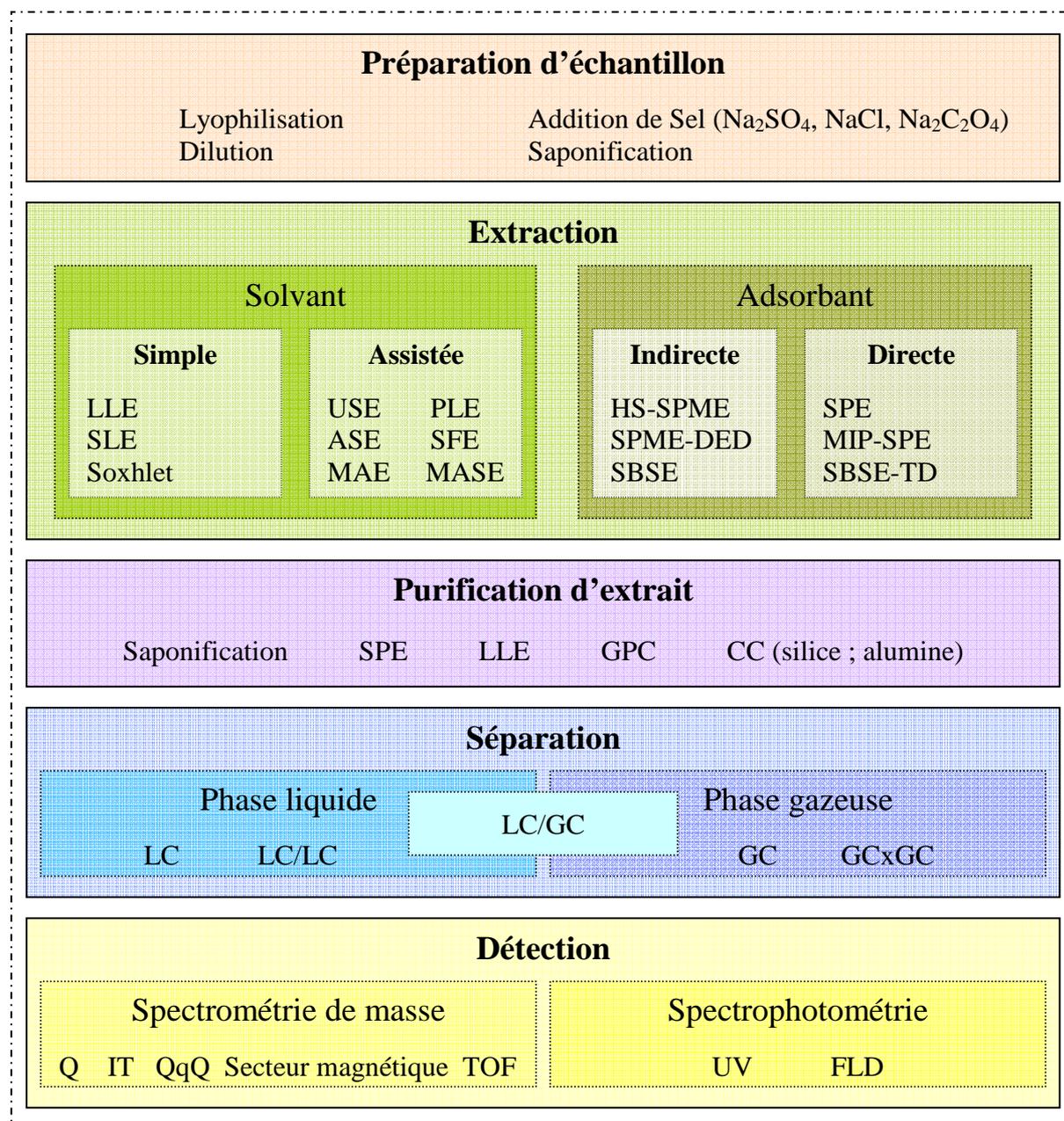


Figure 36 : Principales techniques utilisées pour l'analyse des HAP

IV.5.1. Extraction et purification

La préparation de l'échantillon peut être une étape clef pour la qualité de l'analyse. Les méthodes appliquées recourent l'ensemble des techniques préparatives classiques de

lyophilisation, homogénéisation, centrifugation, etc. L'addition de sels peut aussi être réalisée pour améliorer l'extraction ultérieure, dont notamment : Na_2SO_4 , NaCl ou $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (Jie, F. & Kai-Xiong, W., 2007 ; Anyakora, C. et al., 2005 ; Araki, R.Y., et al., 2001). La dilution des matrices de type huile alimentaire dans un solvant est couramment réalisée à l'hexane (Moret, S., Conte, L.S., 2000).

Dans le cas de matrices semi-grasses comme le poisson, la saponification reste une des étapes de préparation les plus employées car elle permet d'éliminer la matière grasse de l'échantillon. Bien qu'une perte d'analyte puisse être constatée à ce stade (à cause de phénomènes de partition avec la phase alcoolique ; Mottier, P. et al., 2000), elle peut se révéler nécessaire pour des matrices qui induisent beaucoup de lipides co-extraits. Ceux-ci, s'ils ne sont pas éliminés pourront avoir un impact négatif sur les limites de détection au moment de l'analyse finale.

Pour cette étape, des solutions éthanolique ou méthanolique de potasse ou de soude sont généralement employées (Simon, R., et al., 2008 ; Moreda, W. et al., 2001 ; Moret, S., Conte, L.S., 2000). Il est également possible de réaliser simultanément la saponification et l'extraction dans le cas de l'utilisation de l'appareil de Soxhlet (Figure 37).

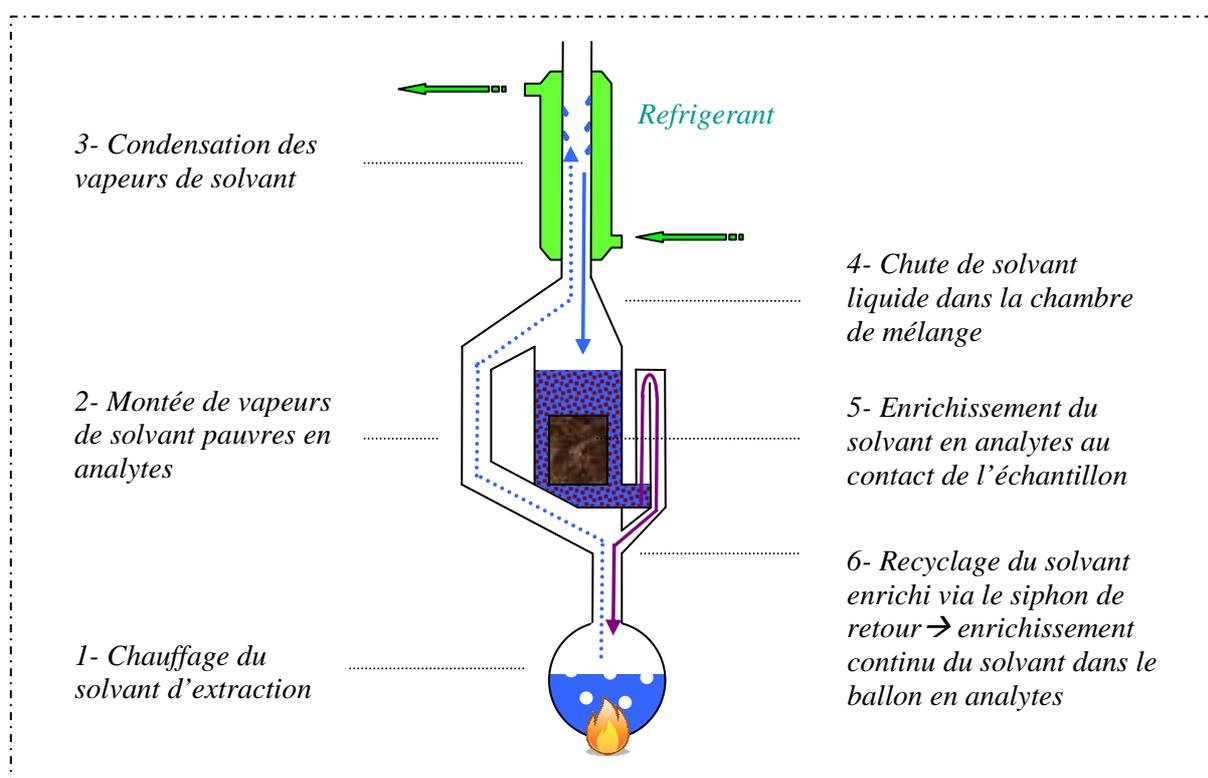


Figure 37 : Schéma de principe de l'appareil de Soxhlet

Les techniques d'extraction les plus répandues reposent sur une extraction au solvant. Parmi elles, l'appareil de Soxhlet reste très largement utilisé pour les matrices alimentaires (Figure 37) (Anyakora, C. et al., 2005 ; Jánská, M. et al., 2004 ; Araki, R.Y. et al., 2001).

Les extractions liquide - liquide (LLE - « liquid-liquid extraction ») et solide - liquide (SLE - « solid-liquid extraction ») sont aussi largement utilisées. Bien qu'elles soient originellement mises en place de manière simple, les techniques « assistées » se sont largement répandues et permettent d'améliorer l'extraction à l'aide de :

- ♦ ultrasons : USE - « ultrasound extraction » (Chen, B.H., et al., 1996 ; Chen, B.H. & Lin, Y.S., 1997) ;

- ♦ micro-ondes : MAE - « Microwave assisted extraction » (Pena, T. et al., 2006 ; Purcaro, G. et al., 2009 ; Navarro, P. et al., 2006) ;

- ♦ pressurisation : PLE - « pressurized-liquid extraction » (Jánská, M. et al., 2004 ; Martinez, E. et al., 2004) et ASE - « accelerated solvent extraction » (Wang, G. et al., 1999 ; Varlet, V. et al., 2007a).

Elles ont en outre l'avantage de réduire les quantités de solvant consommées par rapport au Soxhlet, pour des résultats souvent comparables.

Dans tous les cas, la qualité de l'extraction dépend en grande partie de la polarité du solvant utilisé. Les plus classiques sont des solvants apolaires comme l'hexane ou le cyclohexane mais le diméthylsulfoxyde (DMSO) est également utilisé, en particulier pour les huiles alimentaires (Guillén, M.D. et al., 2004 ; Pandey, M.K. et al., 2004). Le mélange de solvants apolaires avec d'autres plus polaires peut aussi être réalisé, pour réduire le taux de matière grasse co-extraite. De plus, des agents d'extraction ou de complexation comme la caféine ou les ions Ag⁺ ont aussi été utilisés pour améliorer la qualité de l'extraction (Moret, S. & Conte, L.S., 2000 ; Lee, J.H. et al., 2004).

On peut enfin citer deux autres techniques utilisant des solvants :

L'extraction au fluide supercritique (SFE - « Supercritical Fluid Extraction » ; Ali, Md.Y. & Cole, R.B., 2002 ; Ali, Md.Y. & Cole, R.B., 2001 ; Ali, Md.Y. & Cole, R.B., 1998). Bien qu'elle soit plutôt utilisée pour des matrices environnementales (très contaminées et pauvres en matières grasses), elle peut être appliquée à des aliments avec l'ajout d'adsorbant qui permet une purification simultanée.

L'extraction assistée par membrane (MASE - « Membrane-Assisted Solvent Extraction ») (Figure 38). Celle-ci se révélerait particulièrement intéressante vis-à-vis des HAP légers (Gomes-Zuin, V. et al., 2006). En effet, Les faibles quantités de solvant utilisées dispensent d'une étape de concentration par évaporation ou des pertes sont souvent constatées sur ces analytes.

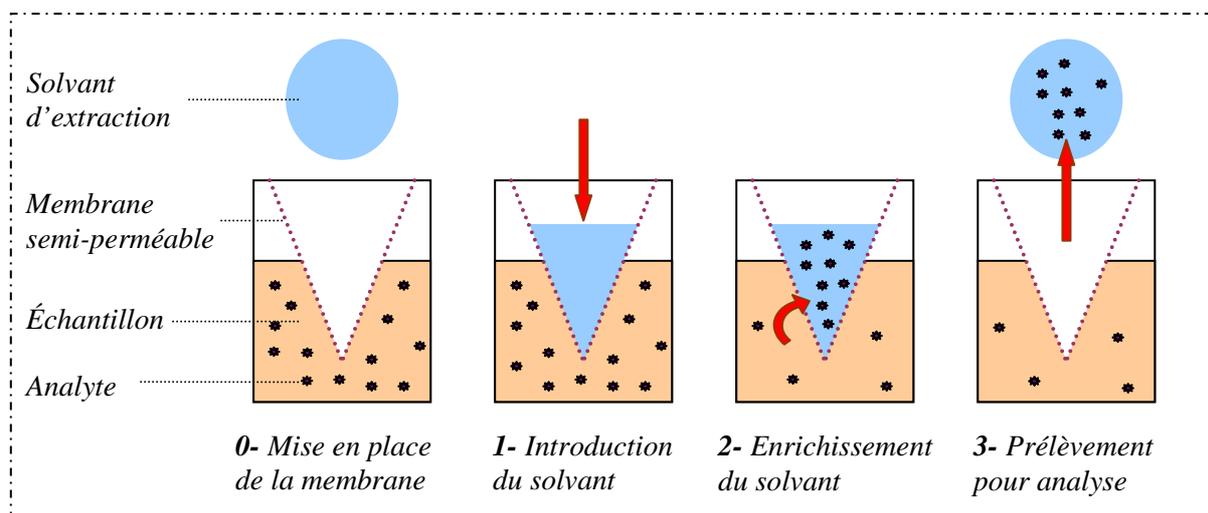


Figure 38 : Schéma de principe d'une MASE

Bien qu'il soit possible de réduire la quantité de composés co-extraits, une étape de purification de l'extrait reste presque toujours obligatoire pour les extractions au solvant. Certains auteurs ont réalisé la saponification des lipides en post-extraction lorsqu'elle n'avait pas été incluse dans la préparation de l'échantillon ou dans l'extraction au Soxhlet (Martinez, E. et al., 2004). Il existe cependant d'autres méthodes d'élimination des lipides, en particulier la chromatographie par perméation de gel (GPC - « Gel-Permeation-Chromatography ») avec des phases de type copolymère styrène-divinylbenzène (Ballesteros, E. et al., 2006 ; Jira, W., 2004b ; Djinojic, J. et al., 2008a ; Jie, F. & Kai-Xiong, W., 2007).

La purification d'extraits originale sur colonne d'alumine ou de silice activée reste très largement employée (Barranco, A. et al., 2004 ; Pandey, M.K. et al., 2004). Son utilisation tend néanmoins à être remplacée par des extractions en phase solide (SPE - « Solid Phase Extraction ») qui s'avèrent plus facilement mises en œuvre (Figure 39). Le choix de la cartouche utilisée dépend largement de la méthode d'extraction et de l'échantillon puisque ce sont les deux facteurs qui déterminent la composition de l'extrait à traiter (et donc des impuretés à éliminer). Les milieux utilisés sont des cartouches à base de silice, C₁₈, C₈, oxyde de silice / oxyde de magnésium (Florisil[®]) ou encore styrène-divinylbenzène

(ENVI-Chrom P[®]). En particulier, les copolymères styrène-divinylbenzène offrent de bons résultats car ils permettent des interactions π - π entre les cycles de la phase stationnaire et ceux des HAP. Ceci a pour effet une meilleure rétention des HAP, en particulier par rapport aux matières grasses qui peuvent être éliminées lors du rinçage de la colonne (Marcé, R.M. & Borrull, F., 2000).

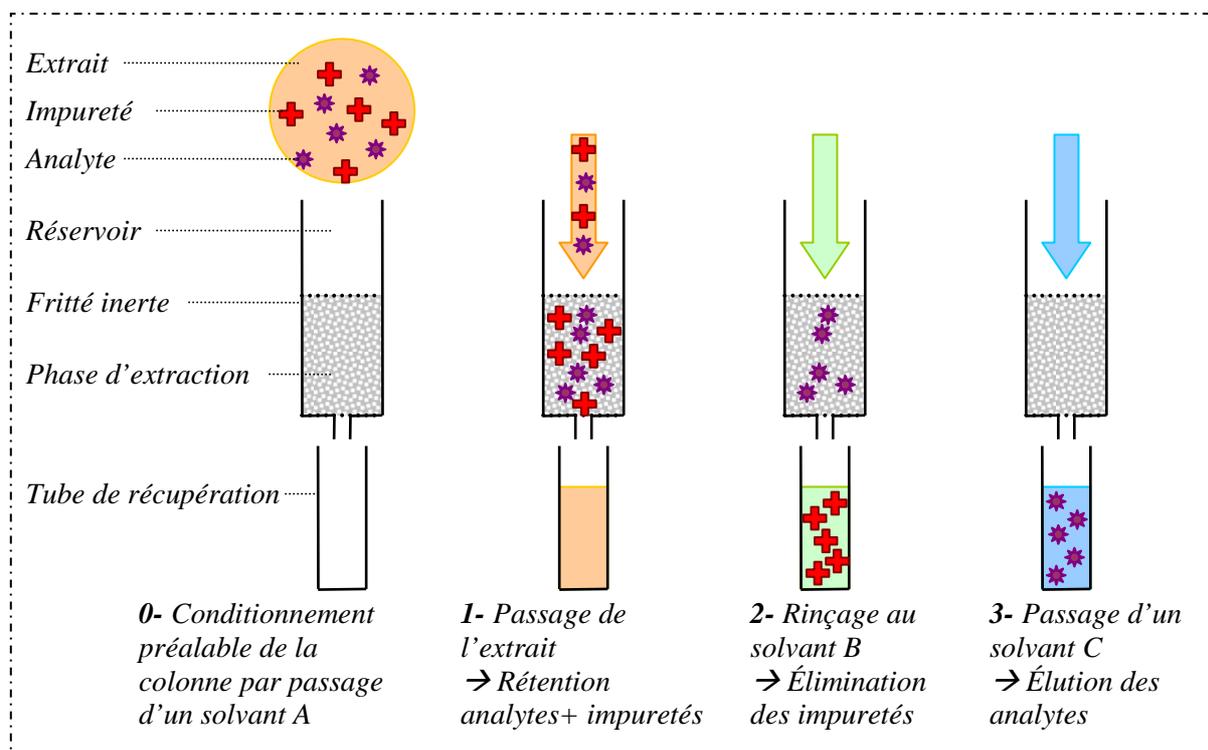


Figure 39 : Schéma de principe d'une purification par SPE à rinçage spécifique

En marge des extractions au solvant, des extractions utilisant des adsorbants ont été mises au point. L'avantage de ces méthodes repose bien souvent sur une facilité de mise en œuvre, une économie de solvant et une automatisation aisée. Dans le cadre d'analyses de HAP, elles permettent en plus d'éviter les étapes de concentration par évaporation de solvant. Celles-ci sont des étapes critiques où une partie des analytes (en particulier pour les HAP à 4 cycles et moins) peut être perdue. Enfin, la plupart de ces extractions ne sont pas obligatoirement accompagnées d'une purification.

Différentes applications de la SPME ont été mises en place. L'analyse de l'espace de tête par SMPE (HS-SPME) permet de détecter les HAP les plus légers (jusqu'à 4 cycles) avec des phases de type polyacrylate (Guillén, M.D. & Errecalde, M.C., 2002b) ou PDMS-DVB (Polydiméthylsiloxane/Divinylbenzène) (Aguinaga, N. et al., 2008b). La génération de l'espace de tête dans le vial expérimental peut être réalisée par exposition directe de l'aliment

s(Guillén, M.D. & Errecalde, M.C., 2002b), ou après son homogénéisation dans un milieu liquide (Aguinaga, N. et al., 2008b). On peut citer aussi la SPME-DED (« Solid Phase Micro-Extraction - Direct Exposition Device »), une technique de SPME développée pour permettre l'extraction directe dans un aliment solide (Martin, D. & Ruiz, J., 2007). La fibre est baignée dans une gélatine modèle qui permet l'interaction indirecte entre la fibre et le produit (les HAP diffusant depuis le produit vers la fibre à travers la gélatine), le système étant protégé par une sonde rigide poreuse insérée directement dans l'aliment.

Une des limites de la SPME étant sa faible surface d'adsorbant, l'utilisation du SBSE (« Stir-Bar Sorptive Extraction ») tend à se développer, car celui-ci possède une plus grande surface et donc une plus grande capacité de piégeage. Deux méthodes existent pour analyser la fraction retenue par le polymère : par désorption thermique (au niveau de l'injecteur du chromatographe) ou par dissolution dans un solvant approprié. Originellement, le SBSE a été créé pour être immergé en milieu liquide ce qui explique qu'il ait principalement été testé à l'heure actuelle sur des boissons (Gomes-Zuin, V. et al., 2005). Cependant, son utilisation dans l'espace de tête (HSSE - « Headspace Sorptive Extraction ») reste envisageable (David, F. & Sandra, P., 2007).

Enfin, des méthodes utilisant des adsorbants solides ont aussi été utilisés pour l'analyse directe de HAP dans les fumées ou les gaz (Dos Santos Barbosa, J.M. et al., 2006 ; Sadhra, S. & Wheatley, A.D., 2007). Ils nécessitent cependant d'être couplés à des techniques d'extraction déjà décrites : extraction liquide - solide (Li, S. et al., 2003), extraction-distillation simultanée (Forehand, J.B. et al., 2000), Soxhlet (Chen, Y.C. & Chen, B.H., 2003), ultrasons (Gundel, L.A. et al., 1995), etc.

IV.5.2. Analyses chromatographiques

Les deux types de séparation appliquées pour l'analyse d'extraits de HAP sont la chromatographie en phase gazeuse (GC - « Gaz Chromatography ») et la chromatographie en phase liquide (LC - « Liquid Chromatography »). Chacune d'entre-elles offre des avantages et des inconvénients spécifiques, ainsi que l'accès à des détecteurs différents.

Alors que la GC possède un plus grand pouvoir résolutif, la LC permet de réduire les temps d'analyse et de séparer plus facilement certains isomères (Šimko, P., 2002 ; Chiu, C.P. et al., 1997).

Initialement, la détermination des HAP par LC était réalisée à l'aide de détecteurs à ultraviolet mais ceux-ci présentent des limitations en terme de sélectivité, de limite de détection et de discrimination des interférences dues à la matrice. Ils ont été remplacés par des détecteurs à fluorescence (FLD - « FLuorescence Detection »), à longueur d'onde d'excitation et d'émission variable (dans des gammes 216-590 nm et 260-500 nm respectivement) (Plaza-Bolaños et al., 2010).

En dépit de son coût relativement faible qui justifie sa très large utilisation, le couple LC-FLD peut manquer de sélectivité et imposer l'usage de la GC-MS pour confirmer certains résultats (Chiu, C.P. et al., 1997 ; Houessou, J.K. et al., 2006). En particulier, les HAP alkylés peuvent poser problème car ils possèdent les mêmes propriétés de fluorescence que leurs parents non substitués et peuvent donc interférer avec l'analyse. De plus, certains HAP n'induisent pas (cyclopenta[cd]pyrène ; Simon, R. et al., 2008) ou peu de fluorescence (naphtalène, acenaphtylène, acenaphtène, fluorène ; Cai, S.-S. et al., 2009) quelle que soit la longueur d'onde d'excitation. La détection par fluorescence n'est donc pas adaptée à leur analyse. Enfin, ce type de détecteur ne permet pas de distinguer un HAP « natif » du même HAP à marquage isotopique, ce qui limite l'utilisation d'étalons internes marqués, pourtant largement utilisés avec la GC-MS.

Bien qu'il soit parfois utilisé dans certaines analyses de HAP alimentaires, le couplage LC-MS a plutôt été appliqué à des matrices environnementales (Lien, G.-W. et al., 2007 ; Robb, D.B. et al., 2000) ou biologiques (Ferrari, S., et al., 2002 ; Van De Wiele, T.R. et al., 2004).

Aujourd'hui, la CG a tendance à prendre le pas sur la LC (Plaza-Bolaños et al., 2010) et elle a pu être appliquée à l'analyse des HAP dans un grand nombre de matrices : huiles alimentaires (Guillén, M.D. et al., 2004 ; Vichi, S. et al., 2005), lait (Aguinaga, N. et al., 2008a ; Aguinaga, N. et al., 2007), viande fumée (Djinovic, J. et al., 2008a ; Djinovic, J. et al., 2008b ; Martin, D. & Ruiz, J., 2007 ; Jira, W., 2004b), poisson (Araki, R.Y. et al., 2001 ; Anyakora, C. et al., 2005) poisson fumé (Wang, G. et al., 1999 ; Varlet, V. et al., 2007a), etc.

Différents types de colonnes ont été utilisées pour la séparation des HAP en GC, afin de résoudre les co-élutions les plus problématiques rencontrées dans les mélanges de HAP :

- ♦ chrysène / triphénylène / cyclopenta[cd]pyrène / benz[a]anthracène ;
- ♦ benzo[b]fluoranthène / benzo[j]fluoranthène / benzo[k]fluoranthène ;
- ♦ dibenzo[a,c]anthracène / dibenzo[a,h]anthracène / indéno[1,2,3-cd]pyrène.

La Figure 40 présente certains des résultats obtenus par Gómez-Ruiz, J.A. & Wenzl T. (2009) pour la résolution simultanée de ces co-élution en utilisant des colonnes de différentes polarités (dont une colonne dite « autosélective » dont la polarité de la phase stationnaire est sensée s'ajuster à la polarité des analytes : Optima® δ-6). C'est la colonne de polarité moyenne DB-17MS (50% phényl-méthylpolysiloxane) qui a permis la séparation des analytes considérés.

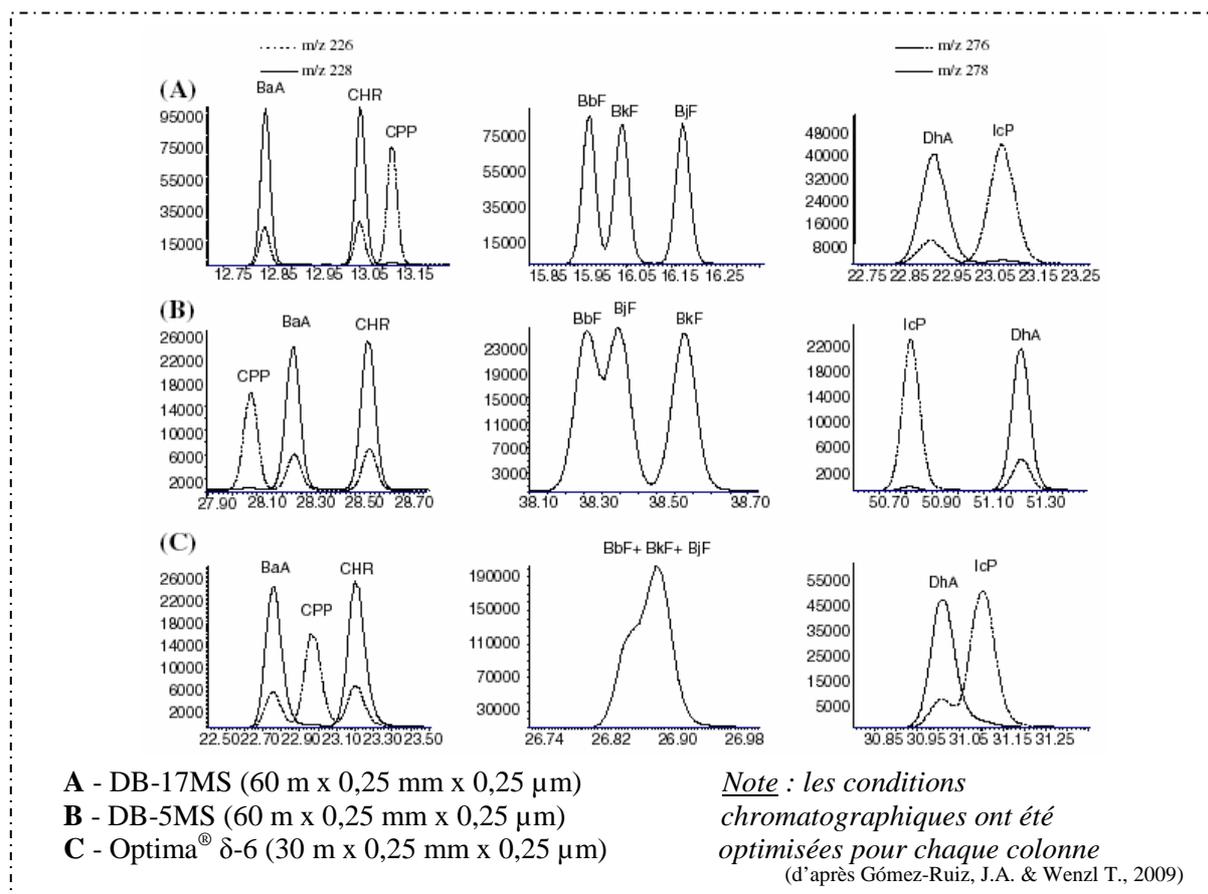


Figure 40 : Séparation chromatographique de co-élutions critiques de HAP avec des colonnes capillaires de différentes polarités

Ce type de co-élutions est d'autant plus problématiques lorsqu'elles impliquent des HAP présentant des ions isobares (comme dans le cas des benzofluoranthènes ou du triplet chrysène / triphénylène / benz[a]anthracène). En effet, ce type de cas de figure empêche une résolution à l'aide du spectromètre de masse et la quantification exacte des composés dont les pics chromatographiques se superposent, même partiellement. Afin d'améliorer la qualité de l'analyse lorsque la parfaite séparation des analytes n'est pas réalisable, des formules de calcul peuvent être utilisées pour compenser les erreurs de quantification induites (Veyrand, B. et al., 2007).

Les spectromètres de masse principalement utilisés en combinaison avec la GC sont des quadripôles simples opérant en mode SIM (« Single Ion Monitoring »). L'utilisation des trappes à ion (IT - « Ion trap ») bien que plus rare, est aussi à citer. La spectrométrie de masse à haute résolution (principalement à secteur magnétique) a aussi été employée pour ce type d'analyses mais son emploi reste limité par le coût des appareils utilisés.

Les HAP étant des molécules très stables, elles sont peu fragmentées même en ionisation forte, ce qui a poussé à la mise au point de méthodes utilisant la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les systèmes triple quadripolaires (QqQ) permettent une fragmentation secondaire à laquelle les HAP à analyser seront globalement moins sensibles que les molécules co-éluées. Le suivi des transitions ioniques (simple ou multiple) s'avère donc alors utile pour augmenter la sélectivité de l'analyse, même si les HAP produisent très majoritairement des ions de type $[M-H]^+$ et $[M-2H]^+$ (Veyrand, B. et al., 2007 ; Plaza-Bolaños et al., 2010).

Une meilleure sélectivité peut aussi être obtenue par des couplages de plusieurs techniques séparatives. Ainsi, la LC/LC (chromatographie en phase liquide bidimensionnelle) a été appliquée à l'analyse des HAP dans les aliments. Il s'agit de sélectionner une zone de co-élution dans la première étape de LC, de collecter la fraction concernée et de lui faire subir une seconde chromatographie. Ceci permet de résoudre ces co-élutions en utilisant une séparation efficace sur les molécules considérées (qu'il s'agisse d'isomères à distinguer ou co-extraits à éliminer). Couplée à des détecteurs à UV ou à fluorescence, cette technique a permis l'analyse de HAP par exemple dans les poissons fumés (Moret, S. et al., 1999) ou les huiles alimentaires (Van Stijn, F. et al., 1996). Il est aussi possible de réaliser la deuxième séparation en phase gazeuse, comme cela pu être fait pour l'analyse de HAP atmosphériques en LC/GC-MS (Shimmo, M. et al., 2002).

Par ailleurs, comme pour les composés volatils (voir III.3.1.2.1, p. 65), le développement de la GCxGC (chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle totale - « comprehensive GC ») a permis l'application de son fort pouvoir résolutif à l'analyse des HAP. Bien que la plupart des études réalisées aient porté sur des matrices non-alimentaires (comme des particules atmosphériques ; Amador-Muñoz, O. et al., 2008, ou des essences ; Cavagnino, D. et al., 2003), cette technique commence à être employée pour mesurer la contamination de matrices alimentaires comme des huiles (Purcaro, G. et al., 2007).

V. Conclusions - Etude bibliographique

Au sortir de cet inventaire bibliographique, plusieurs éléments importants semblent se dégager. Avant tout, la grande complexité des mécanismes chimiques et physiques impliqués à toutes les étapes du fumage. Ensuite, l'existence d'une bibliographie de poids inégal relative aux différents aspects du fumage. Enfin, une inadéquation entre l'importance potentielle de certains phénomènes et la faible maîtrise scientifique que nous en avons.

Il existe un ensemble de connaissances à la fois bien définies et maîtrisées, en grande partie grâce à l'existence des techniques d'étude appropriées. Notamment, la composition globale des fumées pyrolytiques ne fait plus débat, alors même qu'elle est complexe et largement variable. De même, en dépit de certaines incertitudes, le rôle des familles chimiques majeures de la fumée n'est plus à définir. Les composés phénoliques sont à mettre au premier plan pour l'ensemble des qualités recherchées chez un produit fumé (organoleptiques et fonctionnelles), alors même que les auteurs ne s'accordent pas toujours sur leurs rôles individuels. De la même façon, bien que les propriétés toxicologiques de certains des congénères soient sujettes à caution, les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont reconnus comme la principale contamination nocive induite par le fumage.

Ceci justifie le grand nombre d'études visant à comprendre l'impact des paramètres de production de la fumée sur sa composition : un fumage de qualité passe par une fumée de bonne qualité chimique. Pourtant, l'abondance de données disponibles reste à l'heure actuelle difficilement exploitable dans un objectif d'amélioration du fumage. En effet, les expérimentateurs aboutissent souvent à une simplification excessive des systèmes d'étude, que ce soit par l'utilisation d'outils de laboratoire à échelle réduite ou l'analyse d'un seul facteur expérimental à la fois. Bien que ceci ait permis de mieux comprendre cette étape du procédé de fumage, cela limite l'extrapolation des résultats obtenus à des générations de fumées industrielles ainsi que leur utilisation dans des applications concrètes.

Par ailleurs, les phénomènes se produisant à l'interface de la fumée et du produit sont paradoxalement assez mal connus et maîtrisés, alors qu'ils devraient représenter le point clef d'un procédé dont le but est de transférer les composés de la fumée à un produit alimentaire. Ainsi, en dépit des grandes variabilités et diversités constatées parmi les produits à fumer, le comportement vis-à-vis du fumage de matrices différentes n'est presque pas documenté. En l'absence de bases scientifiques solides, ce sont souvent les savoir-faire empiriques (industriels ou artisanaux) qui prédominent dans ce domaine, donnant principalement lieu à des contradictions et des incertitudes.

Objectifs et stratégie expérimentale

L'objectif de ces travaux est de préciser les répercussions que peuvent avoir les paramètres opérationnels d'un fumage industriel sur la qualité finale d'un produit de fumaison. Deux familles chimiques ont été naturellement retenues comme étant des marqueurs de la qualité des aliments fumés : les composés phénoliques volatils et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. De par leurs propriétés respectives, ces deux types de molécules ont été considérés comme étant les indicateurs d'un produit fini de bonne ou de mauvaise qualité (technique, organoleptique et sanitaire).

Plus spécifiquement, ce sont deux des étapes-clefs du fumage que cette étude avait pour but d'aider à comprendre et à maîtriser, tant d'un point de vue opérationnel/pratique que scientifique/théorique. C'est l'intérêt porté à ces deux étapes distinctes qui structure ces travaux en deux parties (Figure 40) traitant de :

- la production de fumée destinée à un usage alimentaire ;
- l'enrichissement du produit frais en composés cibles pendant son exposition à la fumée.

Dans un premier temps, la génération de la fumée a été appréhendée à travers la caractérisation d'un générateur de fumée industriel à friction. Il s'agit du type de générateurs dont la zone de pyrolyse est à la fois la plus réduite et la plus facilement modifiée à travers les paramètres de production. Un pilote a été mis en place permettant de piéger la fumée en sortie de générateur pour pouvoir en analyser la composition avant toute interaction avec un produit. Après une étape de mise en place et de validation du fonctionnement du pilote, un plan d'expérience a été établi afin de tester l'influence simultanée des cinq paramètres de fonctionnement principaux de ce type de générateur : température de pyrolyse, essence de bois, humidité du bois, aération de la zone de pyrolyse et distance parcourue par la fumée. Des dosages chromatographiques spécifiques ont permis de déterminer les teneurs des fumées produites en composés phénoliques et hydrocarbures aromatiques polycycliques.

L'analyse de ces résultats a permis d'identifier les paramètres opérationnels les plus déterminants pour la qualité de la fumée alimentaire produite par ce type d'installations. Notamment, les conditions de production permettant de maximiser la production des molécules-cibles ont été sélectionnées pour réaliser les expériences ultérieures de fumage.

Par la suite, l'influence de la composition du produit sur le processus de fumage a été étudiée à l'aide de matrices modèles. Cette approche a été choisie car elle permet l'utilisation

de produits standardisés de composition maîtrisée. Des essais préliminaires ont permis la mise au point d'une matrice gélifiée crue à base de protéines de poissons, d'eau et d'huile. Celle-ci possède les avantages d'être macroscopiquement homogène et suffisamment stable pour subir un fumage réel quelles que soient ses variations de composition. Un ensemble de matrices ayant des teneurs en eau et en huile différentes ont été fabriquées et fumées simultanément de 30 à 120 minutes. Le dosage ultérieur des composés phénoliques et des hydrocarbures aromatiques polycycliques déposés sur les matrices au cours du fumage a permis de déterminer l'enrichissement relatif des matrices. Des variations du processus de fumage liées à la composition du produit ont ainsi été mises en avant.

Par ailleurs, une approche méthodologique utilisant l'analyse de l'espace de tête a été développée. Celle-ci permet d'étudier les phénomènes de sorption (d'adsorption et de désorption) se déroulant entre une fumée gazeuse et des produits variés, en générant des espaces de têtes modèles statiques enrichis. Après avoir été validée, elle a été utilisée pour la mise en évidence des phénomènes de piégeage des composés phénoliques à l'état gazeux par des matrices modèles de différentes compositions. Ayant permis d'identifier des différences d'affinité pour des matrices ne contenant pas les mêmes constituants, cette méthode a également été utilisée sur les différentes fractions du filet de poisson. Il a ainsi été possible d'établir la comparaison de l'importance des interactions ayant lieu entre les composés gazeux et les principales fractions du filet de poisson (eau, lipides et protéines).

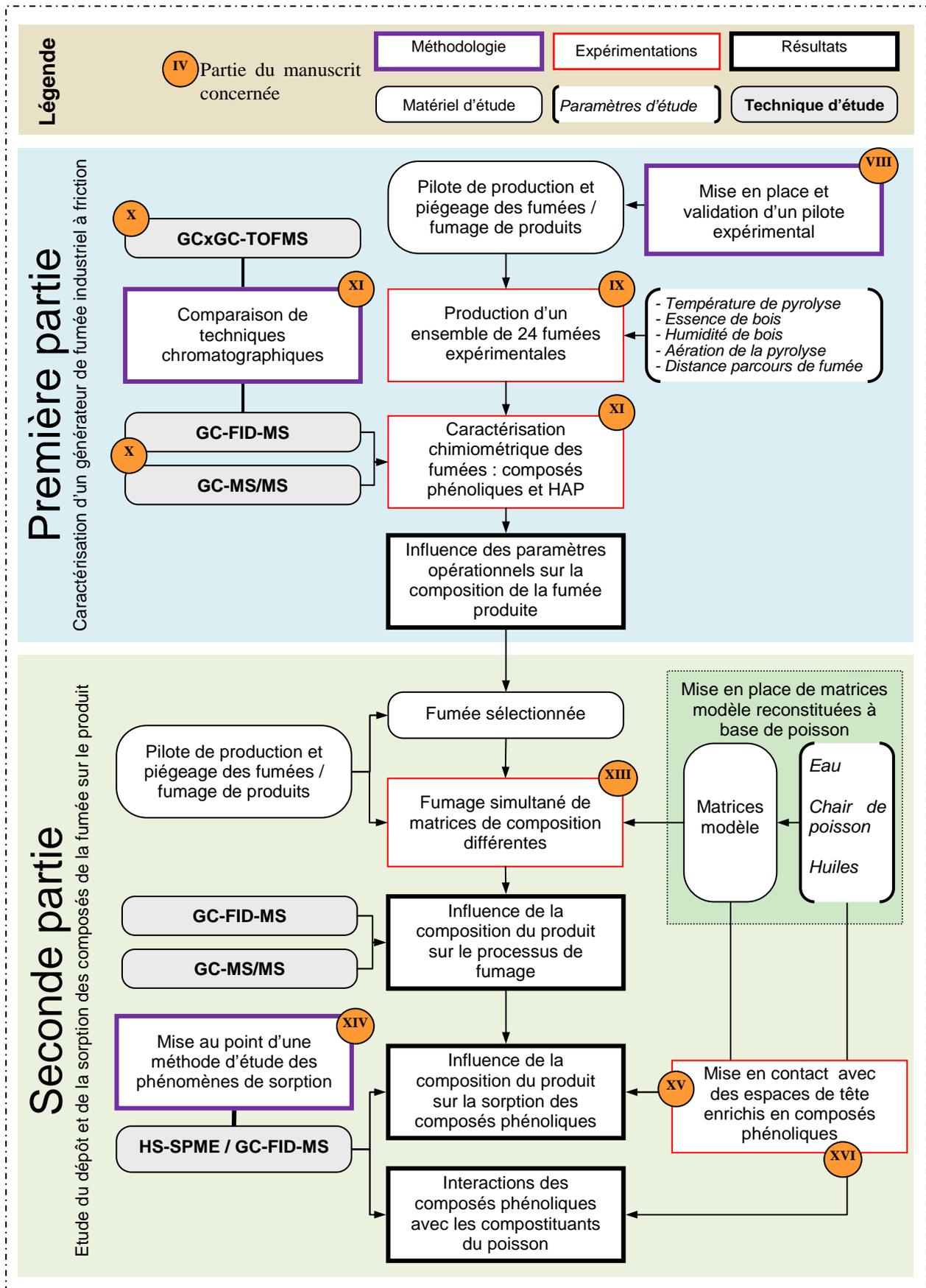


Figure 41 : Organisation des différents travaux réalisés

Matériels et Méthodes

VI. Matériel d'étude

VI.1. Produits chimiques et réactifs

L'ensemble des solvants, standards analytiques, réactifs et sels utilisés a été obtenu auprès de Sigma-Aldrich Chimie (Lyon, France) à l'exception des standards de HAP marqués aux C13 qui l'ont été auprès de LGC Promochem (Molsheim, France) et les standards de HAP natifs, auprès de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Allemagne).

Les solvants et standards utilisés sont tous de grade analytiques ou supérieurs (pureté annoncée >99%). De plus, le dichlorométhane a été distillé avant utilisation pour garantir une plus grande pureté.

L'eau utilisée pour l'ensemble des expérimentations a été purifiée avec un système Milli Q 18M Ω (Millipore Division Analytique, Saint-Quentin, Yvelines, France).

VI.2. Matières premières

VI.2.1. Bois

Des bûches calibrées de section rectangulaire (7 x 8 x 100 cm) de bois de chêne et de hêtre ont été achetées auprès d'un fournisseur local.

Après un stockage de longue durée dans une ambiance chaude et sèche, l'humidité résiduelle des bûches est inférieure à 8%.

Une bûche de chaque essence de bois a été ré humidifiée par immersion dans l'eau pour une durée de 3 mois afin d'atteindre une teneur en eau supérieure à 50%.

Les teneurs en eau exactes des quatre bûches utilisées pour l'ensemble des expériences sont données dans le Tableau 13. Elles ont été déterminées comme déterminées selon la norme AFNOR NF B 51-004, par pesées d'éprouvette de 7 x 8 x 1 cm avant et après dessiccation complète plusieurs jours à 103 °C et refroidissement dans un dessiccateur.

Tableau 13 : Teneur en eau des 4 bûches utilisées pour la génération de fumée

	Chêne	Hêtre
« Sec »	7,74%	7,64%
« Humide »	51,58%	58,81%

VI.2.2. Filets de poisson

Les filets de poisson utilisés pour les expérimentations sont issus de lieu de noir (*Pollachius virens*) et de cabillaud (*Gadus morhua*). Ils ont été achetés frais auprès d'un supermarché local le matin de leur utilisation pour les expérimentations.

VI.2.3. Huiles

Les huiles de poisson issues de chimère sauvage (*Chimaeroides sp.*) et de saumon d'élevage (*Salmo salar*) ont été gracieusement fournies par la société Copalis (Boulogne sur mer, France). L'huile d'arachide a été achetée dans un supermarché local.

Les stocks ont été prévus en quantité suffisante pour l'ensemble des expérimentations et stockés congelés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Les compositions en acides gras des trois huiles sont données dans le Tableau 14. Celles-ci ont été obtenues par chromatographie en phase gazeuse.

Tableau 14 : Composition des huiles utilisées

Acide gras	Proportion dans chaque huile (%)		
	Arachide	Saumon	Chimère
C 14 : 0		5,12	1,22
C 16 : 0	8,87	14,11	14,63
C 18 : 0	1,96	1,83	5,37
AGS	10,83	21,06	21,22
C 16 : 1 ω 7		5,29	4,73
C 18 : 1 ω 7	0,41	3,36	7,06
C 18 : 1 ω 9	55,30	30,42	45,89
C 20 : 1 ω 7			2,33
C 20 : 1 ω 9	1,70	4,91	5,31
C 22 : 1 ω 9		2,84	2,10
C 24 : 1 ω 9			0,83
AGMI	57,41	46,82	68,25
C 18 : 3 ω 3	0,33	3,49	
C 18 : 4 ω 3	0,79	1,08	
C 20 : 4 ω 3		2,22	4,16
C 20 : 5 ω 3		6,10	1,25
C 22 : 5 ω 3		2,39	0,64
C 22 : 6 ω 3		6,46	2,08
AGPI ω 3	1,12	21,74	8,13
C 18 : 2 ω 6	28,06	9,27	0,95
C 20 : 2 ω 6		0,75	0,67
C 20 : 4 ω 6	1,77	0,35	0,77
C 22 : 4 ω 6	0,81		
AGPI ω 6	30,64	10,37	2,39

VI.2.4. Gélatine

La gélatine utilisée pour la stabilisation des matrices artificielles est une gélatine issue de porc, gracieusement fournie par la société Rousselot SAS (Courbevoie, France). Ses caractéristiques sont les suivantes (données fournies par le fabricant) :

- ♦ force de gel (méthode A.O.A.C. ; 6,67% ; 10 °C) : 257 g ;
- ♦ viscosité (solution à 6,67% à 60 °C) : 3,75 mPa.s ;
- ♦ taux de cendres (mesurée par pesée avant et après calcination à 550 °C) : < 2%.

La gélatine a toujours été utilisée après avoir été dissolue à 200 g/L dans de l'eau maintenue à 70 °C sous agitation.

VI.3. Pilote expérimental : production et piégeage de fumées, fumage de produits

Le pilote utilisé s'articule autour d'un générateur de fumée à friction, comme montré dans la Figure 42. Les turbines de tirages permettent de mettre la fumée en mouvement à travers le pilote en créant une aspiration. La bifurcation en sortie du générateur permet de choisir le parcours réalisé par les fumées en fonction de l'application souhaitée :

- (a) directement vers le piège (distance parcourue : 80 cm) ;
- (b) vers le piège via une dérivation permettant un temps de séjour de la fumée dans les conduites avant d'atteindre le piège (distance parcourue : 480 cm) ;
- (c) vers la cellule de fumage, pour l'exposition de produits à la fumée (distance parcourue : 100 cm).

Une centrale de mesure permet d'enregistrer en ligne divers paramètres de fonctionnement du pilote.

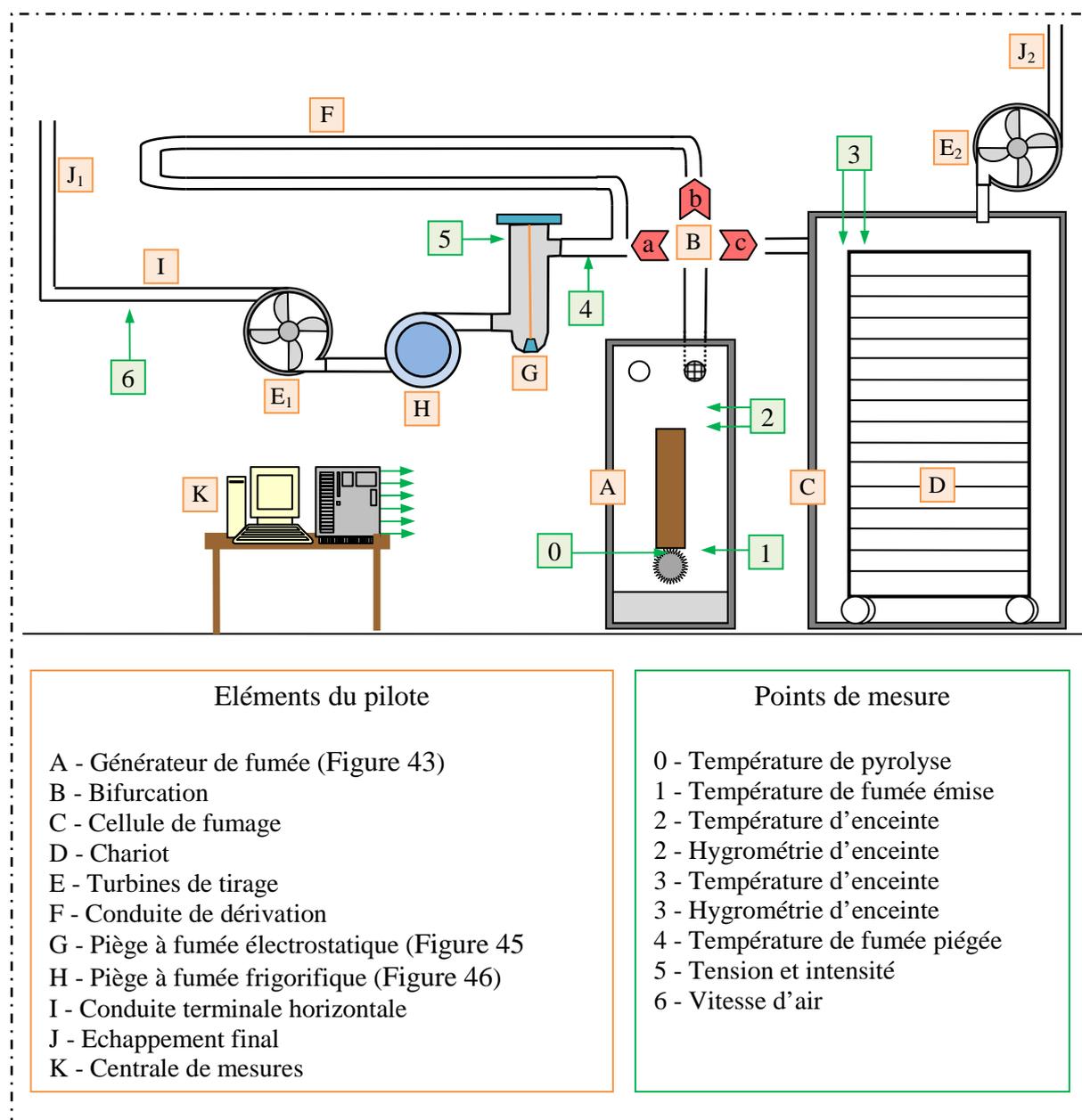


Figure 42 : Schéma de principe du pilote expérimental

VI.3.1. Générateur de fumée

Le générateur de fumée utilisé (Figure 43) est un générateur industriel à friction (FR 1002, Murevo, Pays Bas). Les bûches calibrées sont pressées cycliquement (système pneumatique à 3,5 bars) contre le rotor cranté tournant à vitesse constante. L'échauffement ainsi obtenu permet d'atteindre la température de pyrolyse des constituants du bois et de produire de la fumée. Plus le temps d'appui est long, plus la température atteinte par la bûche au niveau de la zone de friction est élevée.

Le générateur utilisé a été aménagé afin de permettre une augmentation de l'aération de la zone de pyrolyse par l'apport d'air comprimé (3,5 bars) au plus près du contact entre la bûche et le rotor.

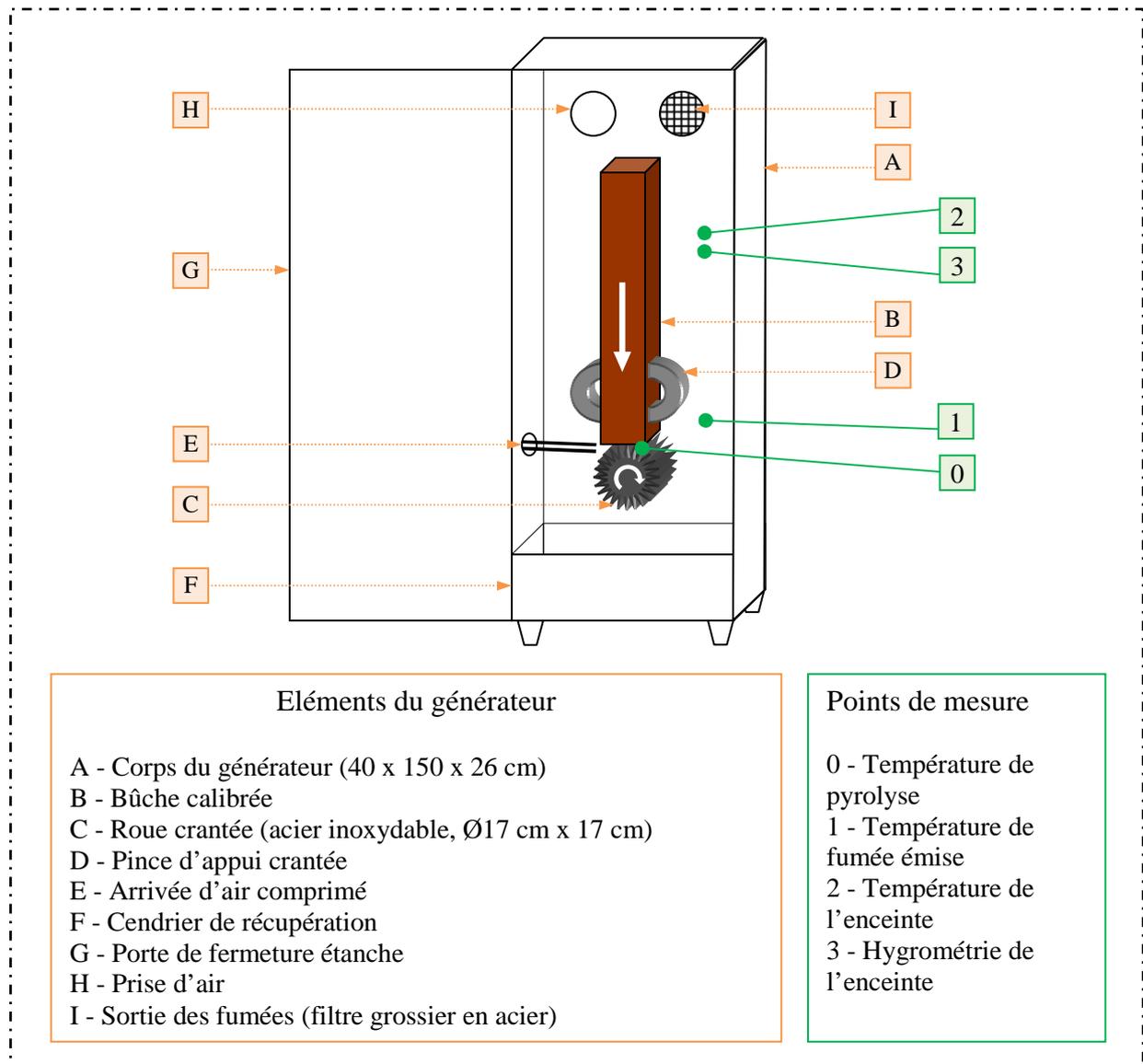


Figure 43 : Schéma de principe du générateur de fumée à friction

Chaque cycle de friction est suivi d'un cycle de relaxation de 20 secondes pendant lequel la rotation du rotor et l'appui de la bûche sont interrompus.

Le temps d'appui de la bûche est ajustable dans une gamme de durées allant environ de 5 à 45 secondes. En dessous de 5 secondes, il n'est pas toujours possible d'obtenir une pyrolyse significative et au-delà de 45 secondes, les risques d'endommager l'appareil deviennent importants. Plus le temps d'appui utilisé est long, plus la température de pyrolyse atteinte est élevée (Figure 44).

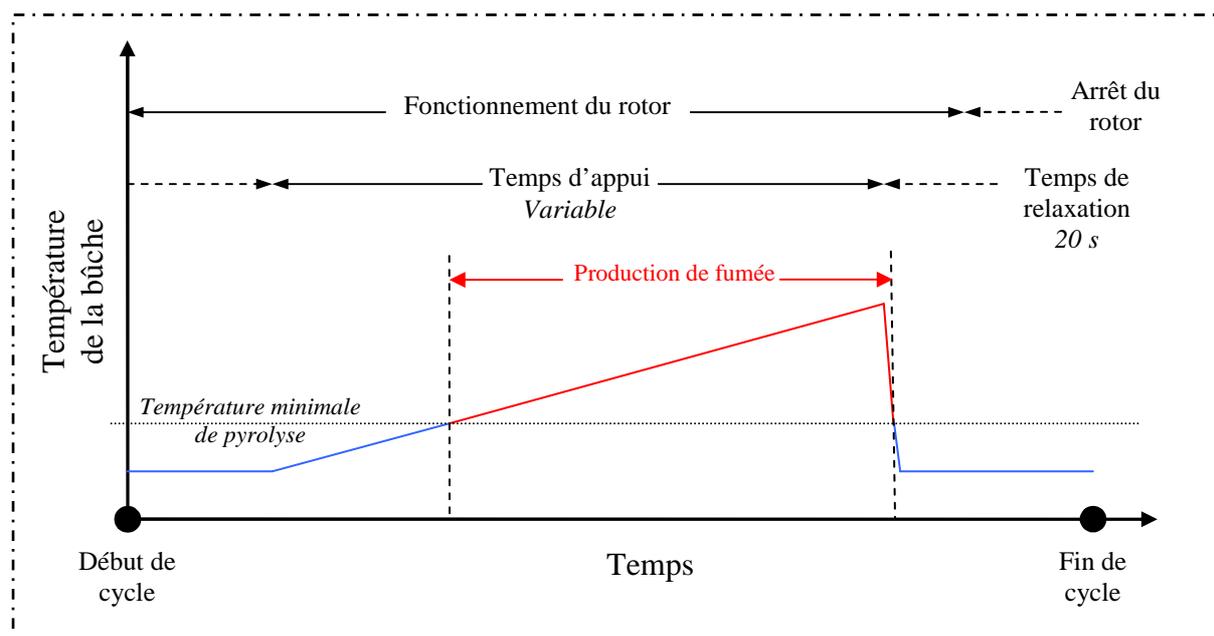


Figure 44 : Cycle de fonctionnement du générateur de fumée

VI.3.2. Piège à fumée

Le piège à fumée utilisé comporte deux étages distincts fonctionnant en série, le but étant de pouvoir récupérer sélectivement les deux fractions qui composent la fumée. Dans un premier temps, la fraction particulaire est retenue par précipitation électrostatique, puis la phase gazeuse est condensée par un système frigorifique.

Le piège électrostatique a été mis en place spécifiquement pour les besoins de ces travaux. Il a été développé et construit au sein de l'IFREMER pour répondre aux exigences des expérimentations réalisées. Il est constitué de conduites en acier inoxydable et de pièce isolantes en téflon (Figure 45). Le corps du piège est relié à la masse du système et l'électrode centrale en cuivre (isolée du reste par l'épaisseur de téflon) à un générateur de haute tension.

L'application d'une forte tension aux bornes du piège ($U > 35 \text{ kV}$; $I < 0,1 \text{ mA}$) génère un champ électrique à l'intérieur de celui-ci. La tension doit être suffisante pour pouvoir ioniser l'air à l'intérieur du piège mais assez basse pour éviter la formation d'arcs électriques entre l'électrode et la masse. En effet, lorsque cela se produit, le champ électrique est annulé en même temps que la différence de potentiel, ce qui stoppe immédiatement le piégeage des fumées. Lorsque le piège fonctionne correctement, les particules de fumée contenues dans le flux d'air sont ionisées positivement au voisinage de l'électrode. Le corps du piège étant relié

à la masse du système, les particules ionisées sont précipitées par les forces électrostatiques vers la paroi interne où elles se déposent et s'accumulent pendant toute la durée de l'expérience.

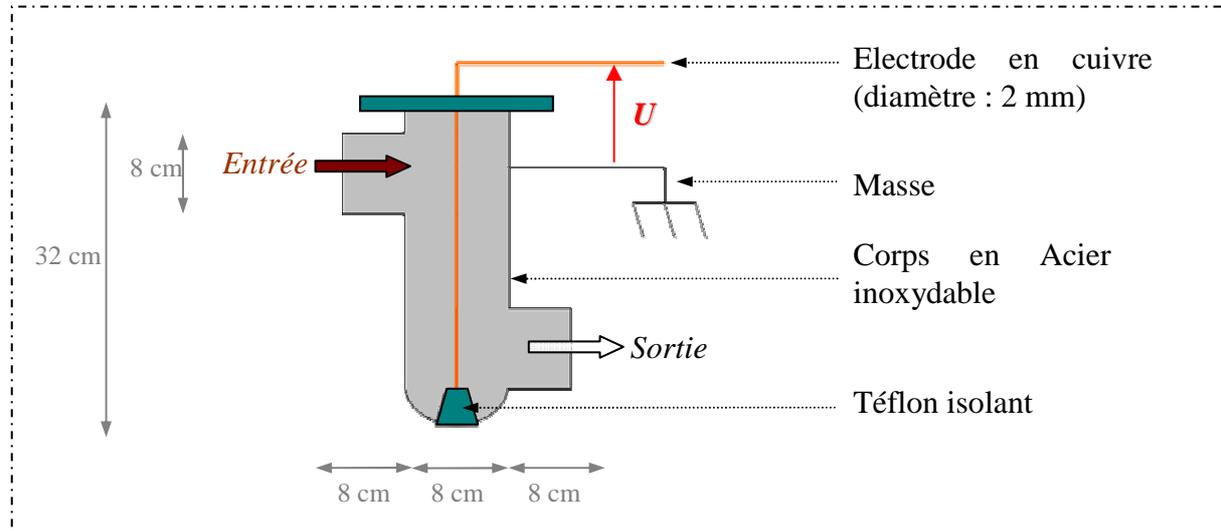


Figure 45 : Schéma de principe du piège électrostatique

Immédiatement en sortant du piège électrostatique, le flux d'air passe dans la double enveloppe d'un ballon en verre (diamètre externe, 17 cm ; diamètre interne 15 cm) contenant de la glace carbonique (Figure 46). Les composés volatils présents à l'état gazeux dans le flux d'air sont condensés sur la paroi interne et récupérés sur la paroi interne et dans le ballon inférieur.

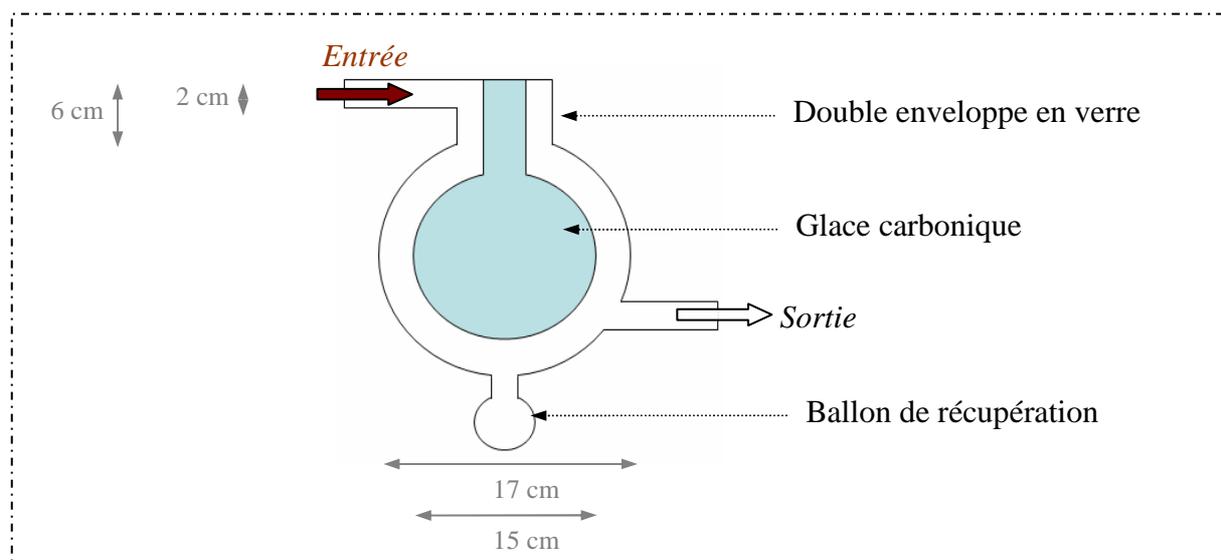


Figure 46 : Schéma de principe du piège frigorifique

VI.3.3. Cellule de fumage

Le fumoir utilisé est une enceinte HMI Thirode (modèle PC90) de 130 x 150 x 225 cm équipée d'un chariot muni de grilles sur 28 niveaux pour déposer les produits.



Figure 47 : Cellule de fumage pilote utilisée pour les expériences

La cellule de fumage est équipée d'un capteur interne de température sèche et de température humide pour mesurer en permanence la température et l'hygrométrie interne. Après programmation des valeurs de consigne, la régulation de température et hygrométrie de l'enceinte est obtenue par le biais de l'air d'admission : un groupe frigorifique (échangeur au glycol réfrigéré) et un groupe calorifique (résistances chauffantes) en modulent la température tandis que des sprays à eau peuvent l'humidifier en cas d'assèchement de l'air dans l'enceinte de fumage.

L'ouverture de la trappe d'évacuation des fumées est réglable, permettant de changer le temps de séjour de la fumée : plus la trappe est fermée, moins la fumée est renouvelée.

VI.3.4. Conduites et turbines

La bifurcation qui permet de diriger les fumées sortant du générateur vers les autres parties du pilote est une conduite flexible en aluminium anodisé de 15 cm de diamètre et 80 cm de longueur. Celle-ci est sélectivement reliée à l'entrée du piège, de la conduite de dérivation ou de la cellule de fumage.

La conduite de dérivation qui permet d'augmenter la distance parcourue par la fumée avant d'atteindre le piège est constituée de tubes en PVC de diamètre 15 cm pour une longueur totale de 400 cm.

La conduite terminale horizontale placée en aval de la turbine de tirage est en aluminium anodisé de 15 cm de diamètre et 230 cm de longueur.

Les turbines centrifuges utilisées ont été choisies pour permettre d'ajuster les débits de tirage aux différentes conditions expérimentales employées :

- ♦ 30 m³/h lors du piégeage des fumées (turbine indépendante, débit de tirage réglé en ajustant la puissance de la turbine par un potentiomètre) ;
- ♦ 90 m³/h lors du fumage de produits (turbine intégrée à la cellule de fumage et pilotée par celle-ci, débit de tirage réglé directement sur une valeur de consigne).

VI.3.5. Centrale de mesure

La centrale de mesure possède deux modules enregistreurs de données :

- ♦ Velleman SA data logger : relevés de température (6 mesure par seconde) ;
- ♦ Pico data logger : mesures d'intensité et de tension, mesures de débit d'air (84 mesures par seconde).

Ces deux modules sont pilotés par ordinateur, afin de pouvoir récupérer les données synchronisées acquises pendant l'expérimentation une fois celle-ci terminée.

VI.3.5.1. Mesures de température et d'hygrométrie

Les relevés de températures ont été réalisés avec des thermocouples de type K (chromel/alumel) placés en différents points du pilote (Figure 42).

Les mesures de température de pyrolyse ont été effectuées en insérant un thermocouple dans un trou percé au centre de bûches. Ces mesures ont fait l'objet d'essais spécifiques, afin de ne pas contaminer les fumées expérimentales par les produits issus de la destruction du thermocouple et de sa gaine et plastique au niveau de la zone de contact bûche/rotor.

Les données d'hygrométrie ont été obtenues à l'aide d'une mesure de température « sèche » (sonde seule) et d'une mesure de température « humides » (sonde entourée d'un manchon imbibé d'eau) réalisées à proximité l'une de l'autre. La différence de température

mesurée permet de déterminer l'hygrométrie de l'enceinte à partir d'un diagramme de l'air humide (Figure 48).

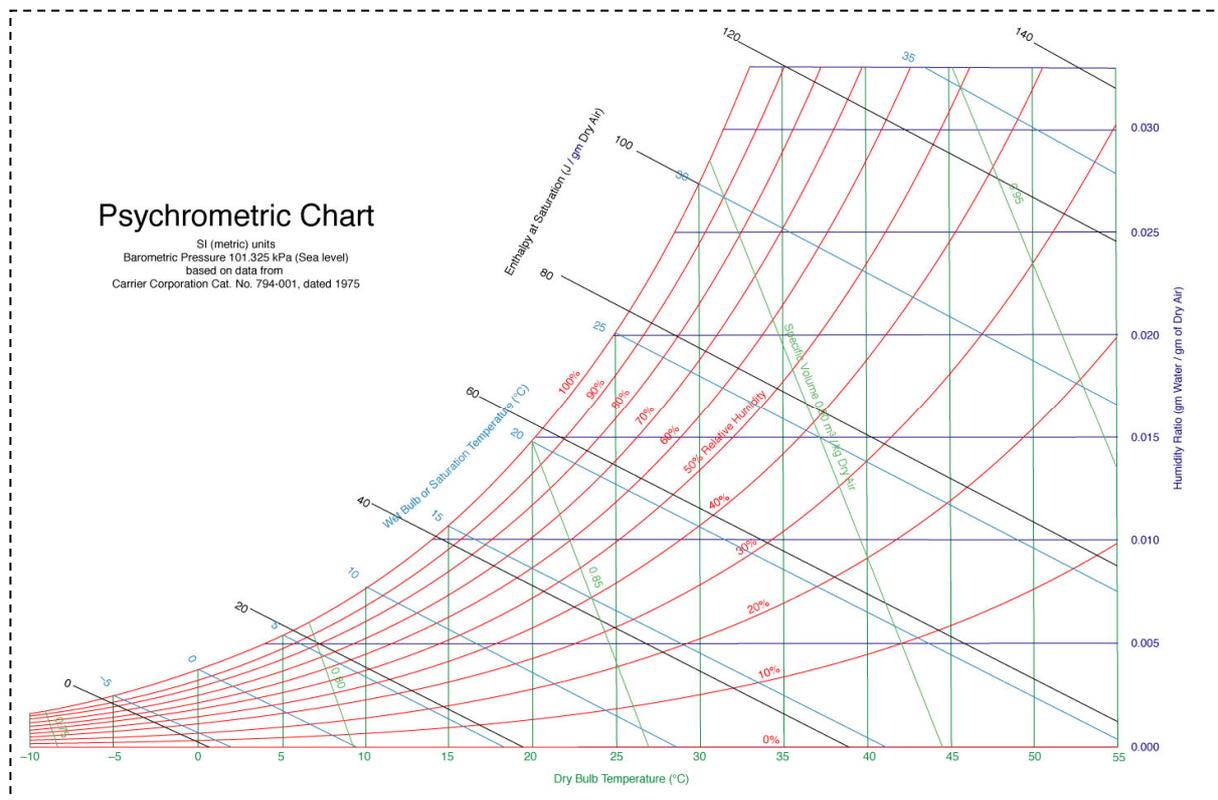


Figure 48 : Diagramme de l'air humide

VI.3.5.2. Mesure de débit gazeux

Les débits de gaz ont été estimés après la turbine de tirage, dans la conduite d'échappement final. Un anémomètre à boule chaude permet de connaître la vitesse d'air instantanée au centre de la conduite.

Dans l'hypothèse d'un régime d'écoulement turbulent uniforme dans la conduite, le débit volumique instantané est calculé en multipliant la vitesse d'air instantanée au centre de la conduite par la section de celle-ci.

Les mesures de débit ont fait l'objet d'essais spécifiques sans production de fumée, dans les différentes conditions utilisées pour les expériences. Ceci permet d'éviter la détérioration de l'anémomètre utilisé, en cas de piégeage incomplet des fumées.

VI.3.5.3. Mesure de tension et d'intensité

Les mesures de tension et d'intensité ont été obtenues en reliant la centrale de mesure aux bornes de sortie du générateur à haute tension par l'intermédiaire d'un pont diviseur de tension.

Ces mesures sont utilisées *a posteriori* pour vérifier que le piégeage électrostatique des fumées n'a pas été interrompu au cours de l'expérience (ce qui se traduit par exemple par une chute brusque de tension en cas d'arc électrique).

VI.4. Obtention de condensats de fumée expérimentaux

VI.4.1. Production de fumée : conditions opératoires et planification expérimentale

A l'aide des dispositifs expérimentaux décrits précédemment, un ensemble de 24 fumées expérimentales (Tableau 15) a été produit selon un plan d'expérience de type 2^{5-1} modifié pour pouvoir tester le facteur « temps d'appui » sur trois niveaux. Les cinq paramètres opérationnels testés sont :

- ◆ temps d'appui de la bûche sur le rotor lors de chaque cycle de production ;
- ◆ essence de bois utilisée ;
- ◆ humidité du bois utilisé ;
- ◆ distance parcourue par la fumée avant d'atteindre le piège ;
- ◆ apport ou non d'air comprimé au niveau de la zone de pyrolyse.

La production de fumée a été réalisée pendant un nombre de cycles variable permettant d'avoir une durée totale de production de fumée égale à 6 minutes, quel soit le temps d'appui utilisé : respectivement 72, 18 et 8 cycles pour des temps d'appui de 5, 20 et 45 s.

Une fois le dernier cycle de production terminé, le piège est laissé actif pendant 5 minutes, avec la turbine de tirage en fonction, pour permettre la récupération des fumées restantes à l'intérieur de la chambre du générateur de fumée.

La bûche utilisée, le piège électrostatique et le cendrier de récupération des imbrûlés sont pesés avant et après l'expérience, afin de pouvoir établir les bilans de matière (consommation, production et piégeage).

Tableau 15 : Plan d'expérience de génération des fumées expérimentales

Point exp.	Temps d'appui (s)	Essence de bois	« Humidité » du bois	Distance générateur - piège (cm)	Apport d'air comprimé
F01	5	Chêne	Sec	80	Sans
F02	20	Chêne	Sec	80	Avec
F03	45	Chêne	Sec	80	Avec
F04	5	Hêtre	Sec	80	Avec
F05	20	Hêtre	Sec	80	Sans
F06	45	Hêtre	Sec	80	Sans
F07	5	Chêne	Sec	480	Avec
F08	20	Chêne	Sec	480	Sans
F09	45	Chêne	Sec	480	Sans
F10	5	Hêtre	Sec	480	Sans
F11	20	Hêtre	Sec	480	Avec
F12	45	Hêtre	Sec	480	Avec
F13	5	Chêne	Humide	80	Avec
F14	20	Chêne	Humide	80	Sans
F15	45	Chêne	Humide	80	Sans
F16	5	Hêtre	Humide	80	Sans
F17	20	Hêtre	Humide	80	Avec
F18	45	Hêtre	Humide	80	Avec
F19	5	Chêne	Humide	480	Sans
F20	20	Chêne	Humide	480	Avec
F21	45	Chêne	Humide	480	Avec
F22	5	Hêtre	Humide	480	Avec
F23	20	Hêtre	Humide	480	Sans
F24	45	Hêtre	Humide	480	Sans

VI.4.2. Récupération des fumées piégées

Une série de piégeages a été réalisée pour tester l'efficacité et la pertinence des deux étapes du piège à fumée (piégeage électrostatique et piège frigorifique). A la suite de ces essais, les condensats de fumée expérimentales étudiées ont été produits en utilisant uniquement le piège électrostatique, puisque l'utilisation du piège frigorifique ne représente pas un apport significatif à l'analyse (voir VIII.4, p.156).

Les fumées condensées à l'intérieur du piège ont été récupérées par rinçage avec 250 mL d'une solution de soude molaire de l'ensemble des parties internes de celui-ci (corps vertical, conduite d'entrée et de sortie horizontale, électrode et pièces isolantes en téflon).

Le piège ainsi que les flacons de solutions et de récupération sont pesés avant et après le rinçage, afin de pouvoir déterminer les masses de fumées récupérées et l'efficacité du rinçage.

VI.4.3. Conservation des échantillons

Les fumées en solution dans la soude ont été conservées à +4 °C dans des flacons en verre hermétique, pas plus de 48 h avant d'être analysées pour leur composition en composés volatiles.

Quelques millilitres de chaque fumée liquide ont été congelés dans des flacons en verre et conservés à -18 °C pour analyser les teneurs en HAP ultérieurement.

VI.5. Fabrication de matrices modèle à base de poisson

VI.5.1. Matrices modèles à base de pulpe de poisson

Des matrices ont été formulées et fabriquées dans l'optique de pouvoir reproduire une grande variété de composition de filets de poisson. Le but étant de pouvoir déterminer si dans des conditions identiques, des différences de composition peuvent induire des différences de comportement du produit vis-à-vis du fumage. Ce sont en particulier les phénomènes de dépôt et de sorption des composés de la fumée sur les matrices qui ont ainsi été étudiées lors de fumage réel ou d'exposition à des espaces de tête statiques.

Les matrices reconstituées ont été fabriquées à l'aide d'une base de pulpe de poisson (fraction protéique myofibrillaire du filet). A celle-ci sont ajoutés ou non certains constituants dans le but de s'approcher au mieux de la chair de poisson :

- ◆ du NaCl permet de reproduire la teneur en sel d'un filet salé prêt au fumage ;
- ◆ l'ajout d'huile apporte la phase lipidique retrouvée chez les poissons gras ;
- ◆ différents ajouts d'eau modifient la teneur en eau globale du produit ;
- ◆ de la gélatine permet de stabiliser les matrices de grande taille pendant les expériences de mise en conditions de fumage réel.

VI.5.1.1. Obtention de la pulpe

La pulpe de poisson a été obtenue à partir des filets de poisson frais. Des poissons maigres ont été utilisés afin de pouvoir obtenir directement une pulpe de poisson exempte de lipides.

Dans un premier temps 2 kg de filets de lieu noir et 2 kg de filets de cabillaud sont traités séparément. Les arrêtes sont retirées manuellement et les filets sont découpés grossièrement au couteau. Les morceaux de filets sont passés par un hachoir à viande ménager. Le broyat obtenu est lavé successivement 3 fois dans 2 fois son volume d'eau. L'eau de rinçage est

éliminée par centrifugation 10 minutes à 6000 g et 3 °C pour ne conserver que la pulpe de poisson.

Après pesée, les pulpes issues de lieu noir et de cabillaud sont mélangées avec un ratio 1:1 (m/m). Le mélange obtenu est passé dans un cutter maintenu à 3 °C jusqu'à obtention de l'homogénéité (environ 1 minute).

La pulpe finale est conditionnée sous vide dans des sacs thermoscellés pour être stockée à -80 °C jusqu'à son utilisation.

VI.5.1.2. Caractérisation de la pulpe

Les caractéristiques de la pulpe sont les suivantes (moyennes et écart-types, obtenus sur trois répétitions de chaque mesure. Le détail des méthodes est donné en annexes) :

- ♦ teneur en huile (méthode de Folch) : $1,03\% \pm 0,25$;
- ♦ teneur en protéines (méthode de Kjeldahl) : $18,51\% \pm 0,42$;
- ♦ teneur en cendres (carbonisation à 550 °C) : $0,90\% \pm 0,08$;
- ♦ teneur en eau (pesées avant et après dessiccation à 103 °C) : $80,52\% \pm 0,28$.

VI.5.2. Fabrication des matrices

Les matrices ont été fabriquées en mélangeant l'ensemble des constituants à l'aide d'un cutter ménager (contenance de bol 280 mL).

Après décongélation à 4°C des huiles et de la pulpe de poisson nécessaires, les ingrédients sont pesés et mesurés séparément :

- ♦ 45 g de pulpe de poisson ;
- ♦ de 0 à 10 g d'une des huiles ;
- ♦ de 0 à 20 g d'eau ;
- ♦ 2 g de NaCl ;
- ♦ 5 mL de solution de gélatine (200 g/L) ou 5 mL d'eau.

Pendant toute la durée du protocole, le cutter est plongé dans un bain de glace pour éviter l'échauffement des constituants.

D'abord, la pulpe est mixée seule pendant une minute. Ensuite, l'eau, l'huile et le sel sont ajoutés à la mûlée et mixés en continu pendant deux minutes. Enfin, la solution de gélatine est ajoutée et l'ensemble est mixé pendant une minute pour obtenir une pête homogène.

Selon leur utilisation, les matrices sont ensuite moulées dans des contenants adaptés à leur utilisation de manière à obtenir dans tous les cas une surface plane :

- ♦ les matrices destinées à être fumées sont placées dans des boîtes de pétri en plastique (8,6 cm de diamètres et 1 cm de profondeur). Elles sont ensuite conservées dans leurs boîtes fermées une nuit à 4 °C avant d'être fumées.
- ♦ les matrices fabriquées pour être exposées à des espaces de têtes statiques sont mises dans des coupelles en verre cylindriques (9,6 mm de diamètre et 6 mm de profondeur). Elles sont conservées congelées à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

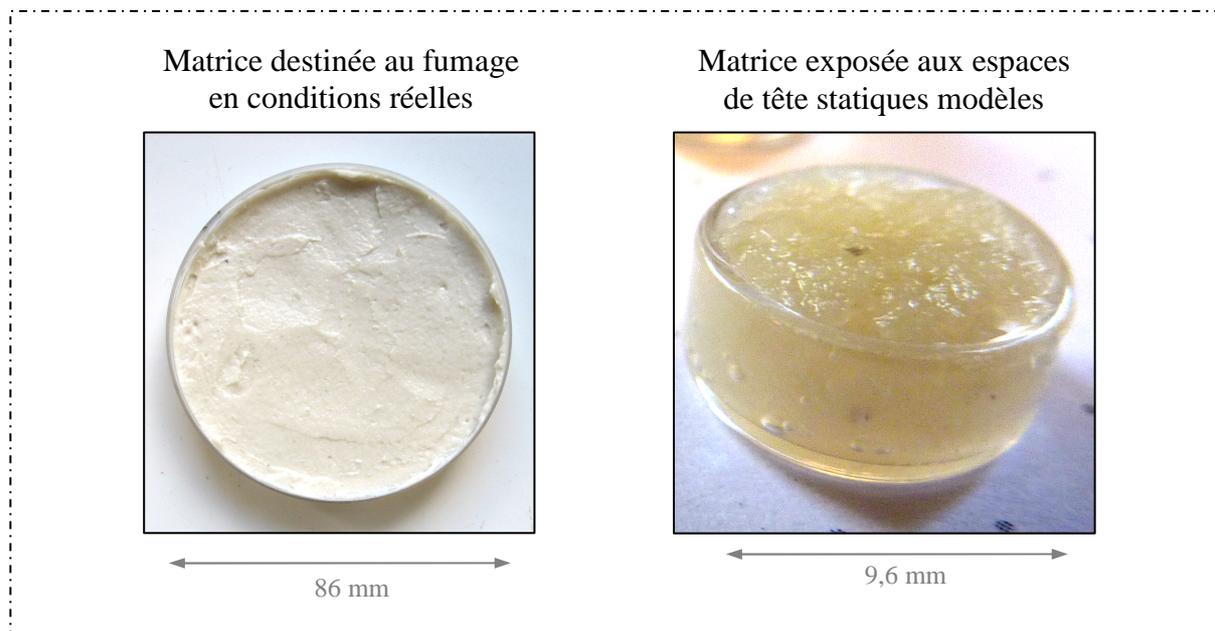


Figure 49 : Matrices prêtes à être utilisées pour les expérimentations

VI.5.2.1. Plans de formulation

VI.5.2.1.1. Matrices utilisée pour l'étude du fumage réel

Les matrices ont été formulées suivant un plan d'expérience D-optimal (déterminé à l'aide du logiciel SAS/QC, SAS Institute Inc., NC, États-unis). Celui-ci prend en compte un facteur technologique et trois facteurs de composition (Tableau 16) :

- ♦ la durée de fumage de chaque matrice ;
- ♦ la quantité d'huile ajoutée ;
- ♦ l'origine de l'huile ajoutée ;
- ♦ la quantité d'eau ajoutée.

Tableau 16 : Plan d'expérience D-optimal de formulation et d'exposition des matrices à la fumée

Point exp.	Durée de fumage (min)	Type d'huile utilisée	Ajout d'huile (g)	Ajout d'eau (g)
M01	30	Saumon	5	0
M02	30	Saumon	10	0
M03	30	-	0	10
M04	30	-	0	20
M05	30	Arachide	5	20
M06	30	Arachide	10	10
M07	30	Arachide	10	0
M08	30	-	0	20
M09	30	-	0	0
M10	30	Chimère	5	10
M11	30	Chimère	10	20
M12	30	-	0	0
M13a	60	Saumon	5	10
M13b	60	Saumon	5	10
M13c	60	Saumon	5	10
M14	60	Saumon	10	20
M15	60	-	0	0
M16	60	Arachide	5	0
M17	60	Arachide	10	0
M18	60	-	0	10
M19	60	-	0	20
M20	60	Chimère	5	20
M21	60	Chimère	10	10
M22	60	-	0	0
M23	120	Saumon	5	20
M24	120	Saumon	10	10
M25	120	Saumon	10	0
M26	120	-	0	20
M27	120	-	0	0
M28	120	Arachide	5	10
M29	120	Arachide	5	0
M30	120	Arachide	10	20
M31	120	-	0	10
M32	120	-	0	0
M33	120	Chimère	5	0
M34	120	Chimère	10	0
M35	120	-	0	10
M36	120	-	0	20

Ces matrices étant de grande taille et utilisées dans des expériences de plus longue durée, la gélatine a été intégrée dans toutes les formulations. Sans cela, les matrices ne sont pas assez stables pour ne pas évoluer au cours de l'expérience (relargage massif d'eau et d'huile vers la surface de la matrice).

VI.5.2.1.2. Matrices utilisées pour l'étude des phénomènes de sorption

Les matrices ont été formulées selon un plan d'expérience à trois facteurs (Tableau 17) faisant varier :

- ♦ la part grasse des matrices (ajout ou non de 10 g de l'une des huiles) ;
- ♦ la teneur en eau des matrices (ajout ou non de 20 g d'eau) ;
- ♦ la présence de gélatine (ajout de solution de gélatine à la place d'eau).

Tableau 17 : Plan de fabrication des matrices utilisées pour l'étude des phénomènes de sorption

Point exp.	Type d'huile utilisée	Ajout d'huile (g)	Ajout de gélatine (g)
A01	-	0	0
A02	Chimère	0	0
A03	Arachide	0	0
A04	Saumon	0	0
A05	-	20	0
A06	Chimère	20	0
A07	Arachide	20	0
A08a	Saumon	20	0
A08b	Saumon	20	0
A08c	Saumon	20	0
A09	-	0	1
A10	Chimère	0	1
A11	Arachide	0	1
A12	Saumon	0	1
A13	-	20	1
A14	Chimère	20	1
A15	Arachide	20	1
A16	Saumon	20	1

VI.6. Isolation des protéines sarcoplasmiques de poisson

Les protéines sarcoplasmiques solubles de la chair de poisson ont été isolées à partir de filets frais de lieu noir et de cabillaud frais.

Dans un premier temps, 2 kg de filets des deux espèces de poisson sont traités séparément. Les filets sont coupés grossièrement et les arrêtes retirées manuellement. La chair est ensuite hachée à l'aide d'un hachoir à viande ménager. Les broyats obtenus sont lavés par agitation mécanique pendant 10 minutes dans environ deux fois leur volume d'eau. La solution est séparée de la pulpe par centrifugation à 6000 g pendant 10 minutes à 10 °C.

Le surnageant est divisé en fraction de 100 à 250 mL dans des décanteurs en verre pour obtenir une profondeur de liquide inférieure à 2 cm. Après congélation complète à -18 °C, l'ensemble des solutions de protéines est lyophilisé.

Les poudres de protéines obtenues à partir de cabillaud et de lieu noir sont mélangées avec un ratio 1/1 (m/m) et conservées dans des flacons étanches à -18 °C jusqu'à leur utilisation.

VII. Méthodes d'étude

VII.1. Fumage de matrices modèles

VII.1.1. Conditions opératoires

VII.1.1.1. Génération de fumée

Pour fumer des matrices, le pilote expérimental a été placé dans la configuration où la fumée issue du générateur est envoyée directement vers la cellule de fumage. La fumée a été générée selon les conditions opératoires qui ont permis une maximisation de la production de composés cibles (composés phénoliques et HAP) lors de la caractérisation du générateur de fumée (voir XI, p.173) :

- ♦ temps de friction : 45 s (avec 20 s de relaxation entre chaque cycle) ;
- ♦ essence de bois : hêtre ;
- ♦ humidité du bois : « sec » (7,64%) ;
- ♦ pas d'aération forcée de la zone de pyrolyse ;
- ♦ pas de conduite de dérivation entre le générateur et le fumoir.

VII.1.1.2. Conditions d'exposition dans le fumoir

L'exposition des matrices à la fumée est réalisée dans des conditions de fumage à froid, avec une hygrométrie de 60% et une température de 32 °C.

A l'intérieur de la cellule, la circulation de la fumée se fait horizontalement avec la valve d'échappement ouverte au tiers.

VII.1.2. Exposition des matrices

Les matrices devant être exposées à la fumée pour une même durée ont été disposées sur une même grille du chariot, afin de pouvoir les retirer du fumoir simultanément.

Les matrices ont été réparties aléatoirement dans la partie centrale de chaque grille, de manière à laisser au moins 30 cm d'espace avec les parois de l'enceinte.

Les grilles ont été placées en position 10, 12 et 14 sur le chariot (sur 28 positions disponibles, numérotées depuis le haut du chariot) de sorte à occuper la partie centrale du fumoir et laisser la fumée circuler librement.

Une fois le tirage effectif, et après mise en équilibre de la température et de l'hygrométrie à l'intérieur de la cellule de fumage, le chariot est introduit dans l'enceinte. Le générateur est ensuite mis en marche continue, avec alternance de cycles de production (45 s) et de repos (20 s).

Sans interrompre la séquence de fumage, l'enceinte a été ouverte au bout de 30, 60 et 120 minutes pour retirer les matrices correspondant à ces temps de fumage (Tableau 16, p.118).

VII.1.3. Conservation des matrices

Une fois sorties du fumoir, la surface des matrices a été protégée par une feuille d'aluminium, afin d'éviter le contact avec le plastique du couvercle de la boîte de pétri. Les matrices ont été immédiatement congelées dans la glace carbonique pour limiter au maximum leur évolution dès la fin de leur fumage.

Elles ont ensuite été conservées à -20 °C jusqu'à leur analyse.

VII.1.1. Analyse des matrices fumées

Les matrices modèles fumées sont analysées par dosage des composés phénoliques volatils et hydrocarbures aromatiques polycycliques selon des méthodes décrites ultérieurement :

- ♦ VII.3 Dosage des composés phénoliques, p.129 ;
- ♦ VII.4 Dosage des HAP, p. 138.

VII.2. Mesure de l'adsorption des composés phénoliques à l'état gazeux

VII.2.1. Objectif et principe

L'objectif de ces expérimentations est de mesurer le piégeage par adsorption de composés phénoliques à l'état gazeux par différentes matrices. L'expérience repose sur la génération d'un espace de tête contenant des composés phénolique à l'état gazeux et d'y exposer un échantillon (solide ou liquide). Les composés phénoliques pouvant interagir avec l'échantillon pendant la durée d'exposition ont alors la possibilité d'être retenus à sa surface (Figure 50-A).

Pour réaliser ces expérimentations, l'enrichissement des espaces de tête a été réalisé en introduisant de faibles quantités de solutions concentrées en composés phénoliques dans des vials hermétiquement scellés contenant les échantillons. Les composés phénoliques volatils passent alors à l'état gazeux par évaporation rapide. La quantité d'analytes présents dans l'espace de tête est mesurée par GC-MS-FID après HS-SPME.

Les résultats obtenus en présence des différents échantillons sont comparés aux résultats obtenus pour une référence où l'expérience a été réalisée en remplaçant l'échantillon par une pièce inerte. La différence de résultat obtenue entre la référence et les échantillons correspond à la quantité de composés phénoliques effectivement retenus à la surface du produit.

Le fait de disposer les échantillons dans des coupelles en verre calibrées permet de tester des échantillons aussi bien liquides que solides, tout en garantissant une surface d'exposition identique pour tous les échantillons d'un même type.

Cette technique permet également l'étude du relargage des composés adsorbés par des échantillons solides : après la phase d'adsorption, l'échantillon est transféré dans un vial neuf et une analyse par HS-SPME est réalisée sur l'espace de tête qu'il permet de générer (Figure 50-B)

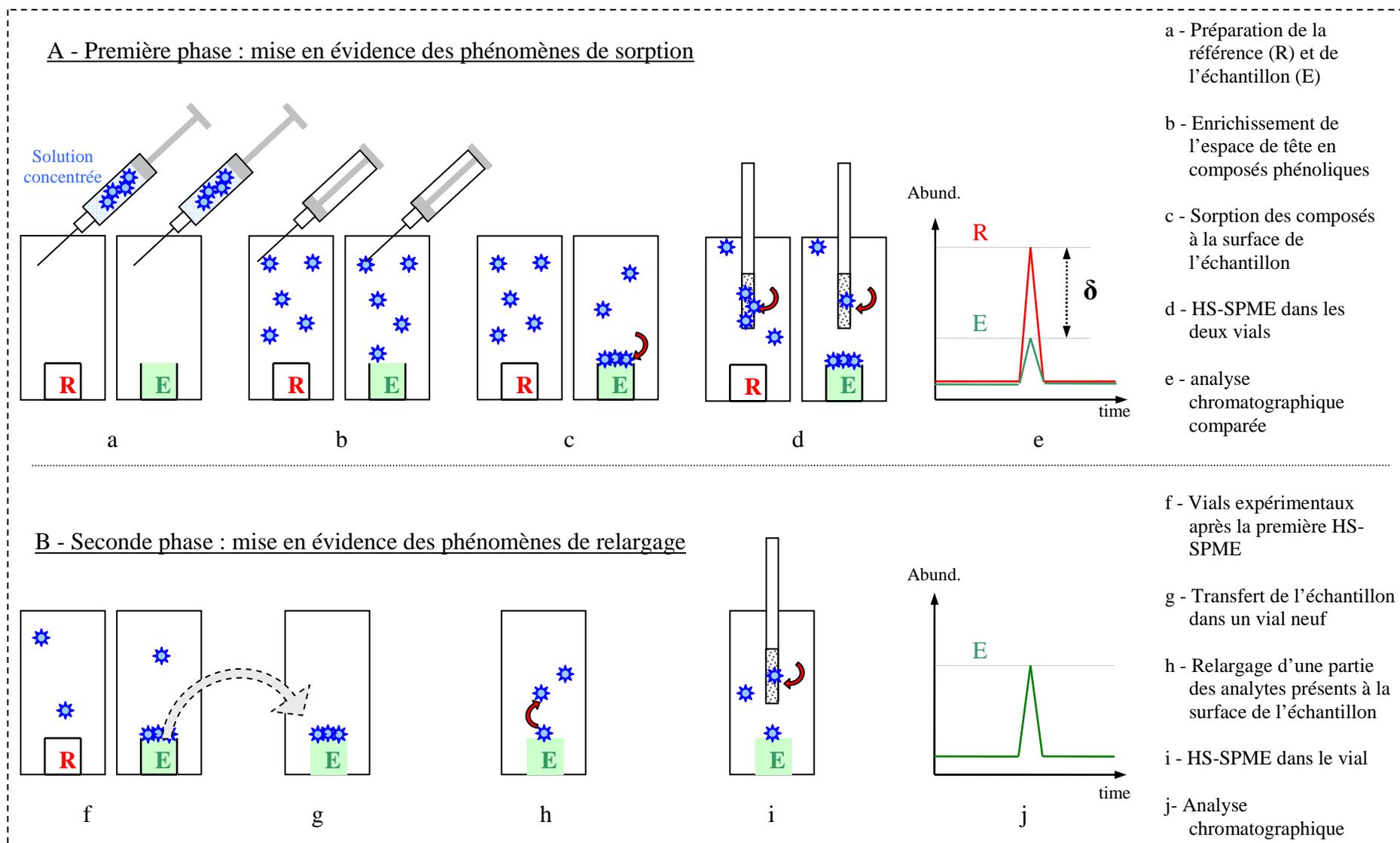


Figure 50 : Schéma de principe du déroulement des deux phases de l'expérience

VII.2.2. Mise au point

Plusieurs séries d'essais préliminaires ont permis de déterminer les paramètres de l'expérience adaptés aux études réalisées en terme de :

- ♦ surface d'échantillon exposé à l'espace de tête ;
- ♦ contenant dans lequel est placé l'échantillon ;
- ♦ mode de dépôt de la solution de composés phénoliques dans le vial;
- ♦ solvant utilisé pour préparer la solution de composés phénoliques ;
- ♦ concentration de la solution de composés phénoliques utilisés ;
- ♦ volume de solution de composés phénoliques introduite dans le vial ;
- ♦ composés phénoliques présents en solution simultanément ;
- ♦ température de thermostat du vial ;
- ♦ durée d'exposition de l'échantillon ;
- ♦ durée d'exposition de la fibre SPME.

VII.2.3. Mode opératoire première phase : adsorption

VII.2.3.1. Préparation de l'échantillon

Les échantillons sont placés dans des coupelles en verre de forme cylindrique (9,6 mm de diamètre et 6 mm de profondeur) disposées au fond de vials en verre de 20 mL.

VII.2.3.2. Préparation de la référence

Les essais servant de référence sont réalisés en remplaçant la coupelle en verre contenant l'échantillon par une pièce en verre de même gabarit. Ceci, permet d'occuper le même volume que l'échantillon dans le vial tout en n'exposant que des surfaces inerte à l'espace de tête.

Pour chaque série d'analyse, la référence est estimée par la moyenne de trois répétitions.

VII.2.3.3. Enrichissement de l'espace de tête

2,5 µg de chacun des composés phénoliques étudiés (phénol, o-crésol, p-crésol, guaiacol, 2,6-diméthylphénol, 3-éthylphénol, 4-méthylguaiacol, 4-éthylguaiacol, thymol, 4-vinylguaiacol, syringol, eugénol, 4-propylguaiacol, (Z)isoeugénol/(E)isoeugénol) sont introduits dans le vial expérimental : 5 µL d'une solution de méthanolique contenant chaque analyte à 0,5 g/L sont prélevés à l'aide d'une pipette automatique et répartis sur le pourtour intérieur du vial contenant l'échantillon, à 3 cm de l'ouverture (Figure 51). Le vial est

immédiatement scellé hermétiquement avec un bouchon muni d'un septum en téflon et mis à incuber dans un bloc chauffant thermostaté à 35 °C.

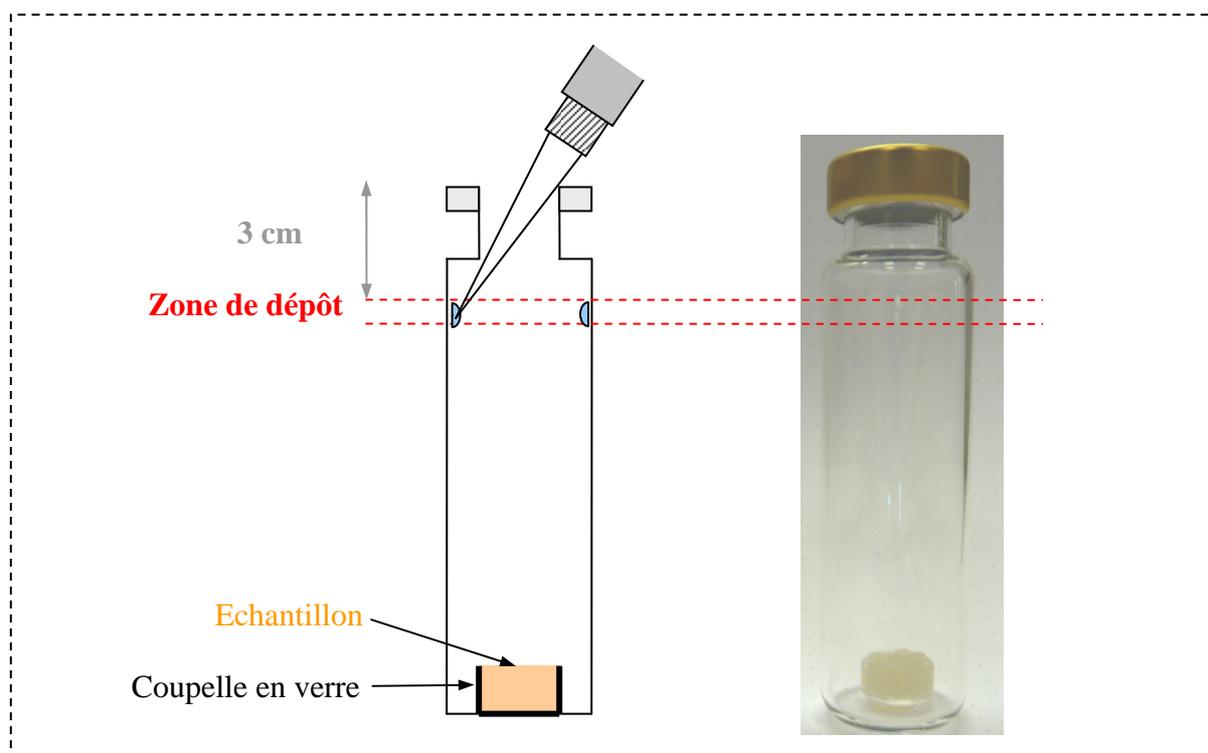


Figure 51 : Dépôt de la solution d'enrichissement dans le vial expérimental

L'échantillon est laissé en contact avec l'espace de tête pendant 60 minutes avant l'analyse de l'espace de tête par HS-SPME.

VII.2.3.4. Extraction SPME

Après optimisation des différents paramètres, les extractions réalisées dans les espaces de tête de ces échantillons ont été conduites dans les conditions suivantes :

- ♦ fibre polyacrylate (85 μm , 1 cm, Supelco, Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) ;
- ♦ 0 minutes d'incubation (remplacée par les 60 minutes d'exposition de l'échantillon) ;
- ♦ 15 min d'extraction à 35 °C.

VII.2.4. Mode opératoire seconde phase : relargage

Pour les essais réalisés sur les matrices solides, dès la fin des 15 minutes de HS-SPME, les vials sont ouverts. La matrice est entièrement retirée de sa coupelle en verre pour être placée au fond d'un nouveau vial de 20 mL dans le même sens (la face supérieure, exposée à l'espace de tête est la même que lors de l'étape précédente).

Une fois le vial-ci scellé hermétiquement, il est congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ et conservé au maximum deux semaines à cette température pour une analyse ultérieure par HS-SPME.

VII.2.4.1. Extraction SPME

Après décongélation de l'échantillon à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, l'extraction est réalisée sur l'espace de tête dans les conditions suivantes :

- ♦ fibre polyacrylate ($85\text{ }\mu\text{m}$, 1 cm, Supelco, Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) ;
- ♦ 60 min d'incubation à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- ♦ 15 min d'extraction à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

VII.2.5. Différents échantillons analysés

VII.2.5.1. Matrices modèles à base de pulpe de poisson

Les matrices modèles décrites en VI.5.2.1.2 (page 118) ont été étudiées par cette méthode. Chaque matrice a été décongelée $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant d'être placée dans le vial expérimental.

Chaque point expérimental a été réalisé en triplicat, les résultats sont exprimés comme la moyenne des trois analyses.

VII.2.5.2. Huiles et eau pures

Les échantillons liquides ont été testés à l'état pur en déposant à l'aide d'une pipette automatique les volumes désirés dans les coupelles expérimentales. Des volumes croissants d'huile et d'eau ont été testés, de 20 à $180\text{ }\mu\text{L}$ (Tableau 18).

Tableau 18 : Nombre de mesures expérimentales réalisées pour les volumes testés

Volume (μL)	20	30	40	50	60	70	80	90	100	120	140	160	180
Huile de Saumon	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
Huile de Chimère	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
Huile d'Arachide	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
Eau	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3

Il est important de noter qu'en dessous de $60\text{ }\mu\text{L}$ la surface de liquide en contact avec l'espace de tête n'est pas toujours la même. En effet, pour de trop faibles volumes, le liquide forme des gouttelettes au fond de la coupelle. A partir de $60\text{ }\mu\text{L}$, le volume est suffisant pour que le liquide forme un ménisque sur toute la surface de la coupelle. Pour les quantités supérieures

on obtient donc un accroissement des volumes sans grande modification de la surface exposée (Figure 52).

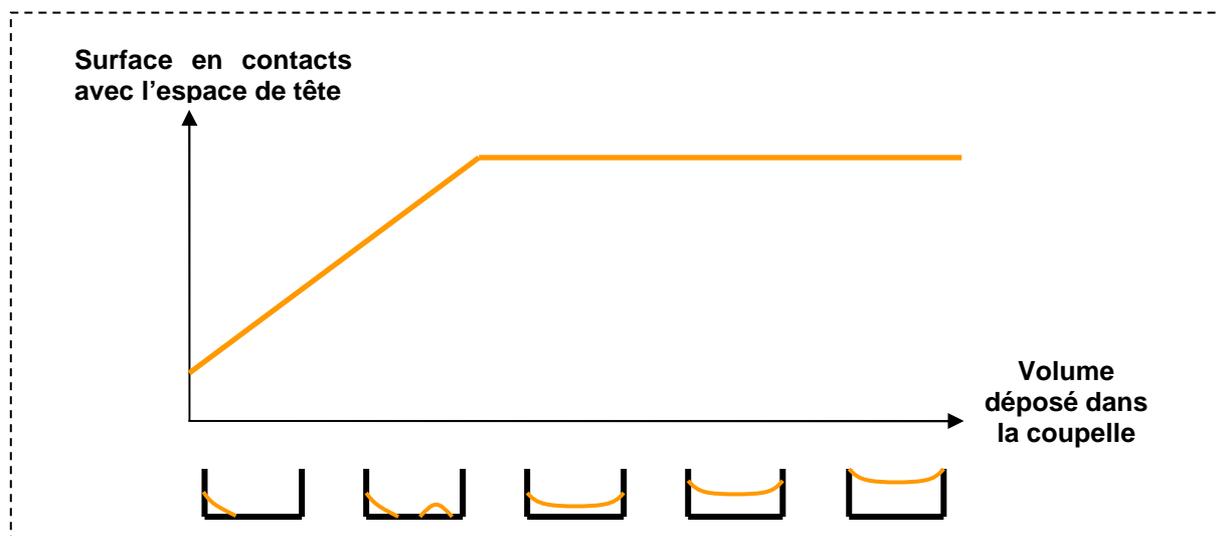


Figure 52 : Etablissement d'un ménisque lors de augmentation du volume de liquide

VII.2.5.3. Huiles en mélange dans l'hexadécane

Les trois huiles ont aussi été testées en mélange dans de l'hexadécane, afin de permettre la mise en œuvre de quantités croissantes d'acides gras sans faire varier ni le volume ni la surface d'exposition.

Pour cela, un volume d'huile a été déposé directement dans les coupelles, puis le complément d'hexadécane a été ajouté pour obtenir des volumes de 100 μ L. Les échantillons sont mélangés manuellement pour les homogénéiser avant de le déposer au fond des vials.

Tableau 19 : Nombre de mesures expérimentales réalisées pour les ratios Huile/C16 testés

% d'huile	0	1	2	3	4	5	10	20	30	40	50	100
Huile de Saumon	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3
Huile de Chimère	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3
Huile d'Arachide	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3

VII.2.5.4. Protéines sarcoplasmiques

La capacité des protéines déshydratées à adsorber les composés phénoliques à l'état gazeux sans être remises en solution a d'abord été vérifiée par dépôt de quantités croissantes de poudre de protéines dans les coupelles expérimentales (de 10 à 50 mg).

Ensuite, une série d'expérience a été réalisée pour mettre en évidence l'importance de l'état d'hydratation des protéines dans leur capacité à piéger les composés phénoliques gazeux. Pour cela, le piégeage des composés phénoliques gazeux par des mélanges protéines-eau a été étudié selon un plan d'expérience à deux facteurs (2^2 + point central + points en étoile ; réalisé en double). Celui-ci (Tableau 20) permet l'analyse des résultats sous forme de surfaces de réponse en fonction de la quantité de protéines et d'eau utilisées.

Tableau 20 : Plan d'expériences utilisé pour les mélanges eau-protéines sarcoplasmiques

Point exp.	Block	Protéines lyophilisées (mg)	Eau (μ L)
P01	1	7,1	14,6
P02	1	7,1	14,6
P03	1	42,9	14,6
P04	1	42,9	14,6
P05	1	7,1	85,4
P06	1	7,1	85,4
P07	1	42,9	85,4
P08	1	42,9	85,4
P09	1	25	50
P10	1	25	50
P11	2	0	50
P12	2	0	50
P13	2	50	50
P14	2	50	50
P15	2	25	0
P16	2	25	0
P17	2	25	100
P18	2	25	100
P19	2	25	50
P20	2	25	50

Les pesées de protéines ont été réalisées à la balance analytique directement dans les coupelles puis laissées 48 h dans un dessiccateur, pour palier d'éventuelles réhydratations. L'eau prélevée à la pipette automatique est ajoutée directement dans les coupelles puis mélangée manuellement aux protéines pour obtenir un échantillon plat et visuellement homogène.

VII.2.6. Analyse chromatographique

Après HS-SPME, l'analyse chromatographique est réalisée selon une méthode présentée ultérieurement (voir VII.3.3, p.133).

Des gammes de calibration linéaires ont été mises en place pour chaque composé phénolique étudié, en utilisant des solutions de composés phénoliques de concentration (Tableau 1). Elles permettent de réaliser une semi-quantification des composés présents dans l'espace de tête après intégration du signal FID.

Les résultats sont exprimés en μg équivalent introduit dans le vial. C'est-à-dire : la quantité de composé phénolique introduite dans le vial qui aurait donné la même réponse chromatographique en l'absence d'échantillon.

Tableau 21 : Gamme de calibration utilisées en espace de tête

Point de calibration	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
Concentration de la solution (g/L)	0,0004	0,002	0,004	0,02	0,04	0,1	0,2	0,25	0,5
Analytes introduits dans le vial (μg)	0,002	0,01	0,05	0,1	0,2	0,5	1	1,25	2,5

VII.3. Dosage des composés phénoliques

VII.3.1. Extraction-distillation simultanée

VII.3.1.1. Préparation des échantillons

L'échantillon à analyser (Tableau 22) est pesé avec précision avant d'être introduit dans un ballon à fond rond de 500 mL avec :

- ♦ 150 mL d'eau ultrapure ;
- ♦ 500 μL de solution d'étalon interne (thymol) dans le dichlorométhane (dont la concentration dépend de la concentration finale de l'extrait réalisée, voir Tableau 22) ;
- ♦ 20 mL d'acide chlorhydrique fumant (pour atteindre un pH inférieur à 2, afin que les composés phénoliques ne se trouvent pas en solution sous leur forme phénolate) ;
- ♦ quelques gouttes d'antimousse (silicone inerte, ATL® 54180, Laboratoires Humeau, La Chapelle sur Erdre, France).

Une série d'extractions réalisées en remplaçant l'échantillon par 20 mL d'eau ultrapure a permis de montrer que les différents adjuvants utilisés n'introduisaient pas de contamination dans les extraits.

De même, une série d'essais réalisée sur des matrices non-fumées et sur les constituants des matrices individuels (pulpe de poisson, huiles et gélatine) a permis de vérifier que les matrices n'avaient pas subi de contamination aux composés phénoliques indépendante du fumage.

Tableau 22 : Paramètres de l'extraction-distillation simultanée des échantillons

Echantillons analysé	Condensats de fumées liquides	Matrices modèles fumées
Quantité analysée	20 mL	½ matrice expérimentale 29 cm ² de surface coupée en cubes de 1 cm de côté
Concentration de l'étalon interne	1 g/L	0,25 g/L
Concentration finale de l'extrait	3 mL	0,2 mL

Les extractions réalisées sur chaque échantillon ont été réalisées en double. Les résultats obtenus sont la moyenne des deux quantifications.

VII.3.1.2. Extraction et concentration de l'échantillon

Les extractions sont réalisées avec un volume total de dichlorométhane de 35 mL. 25 mL sont placés dans le ballon d'extraction, les 10 mL restant sont introduits directement dans le siphon de l'appareil de Likens-Nickerson (Figure 53) pour éviter un passage de vapeur d'eau vers le ballon de solvant.

Dans un premier temps, le dichlorométhane est porté à ébullition. Lorsque son cycle de vaporisation-condensation-recyclage est amorcé, l'échantillon est à son tour porté à ébullition. L'extraction-distillation est maintenue pendant 3 h à partir du moment où les vapeurs de solvant et d'échantillon entrent en contact dans la chambre de mélange.

Une fois l'extraction terminée et après refroidissement complet du système, l'extrait est transféré quantitativement dans un flacon. Un excès de Na₂SO₄ est ajouté pour sécher les traces d'eau présentes dans le solvant puis celui-ci est transféré dans l'appareil de Kuderna-Danish (Figure 54), placé dans un bain-marie à 45 °C. L'extrait est ainsi concentré jusqu'à un volume de 4 mL environ.

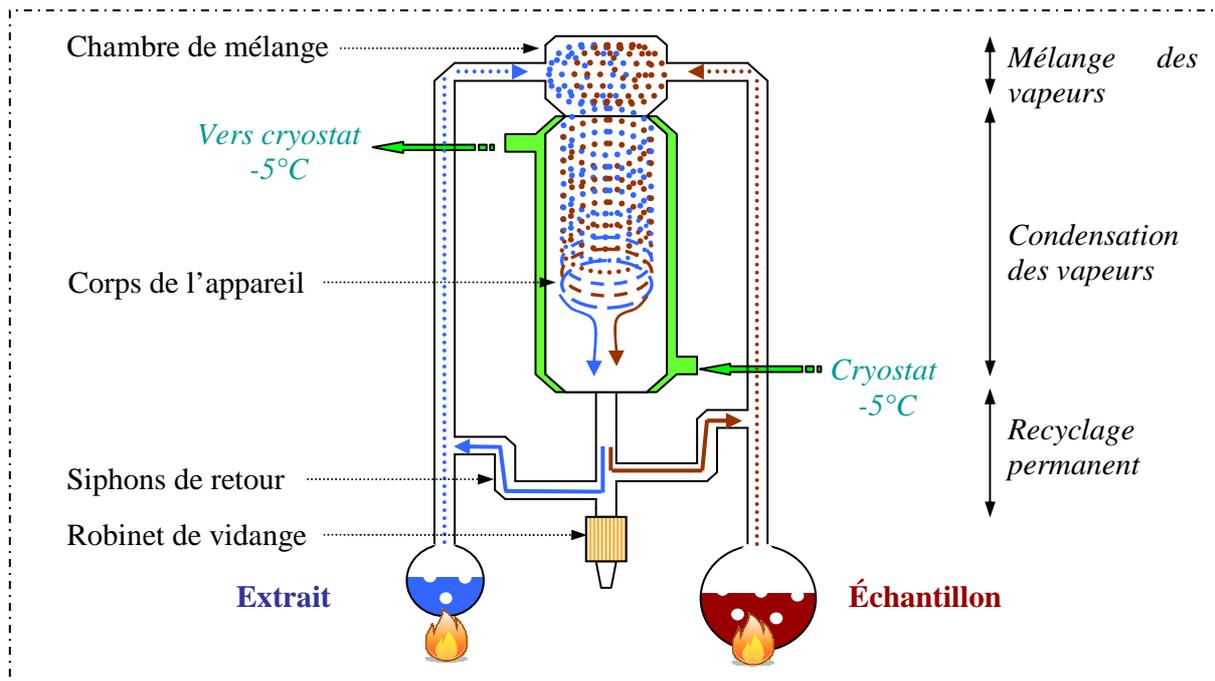


Figure 53 : Schéma de principe de l'appareil de Likens-Nickerson utilisé

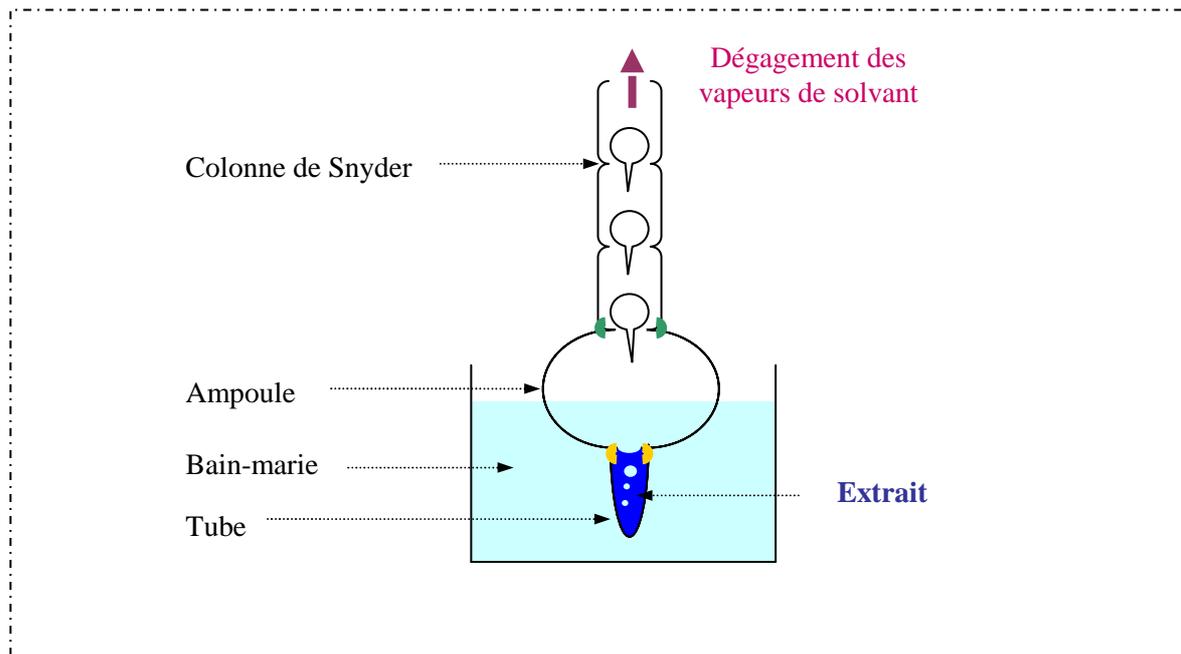


Figure 54 : Schéma de principe de l'appareil de Kuderna-Danish utilisé

La fin de la concentration est réalisée sous un faible courant d'azote pour permettre d'ajuster précisément le volume final en fonction de l'échantillon étudié :

- ◆ fumée liquide : 3 mL ;
- ◆ matrice fumée : 200 μ L.

VII.3.1.3. Dérivatisation

Pour améliorer la qualité de l'analyse chromatographique des composés phénoliques, un agent de dérivation a été employé : le BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide). Celui-ci permet de greffer un groupement triméthylsilyl sur la fonction hydroxyle des composés phénoliques (Figure 55).

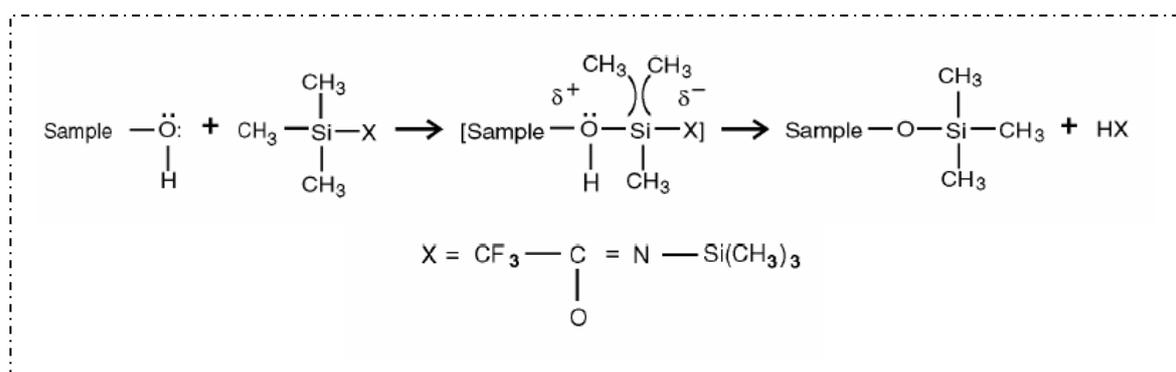


Figure 55 : Réaction de dérivation du BSTFA

La dérivation est réalisée directement dans des vials en verre de 2 mL. A 500 µL d'extrait dans le dichlorométhane sont ajoutés 50 µL de BSTFA et 5 µL de pyridine pour catalyser la réaction de silylation des phénols. Une fois serti hermétiquement, le vial est agité puis laissé 30 minutes dans une étuve à 70 °C.

VII.3.1.4. Conservation des extraits

L'ensemble des extraits a été conservé à -18 °C dans des flacons en verre étanches fermés par des bouchons recouverts de téflon jusqu'à leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (voir VII.3.3, p.133).

VII.3.2. Extraction des composés phénoliques par HS-SPME (matrices fumées)

VII.3.2.1. Préparation des échantillons

A l'aide d'un emporte-pièce calibré, une portion de matrice d'une surface de 17 cm² est prélevée sur une matrice fumée encore congelée. Cet échantillon est découpé en cubes de 1 cm de côté et introduit dans un vial de SPME de 20 mL. Le vial est ensuite scellé et placé à 4 °C jusqu'à analyse.

VII.3.2.2. Mise au point de l'extraction

La mise au point de la HS-SPME des matrices fumées a comporté trois étapes :

- ♦ choix de la phase d'extraction (phases testées : PDMS, CAR-PDMS, PDMS-DVB, PA et DVB-CAR-PDMS) ;
- ♦ optimisation de la température et du temps d'incubation à l'aide d'un plan d'expérience à 11 points (plan 2² avec points en étoile et triplicat central ; gammes testées : 30 à 60 °C et 30 à 60 min) ;
- ♦ étude de la cinétique d'extraction.

VII.3.2.3. Conditions d'extraction

Après optimisation, l'extraction a été réalisée dans les conditions suivantes pour l'ensemble des matrices fumées :

- ♦ nature de la fibre : DVB-CAR-PDMS (50/30 µm stableflex 1 cm, Supelco, Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) ;
- ♦ température d'incubation et d'extraction de l'échantillon : 50 °C ;
- ♦ temps d'incubation : 15 min ;
- ♦ temps d'extraction : 45 min.

VII.3.3. Analyse Chromatographique des extraits

VII.3.3.1. Analyse des phénols par GC-quadMS-FID

VII.3.3.1.1. Appareillage

Les analyses monodimensionnelles des extraits ont été réalisées avec un chromatographe en phase gazeuse (Agilent 7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, États-unis) équipé d'un injecteur split/splitless (muni d'un insert en verre désactivé), d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un spectromètre de masse simple quadripôle (Agilent 5975C, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, États-unis).

Toutes les injections ont été réalisées à l'aide d'un injecteur automatique (MPS2, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Allemagne) muni d'une seringue de 10 µL ou d'un support de fibre de SPME et équipé d'un portoir à échantillons réfrigéré à +4 °C.

VII.3.3.1.2. Conditions opératoires

◆ Injection liquide :

1 μ L d'extrait est injecté sans fuite (2 min, puis purge à 20 mL/min) à 280 °C avec l'hélium comme gaz vecteur (contrôle de pression : 150 kPa pendant toute la durée d'analyse).

◆ Injection SPME :

La fibre est maintenue dans l'injecteur à 280 °C pendant 15 minutes (sans fuite pendant 5,5 minutes, puis purge à 20 mL/min), avec l'hélium comme gaz vecteur (150 kPa pendant toute la durée d'analyse).

◆ Séparation :

Les extraits sont séparés sur une colonne capillaire apolaire (DB-5MS, 30 m x 250 μ m x 0,5 μ m, J&W Scientific, Folsom, CA, États-unis) avec une programmation de température dépendant du type d'extrait analysé (Tableau 23). Cette différence s'explique par la différence de richesse des échantillons à analyser : les espaces de tête modèles ne contiennent que les composés phénoliques cibles. Il est donc possible de réduire le temps d'analyse en conservant une bonne résolution des analytes.

Tableau 23 : Paramètres de séparation chromatographique des extraits aromatiques

	Méthode (A)	Méthode (B)
Echantillons concernés	Condensats de fumées Matrices modèles fumées	Espaces de tête modèles statiques
Programmation de température	Pallier initial à 50 °C (1 min) 2 °C/min jusqu'à 150 °C (0 min) 10 °C/min jusqu'à 280 °C (0 min) Pallier final à 280 °C (10 min)	Pallier initial à 50 °C (1 min) 10 °C/min jusqu'à 80 °C (0 min) 5 °C/min jusqu'à 100 °C (0 min) 10 °C/min jusqu'à 120 °C (0 min) 5 °C/min jusqu'à 150 °C (0 min) 20 °C/min jusqu'à 280 °C (0 min) Pallier final à 280 °C (10 min)

En sortie de colonne, un diviseur d'efflux en T permet, via des capillaires inertes, de répartir le flux entre le spectromètre de masse et le détecteur à ionisation de flamme (ratio 1:1).

◆ Détection :

Les paramètres de fonctionnement du détecteur à ionisation de flamme pendant l'analyse chromatographique sont les suivants :

- ◆ température du détecteur : 300 °C ;
- ◆ débit d'hydrogène : 40 mL/min ;
- ◆ débit d'air : 450 mL/min.

L'acquisition des spectres de masse a été réalisée par le quadripôle en « full scan » dans les conditions suivantes :

- ◆ délai de solvant : 4 min ;
- ◆ gamme d'acquisition des ions : 33 à 300 amu ;
- ◆ nombre de mesures par ion : 2 ;
- ◆ fréquence d'acquisition : 5,15 spectres/s ;
- ◆ énergie d'ionisation : 70eV ;
- ◆ température de la source : 230 °C ;
- ◆ température du quadripôle : 150 °C.

◆ Traitement :

Les chromatogrammes obtenus ont été analysés avec le logiciel « Enhanced Chemstation » (MSD ChemStation E.02.00.493, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, États-unis).

Dix-sept composés phénoliques ont été ciblés dans l'analyse des chromatogrammes : phénol ; o-crésol ; p-crésol ; m-crésol ; guaiacol ; 2,6-diméthylphénol ; 2,4-diméthylphénol ; 3,5-diméthylphénol ; 3-éthylphénol ; 4-méthylguaiacol ; 4-éthylguaiacol ; 4-vinylguaiacol ; syringol ; eugénol ; 4-propylguaiacol ; (Z)isoeugénol et (E)isoeugénol. Ceux-ci ont été identifiés dans les extraits par :

- ◆ comparaison des spectres de masse expérimentaux avec la base de données Wiley 6 ;
- ◆ calcul des indices de rétention linéaires après injection d'une série d'alcane à chaîne droite (C5 à C32) ;
- ◆ injection de standards analytiques.

Les résultats de HS-SPME ont été traités de manière relative, en considérant uniquement les aires de pics du signal FID après avoir contrôlé que les aires considérées appartenaient bien à la zone de linéarité de réponse du détecteur et ce, pour chacun des composés.

Pour les extraits liquides dans le dichlorométhane, une quantification a été réalisée à partir de l'intégration des aires de pic du signal FID.

L'injection d'une gamme de calibration préparée dans le dichlorométhane (Tableau 24) a permis de calculer les facteurs de réponse de chacun des analytes vis à vis de l'étalon interne (thymol) dans les conditions de l'analyse.

Tableau 24 : Gamme de calibration utilisée pour la quantification des composés phénoliques dans les extraits liquides

Point de calibration	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Étalon interne (g/L)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Analytes (g/L)	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05

Les concentrations massiques dans les condensats de fumée ont été obtenues en rapportant les résultats de quantification aux masses d'échantillons utilisées pour les extractions. La valeur finale correspond à la moyenne obtenue pour les deux extractions réalisées pour un même échantillon.

Pour les extraits ayant subi la réaction de dérivation, la quantification a été réalisée à partir des solutions de calibration dérivatisées dans les mêmes conditions que les échantillons (voir VII.3.1.3, p.132).

VII.3.3.2. Analyse des phénols par GCxGC-TOFMS

VII.3.3.2.1. Appareillage

L'analyse des extraits de composés volatiles par chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle totale a été réalisée avec un Pegasus 4D (LECO Corporation, St. Joseph, MI, États-unis) équipé d'un injecteur split/splitless muni d'un insert en verre désactivé, d'un modulateur thermique à azote liquide, d'un four secondaire indépendant pour la seconde colonne et d'un spectromètre de masse à temps de vol .

Toutes les injections ont été réalisées par un injecteur automatique (MPS2, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Allemagne) muni d'une seringue de 10 μ L et d'un portoir à échantillons réfrigéré à +4 °C.

VII.3.3.2.2. Conditions opératoires

◆ Injection :

0,5 μ L d'extrait sont injectés à 280 °C sans fuite (2 minutes, puis purgé à 20 mL/min) avec l'hélium pour gaz vecteur (débit constant 1 mL/min).

◆ Séparation :

Les composés sont séparés dans la première dimension sur une colonne apolaire (DB-5MS, 30 m x 250 μ m x 0,5 μ m, J&W Scientific, Folsom, CA, États-unis). Ensuite, la séparation dans la seconde dimension est réalisée par une colonne polaire (Supelcowax, 1,8 m x 100 μ m x 0,1 μ m, Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France). La modulation entre les deux colonnes se fait par périodes de 5 secondes avec 0,6 s de chauffage suivies de 1,9 s de piégeage cryogénique.

Le four primaire a été programmé comme suit : un premier palier d'une minute à 50 °C suivi d'un gradient de 4 °C/min jusqu'à 265 °C. Le four secondaire démarre à 90 °C pendant une minute, puis augmente de 5 °C/min jusqu'à 265 °C, avec un pallier final de 18,75 minutes.

Le modulateur est maintenu à une température supérieure de 15 °C à celle du four secondaire pendant toute la durée de l'analyse.

◆ Détection :

Les spectres de masse sont acquis en mode « full scan » dans une gamme de 30 à 300 unités de masse atomique avec les paramètres suivants :

- ◆ température de la source : 200 °C ;
- ◆ énergie d'ionisation : 70 eV ;
- ◆ voltage du détecteur : 1500 V.

La fréquence d'acquisition nominale de l'appareil est de 5000 spectres par seconde. Les données brutes sont ensuite converties pour obtenir une fréquence apparente de 200 spectres par seconde.

◆ Traitement :

Les chromatogrammes ont été analysés à l'aide du logiciel ChromaTOF (« ChromaTOF optimized for Pegasus », Version 3.34, LECO Corporation, St. Joseph, MI, Etats-Unis).

Après déconvolution des signaux ioniques par l'algorithme du logiciel, l'intégration des pics est réalisée automatiquement pour les pics ayant un rapport signal sur bruit supérieur à 200. Le signal d'un seul ion est intégré : la « masse unique ». Celle-ci correspond à un ion déterminé par l'algorithme comme étant spécifique du pic considéré : un ion majoritaire de son spectre de masse qui n'est pas retrouvé dans les spectres des pics proches ou co-élus.

La même gamme de calibration que pour les analyses monodimensionnelle a été utilisée (Tableau 24) pour le calcul des facteurs de réponse et des concentrations dans les extraits.

VII.4. Dosage des HAP

VII.4.1. Extraction

VII.4.1.1. Echantillons liquides aqueux

Dans le cas des condensats liquides de fumée, les HAP ont été extraits par extraction liquide-liquide au cyclohexane.

Un échantillon de 10 mL de fumée liquide est pesé et 50 µL d'une solution à 0,01 ng/L d'étalons internes marqués au carbone 13 (Tableau 25) y sont ajoutés. L'extraction est réalisée deux fois avec 30 mL de cyclohexane pendant 10 minutes dans des tubes de 100 mL sous agitation mécanique. Après chaque extraction, le tube est centrifugé 5 minutes à 2500 g et le solvant d'extraction est transféré dans un ballon de 250 mL.

Tableau 25 : Liste des étalons internes marqués et des analytes associés

Étalons internes marqués ajoutés avant extraction	Analytes dont la quantification est réalisée avec cet étalon interne
Fluorène 13C6	Fluorène
Phénanthrène 13C6	Phénanthrène
Anthracène 13C6	Anthracène
Fluoranthène 13C6	Fluoranthène
Pyrène 13C3	Pyrène
Benz[a]anthracène 13C6	Cyclopenta[c;d]pyrène / Benz[a]anthracène
Chrysène 13C6	Chrysène / 5-Méthylchrysène
Benzo[b]fluoranthène 13C6	Benzo[b]fluoranthène / Benzo[j]fluoranthène
Benzo[k]fluoranthène 13C6	Benzo[k]fluoranthène
Benzo[a]pyrène 13C4	Benzo[a]pyrène
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène 13C6	Indéno[1,2,3-c,d]pyrène
Dibenz[a,h]anthracène 13C6	Dibenz[a,h]anthracène
Benzo[g,h,i]perylène 13C12	Benzo[g,h,i]perylène
Dibenzo[a,e]pyrène 13C6	Dibenzo[a,e]pyrène / Dibenzo[a,l]pyrène
Dibenzo[a,i]pyrène 13C12	Dibenzo[a,i]pyrène / Dibenzo[a,h]pyrène

Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif jusqu'à un volume d'environ 1 mL. Le volume restant est transféré dans un tube en verre et le ballon rincé deux fois avec 2,5 mL de cyclohexane pour obtenir un volume final d'environ 6 mL dans le tube de récupération.

Le blanc d'analyse est réalisé en remplaçant l'échantillon par 10 mL d'eau ultrapure.

VII.4.1.2. Echantillons d'huiles

Pour l'extraction des HAP dans les huiles utilisées pour la fabrication des matrices (arachide, chimère et saumon), l'extraction liquide-liquide au cyclohexane est réalisée selon le protocole suivant :

1 g d'huile est pesé avec précision dans un tube en verre et 50 μ L de solution à 0,01 ng/L d'étalons internes marqués (Tableau 25) sont ajoutés. L'extraction est réalisée par agitation au vortex avec un volume de cyclohexane permettant d'obtenir un volume total d'environ 3 mL.

Le blanc d'analyse est réalisé en ajoutant directement 50 μ L de la solution d'étalons internes marqués à 3 mL de cyclohexane dans un tube en verre.

VII.4.1.3. Echantillons solides

Pour les échantillons solides (matrices et pulpe de poisson), des extractions par solvant accélérée (« accelerated solvent extraction », ASE 300, Dionex, Sunnyvale, CA, États-Unis) ont été réalisées.

Préalablement à l'analyse, les échantillons doivent être lyophilisés. Quelques grammes d'échantillon sont prélevés, pesés et congelés à -16 °C avant d'être placés dans le lyophilisateur. Après lyophilisation complète, l'échantillon est pesé puis broyé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Une prise d'essai d'environ 1 g est pesée avec précision avant d'être transférée dans une cellule d'extraction rincée (cf. ci-après). 50 μ L d'une solution à 0,01 ng/L d'étalons internes marqués au carbone 13 (Tableau 25) sont ajoutés.

Le blanc d'analyse est réalisé en ajoutant uniquement la solution d'étalons internes dans une cellule rincée.

Avant d'être rincée, la cellule d'extraction de 66 mL est remplie avec : deux filtres, l'équivalent d'une spatule de célite (cérite 545, Cogter, Paris, France) et 15 g de florisil (100-200 mesh, LGC Promochem, Molsheim, France). Elle est ensuite rincée dans les conditions suivantes :

- ♦ static : 5 min ;
- ♦ flush : 75% ;
- ♦ purge : 200 s ;
- ♦ cycles : 2 ;
- ♦ température de four : 100 °C ;
- ♦ pression : 100 bar ;
- ♦ solvant : dichlorométhane.

Après ajout de l'échantillon et des étalons internes, l'extraction est réalisée dans les conditions suivantes :

- ♦ static : 5 min ;
- ♦ flush : 100% ;
- ♦ purge : 200 s ;
- ♦ cycles : 2 ;
- ♦ température de four : 100 °C ;
- ♦ pression : 100 bar ;
- ♦ solvant : hexane/acétone (50/50 ; v/v).

Le solvant d'extraction est récupéré dans un ballon de 250 mL et évaporés à l'évaporateur rotatif jusqu'à un volume d'environ 1 mL. Le volume restant est transféré dans un tube en verre et le ballon rincé deux fois avec 2,5 mL de cyclohexane pour obtenir un volume final d'environ 6 mL dans le tube de récupération.

VII.4.1.4. Purification de l'extrait

Il s'agit de faire passer l'échantillon à travers une phase stationnaire ayant une affinité pour les HAP qui va spécifiquement les retenir. Un rinçage de la colonne permet d'éliminer les éventuelles impuretés restées à l'intérieur de la colonne. Enfin, les HAP retenus par la colonne sont récupérés en faisant circuler à travers un mélange de solvant qui va permettre des les éluer.

Les extraits obtenus précédemment sont purifiés sur colonne Envi Chrom-P (Supelco, Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) montées sur un système de tirage à vide Vac Elut (Probalo, Paris).

La colonne est conditionnée préalablement par passage de 15 mL d'acétate d'éthyle, puis 10 mL de cyclohexane. L'échantillon est déposé sur la colonne, et effectuée un passage lent, sous un vide faible. Le tube est rincé deux fois par 3 mL d'un mélange cyclohexane/éthanol (70:30, v/v), également déposés sur la colonne. Enfin, le rinçage de la colonne est complété par le passage direct de 3 mL du mélange cyclohexane/éthanol (70:30, v/v) (remplacé par 3 mL de cyclohexane dans le cas d'extraits d'huiles).

Les analytes retenus par la colonne sont enfin élués par passage de 12 mL d'un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (40:60, v/v) à travers la colonne.

VII.4.1.5. Concentration de l'extrait

Les éluats récupérés dans des tubes en verre sont placés dans un bloc chauffant à 40 °C et évaporés sous un courant d'azote jusqu'à un volume d'environ 200 µL.

50 µL de la solution d'étalons externes (3-Fluoro fluoranthène, 3-fluoro chrysène et 9-Fluoro benzo[k]fluoranthène) à 0,01 ng/µL sont ajoutés avant de transférer la solution dans un vial en verre.

La solution est évaporée à sec sous courant d'azote puis le résidu est repris avec 20 µL de toluène et agité au vortex.

VII.4.2. Analyse chromatographique

VII.4.2.1. Analyse des HAP par GC-MS/MS

VII.4.2.1.1. Appareillage

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (HP-6890, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Etats-Unis) équipé d'un injecteur split-splitless (muni d'un insert en verre désactivé) et couplé à un spectromètre de masse triple quadripolaire (Micromass Quattro-Micro, Waters Corporation, Milford, MA, Etats-Unis).

L'ensemble des injections est réalisé par un injecteur automatique (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Etats-Unis).

VII.4.2.1.2. Conditions opératoires

◆ Injection :

2 µL d'extrait sont injectés à 280 °C, à une pression de 89,6 kPa (sans fuite 1 minute, puis purge à 30 mL/min) avec l'hélium pour gaz vecteur (débit constant à 1 mL/min).

◆ Séparation :

Deux méthodes de séparation ont été utilisées pour les deux types d'échantillons analysés (Tableau 26). Cette différence correspond à une mise à jour réalisée entre les deux campagnes d'analyse par le LABERCA pour améliorer la séparation et le dosage des HAP cibles dans les matrices alimentaires.

Tableau 26 : Paramètres de séparation chromatographique des extraits de HAP

	Méthode (A)	Méthode (B)
Echantillons concernés	Condensats de fumée	Matrices fumées
Colonne utilisée	ZB-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Phenomenex, Torrance, Etats-Unis	ZB-50 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Phenomenex, Torrance, Etats-Unis
Programmation de température	palier initial à 110 °C (1 min) 20 °C/min jusqu'à 240 °C (0 min) 5 °C/min jusqu'à 340 °C (0 min) 20 °C/min jusqu'à 320 °C (5 min)	palier initial à 110 °C (1 min) 60 °C/min jusqu'à 220 °C (0 min) 5 °C/min jusqu'à 270 °C (0 min) 3 °C/min jusqu'à 295 °C (0 min) 20°C/min jusqu'à 330 °C (18 min)

◆ Détection :

L'acquisition du signal est réalisée en mode « multiple réaction monitoring » pour suivre deux transitions ioniques diagnostiques de chaque HAP. Les énergies de collision utilisées dépendent de l'analyte et de la transition considérées (Tableau 27).

◆ Traitement :

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Masslynx (Water Corporation, Milford, MA, États-Unis).

Afin d'assurer une bonne fiabilité des analyses, certains paramètres de contrôle permettent valider l'analyse de l'ensemble des composés cibles. Sont pris en considération :

- ◆ la présence des pics associés aux étalons internes et externes ;
- ◆ l'écart entre le temps de rétention d'un analyte et de son étalon interne (< 0,5%) ;

- ♦ le rapport signal sur bruit des signaux ioniques considérés (> 3) ;
- ♦ la détection d'au moins deux transitions diagnostiques ;
- ♦ le ratio d'intensité entre les transitions de l'analyte et son standard (Tableau 28).

Tableau 27: Transitions diagnostique et énergies de collision associées aux différents analytes HAP

Analyte	Transition 1	Energie de collision T1 (eV)	Transition 2	Energie de collision T2 (eV)
Fluorène	166>164	25	166>140	30
Phénanthrène	178>176	25	178>152	15
Anthracène	178>176	25	178>152	15
Fluoranthène	202>200	30	202>152	30
Pyrène	202>200	20	202>152	30
Cyclopenta[c;d]pyrène	226>224	30	226>200	35
Benz[a]anthracène	228>226	30	228>202	20
Chrysène	228>226	30	228>202	20
5-Méthylchrysène	242>240	30	242>226	25
Benzo[b]fluoranthène	252>250	30	252>226	20
Benzo[j]fluoranthène	252>250	30	252>226	20
Benzo[k]fluoranthène	252>250	30	252>226	20
Benzo[a]pyrène	252>250	30	252>226	20
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	276>274	45	276>272	50
Dibenz[a,h]anthracène	278>276	30	278>252	20
Benzo[g,h,i]pérylène	276>274	45	276>272	50
Dibenzo[a,l]pyrène	302>300	40	302>298	50
Dibenzo[a,e]pyrène	302>300	40	302>298	50
Dibenzo[a,i]pyrène	302>300	40	302>298	50
Dibenzo[a,h]pyrène	302>300	40	302>298	50

Tableau 28 : Critère de tolérance pour le contrôle des ratios d'ions

Rapport d'intensité entre les transitions T1 et T2 de l'analyte considéré	Variabilité tolérée
> 50%	20%
20 - 50%	25%
10 - 20%	30%
< 10%	50%

Une fois ces critères validés, la quantification est réalisée par dilution isotopique à l'aide d'une gamme de calibration à 8 points (Tableau 29) préparée dans le toluène est injectée dans les mêmes conditions que les échantillons (les correspondances analyte - étalon internes utilisées pour les quantifications ont déjà été présentées dans le Tableau 25).

Tableau 29 : Gamme de calibration utilisée pour la quantification des HAP

Point de calibration	Cal0	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7
Étalons internes marqués (pg/μL)	25	25	25	25	25	25	25	25
Standards analytiques natif (pg/μL)	0	5	10	25	50	250	500	2000
Étalons externes fluorés (pg/μL)	25	25	25	25	25	25	25	25

Selon la méthode de séparation utilisée, des co-élutions peuvent être constatées sur certains analytes. Celles-ci sont prises en compte de différentes façons lors du traitement des chromatogrammes :

- ♦ Avec la méthode (A), la co-élution entre les benzofluoranthènes (b, j et k) n'est pas parfaitement résolue. Dans ce cas là, une correction du signal n'est pas possible puisque les transitions diagnostiques des trois HAP impliqués sont les mêmes. Ils ne peuvent donc pas être quantifiés séparément. Cependant, comme ils possèdent le même facteur d'équivalent toxique (« Toxic Equivalent Factor », TEF) (Tableau 30), il est possible de les quantifier comme un seul analyte sans que cela ne modifie l'estimation de la toxicité globale relative de l'échantillon.

- ♦ Avec la méthode (A), le cyclopenta[c,d]pyrène est co-élué avec le benz[a]anthracène. Or, l'ionisation du benz[a]anthracène donne de manière importante naissance à un ion de masse 226, qui correspond à la masse du cyclopenta[c,d]pyrène ionisé. Il est donc nécessaire de corriger les aires observées pour le cyclopenta[c,d]pyrène en tenant compte de la contribution apportée par les ions issus du benz[a]anthracène. Pour les transitions de quantification, cette contribution peut être estimée par l'injection de solutions de standards purs, la correction est réalisée par calcul :

$$[\text{Aire Corrigée CPP}] = [\text{Aire CPP}_{226>200}] - \text{contribution} * [\text{Aire BaA}_{228>202}]$$

- ♦ Avec la méthode (B), le même type de co-élution est obtenu d'une part pour le cyclopenta[c,d]pyrène et le chrysène et d'autre part obtenu pour l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène et le dibenz[a,h]anthracène. La correction des aires est réalisée dans les deux cas par le même type de calcul que précédemment.

Le TEQ de chaque échantillon (fumée expérimentale ou matrice fumée) est calculé selon les recommandations de la saisine AFSSA n°2000-SA-0005 (Tableau 30) en additionnant les concentrations en HAP individuels multipliées par les TEF correspondants. Ceci permet de comparer l'aspect toxicologique des fumées induit par les HAP en prenant en compte les différences de toxicité individuelle de ceux-ci.

Tableau 30 : TEF utilisés pour le calcul des TEQ

Analyte	TEF	Analyte	TEF
Fluorène	0,001	Benzo[j]fluoranthène	0,1
Phenanthrène	0,001	Benzo[k]fluoranthène	0,1
Anthracène	0,01	Benzo[a]pyrène	1
Fluoranthène	0,01	Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	0,1
Pyrène	0,001	Dibenz[a,h]anthracène	1
Cyclopenta[c;d]pyrène	0,1	Benzo[g,h,i]pérylène	0,01
Benz[a]anthracène	0,1	Dibenzo[a,l]pyrène	-
Chrysène	0,01	Dibenzo[a,e]pyrène	-
5-Methylchrysène	-	Dibenzo[a,i]pyrène	-
Benzo[b]fluoranthène	0,1	Dibenzo[a,h]pyrène	-

VII.5. Analyses statistiques des résultats

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé à l'aide de deux logiciels :

- ♦ XLSTAT 2011 (Version 2011.2.08, Addinsoft SARL, Paris, France) ;
- ♦ Statgraphics Centurion XVI (version 16.1.02, Statpoint Technologies, Warrenton, VA, États-unis).

Les résultats ont été analysés dans un premier temps par analyse de la variance (ANOVA) à plusieurs facteurs en prenant en compte les interactions de degré 2 (interaction de deux facteurs). Les différences et effets sont considérés comme statistiquement significatifs pour des risques d'erreur inférieurs à 5% (niveau de significativité ou « p-value » < 0,05).

Les quantités de données n'étant pas suffisantes pour tester statistiquement la normalité des données expérimentales, celle-ci a surtout été contrôlée graphiquement à l'aide de la droite de Henry et par l'étude des résidus normalisés (pour repérer des valeurs expérimentales présentant un résidu inhabituel). La vérification de la normalité des données traitées permet d'assurer que les résultats obtenus par ANOVA sont valides puisque obtenus sous les hypothèses d'utilisation de la méthode d'analyse de la variance.

Pour les résultats présentant des différences significatives par ANOVA, un test de comparaison multiple est réalisé, par la méthode de la plus petite différence significative (Test LSD de Fisher : « Least Significant Difference »). Les différences sont alors aussi considérées comme significatives pour des risques d'erreur inférieurs à 5%.

Les Analyses en Composantes Principales réalisées sur des variables non-homogènes ont été systématiquement normalisées : toutes les variances sont ramenées à 1 en divisant l'ensemble des valeurs d'une variable par l'écart-type global de celle-ci. Pour les ACP réalisées sur des variables homogènes, la normalisation a été décidée au cas par cas, en prenant en compte le contexte et le but de chaque analyse.

En ramenant les variances de toutes les variables au même niveau, on diminue l'efficacité de la procédure, dans le sens où les inerties de chaque composante principale seront plus réduites. Concrètement, l'utilisation de l'ACP standardisée imposera l'utilisation d'un plus grand nombre de composantes principales pour restituer assez d'information pour que celle-ci soit pertinente et exploitable (par rapport à ce qui serait réalisable avec la même ACP réalisée sur les données non-normées).

Le nombre de composantes principales conservées à l'issue de chaque analyse a été décidé à chaque fois pour permettre de restituer à la fois un maximum d'inertie et d'information. En particulier, au delà des deux premières composantes, ne sont conservées que celles qui permettent un apport déterminant d'information dans les représentations graphiques.

Les classifications automatiques réalisées sont exécutées de manière ascendante. Les agrégations itératives sont réalisées selon le critère de Ward qui permet de minimiser l'inertie intra-classe et de maximiser l'inertie inter-classe. Ce critère permet d'aboutir à des groupes distants les uns des autres dont les individus sont proches entre eux.

A partir des dendrogrammes obtenus, la partition en classes est réalisée automatiquement sur le critère du saut d'inertie le plus important à une étape d'agrégation.

Les régressions de données expérimentales ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics. La validité des modèles mathématiques obtenus a été évaluée par le calcul des coefficients de corrélation ajustés et par des tests de manque d'ajustement (considéré significatif au risque de se tromper de 5%).

Résultats et Discussion

Première partie

Caractérisation d'un générateur de fumée à friction :
Influence des paramètres opérationnels sur
la composition de la fumée.

VIII. Mise au point et validation du pilote de production et de piégeage de fumées

Afin de pouvoir être utilisé pour les expérimentations envisagées, le pilote expérimental (décrit en VI.3, p105.) doit satisfaire à un ensemble d'exigences techniques. Celles-ci ont été contrôlées lors de sa mise en place, pendant la réalisation de chaque expériences ou *a posteriori* par analyse statistique de l'ensemble des données récoltées.

Les caractéristiques exigées pour un tel montage sont de plusieurs types. Afin de permettre l'unicité du débit dans toutes les conduites et d'éviter des éventuelles contaminations par des apports extérieurs, le pilote doit être totalement étanche entre les points d'entrée et de sortie. Il doit en outre être possible d'assurer un débit de tirage constant sur la durée complète d'une expérience et sur l'ensemble des expériences, afin de garantir que le piégeage de toutes les fumées se fait dans des conditions identiques.

Par ailleurs, la modification des réglages du pilote doit permettre de faire varier effectivement les conditions de l'expérience. L'augmentation du temps d'appui de la bûche doit mener à une augmentation de la température de pyrolyse du bois. L'allongement de la distance parcourue par la fumée entre le générateur et le piège doit permettre un refroidissement plus poussé de celle-ci.

Enfin, les variables expérimentales (températures, productions et consommation de matière) doivent pouvoir être contrôlées pour valider le bon fonctionnement de l'opération à chaque expérimentation. En particulier, vérifier l'efficacité du piégeage et de la récupération des fumées par rinçage est un point clef de cette expérience.

VIII.1. Mesure des débits de tirage

L'étanchéité des différentes connexions du pilote expérimental a été vérifiée facilement de manière visuelle. En faisant fonctionner le générateur sous un faible débit de tirage, il se produit une accumulation de fumée à l'intérieur de toutes les parties du pilote. Les brèches existantes sont signalées par des échappements de fumée qui sont pu être colmatées en n'utilisant que des matériaux inertes pour toutes les portions en contact avec la fumée avant son piégeage.

Une fois le pilote étanche entre le point d'entrée et de sortie, le débit volumique global peut être mesuré en un seul point du montage. Il est évalué dans la conduite de sortie horizontale car la géométrie de cette section est la plus propice à la mesure des vitesses d'air.

Le calcul du débit étant dépendant du régime d'écoulement à l'équilibre (laminaire ou turbulent ; uniforme ou inégal), il est nécessaire de l'estimer à partir du calcul du nombre de Reynolds (Figure 56).

$$Re = \frac{V \cdot D}{\nu}$$

Re – Nombre de Reynolds (adimensionnel)
 V – vitesse d'air au centre de la conduite (m.s⁻¹)
 D – diamètre de la conduite (0,15 m)
 ν – viscosité cinématique de l'air (15,6.10⁻⁶ m².s⁻¹ à 25°C)

Figure 56 : Calcul du nombre de Reynolds

Quelle que soit la vitesse de circulation de l'air dans la conduite, le nombre de Reynolds associé est supérieur à 3000, ce qui indique que dans toutes les conditions testées le flux d'air est turbulent. Par ailleurs, des mesures réalisées sur tout le diamètre de la conduite montrent que la vitesse d'air est macroscopiquement uniforme en tout point de la conduite. Le profil de vitesse dans la conduite est donc plat en régime turbulent, ce qui permet de calculer le débit d'air directement à partir de la vitesse d'air mesurée en un seul point de la conduite (Figure 57).

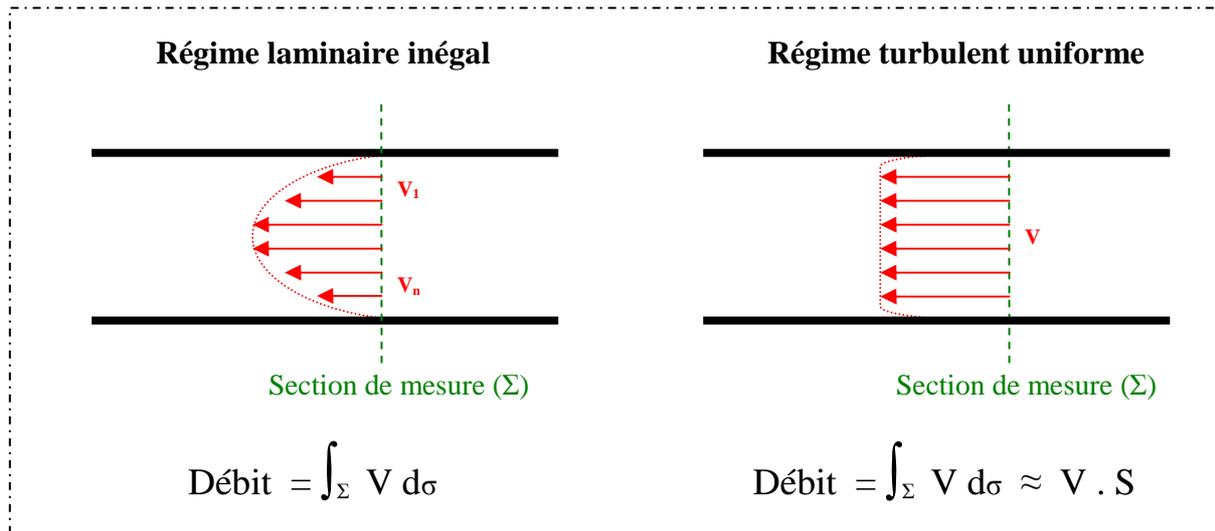


Figure 57 : Profil de vitesse et débit volumique d'air selon son régime d'écoulement

Parmi les paramètres pris en compte, seuls deux font significativement (au risque de 5%) varier le débit de tirage : la puissance de la turbine et la présence du piège frigorifique dans le

montage. Du fait de l'étroitesse de la double enveloppe, le piège frigorifique entraîne de grandes pertes de charges dans le montage et diminue considérablement le débit. Mais que ce soit avec ou sans piège frigorifique, le débit reste linéairement dépendant de la puissance de la turbine (Figure 58). Ceci permet d'ajuster le tirage à la valeur désirée, jusqu'à une valeur maximale de $36 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ qui correspond au débit maximal atteignable lorsque le piège frigorifique est installé.

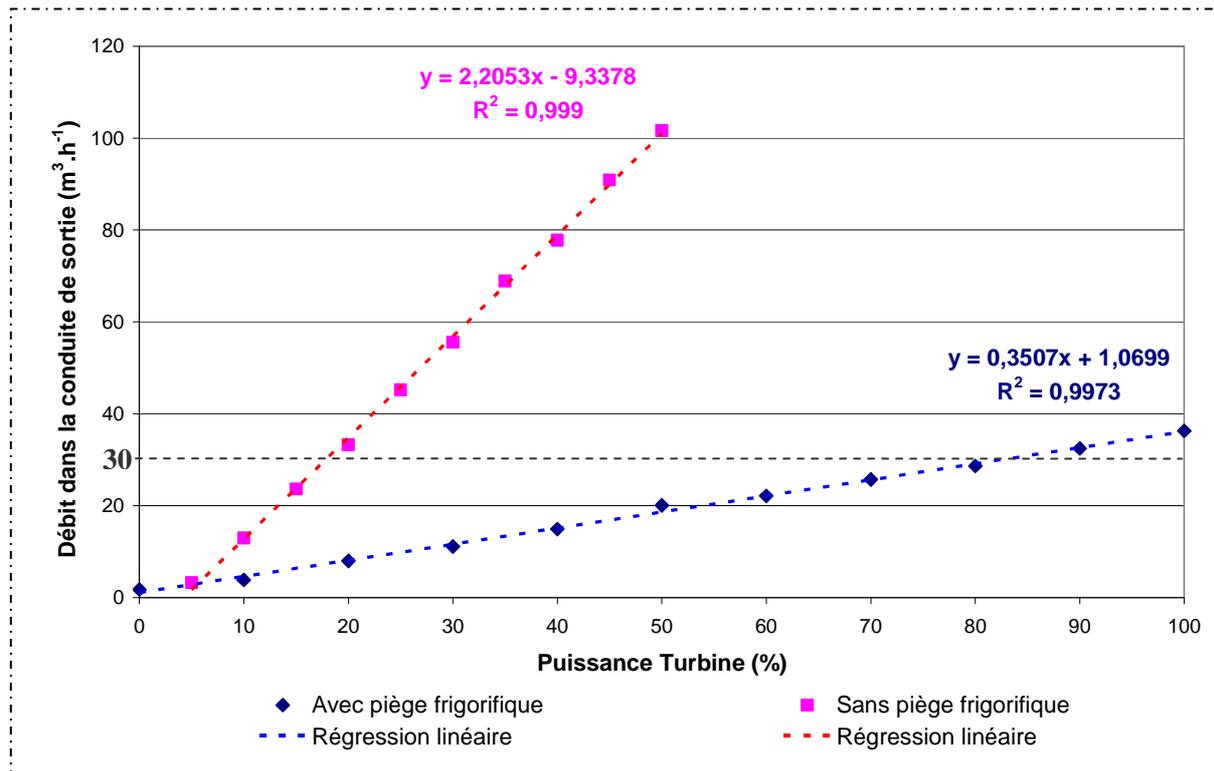


Figure 58 : Débit de tirage dans le pilote expérimental en fonction de la puissance de la turbine et la présence du piège frigorifique

Le débit choisi doit à la fois assurer qu'il n'y a pas de stagnation dans les différentes sections du pilote et être le plus réduit possible. Le fait de réduire le débit permet d'augmenter le temps de séjour de la fumée dans les pièges, ce qui augmente l'efficacité de rétention (avec plus d'ionisation dans le piège électrostatique et plus de refroidissement dans le piège frigorifique). Le débit satisfaisant à ces conditions est d'environ $30 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.

VIII.2. Mesure des températures de pyrolyse

Les mesures de température de pyrolyse n'ont pas été réalisées pendant chaque expérimentation et ont fait l'objet d'essais spécifiques selon les différentes conditions du plan d'expérience. En effet, la présence au cœur de la bûche du thermocouple risquait entre autres

d'induire des contaminations dans les fumées expérimentales (par exemple des produits de dégradation des gaines de plastique). Par ailleurs, la méthode de mesure employée ne permet pas pratiquement l'acquisition de la température au cours de la totalité d'une expérience, puisque le thermocouple utilisé est rapidement détruit une fois à l'interface entre la bûche et le rotor du générateur.

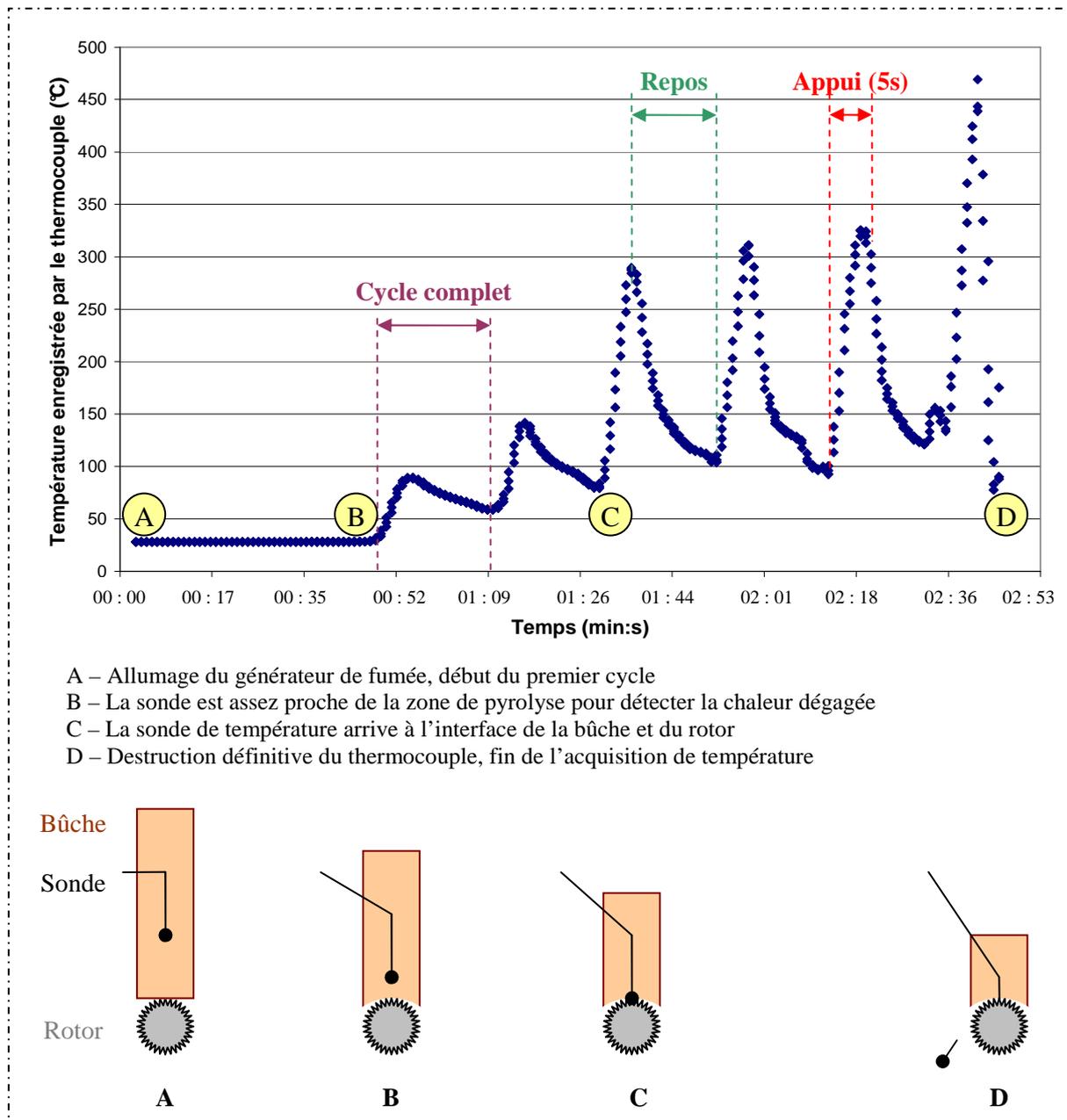


Figure 59 : Température mesurée au cœur de la bûche lors de la production de fumée à partir de bois de chêne, avec une durée d'appui de 5s

La Figure 59 présente un exemple de relevé de température obtenu, ainsi que l'interprétation des différentes portions d'enregistrement. Pendant la phase de latence (A→B),

la sonde est trop éloignée de la zone de pyrolyse et n'indique que la température de la bûche : il s'agit de la température ambiante. Au fur et à mesure que la bûche est consommée, la sonde de température se rapproche de la source de chaleur, jusqu'à ce qu'il soit possible d'observer des variations de températures cycliques (B). Ces cycles représentent les cycles de production de fumée : la température s'élève rapidement pendant le temps d'appui (friction bûche/rotor) et diminue pendant le temps de repos. Lors des deux premiers cycles (B→C) l'évolution de la température ne correspond encore qu'à la chaleur diffusée à travers la bûche jusqu'à la sonde.

Au point C, la brusque augmentation de température témoigne du fait que le thermocouple entre en contact avec la zone de pyrolyse, on considère que tant qu'il est parfaitement intact il enregistre la température réelle de pyrolyse.

Le dernier cycle semble présenter une augmentation de température significative, mais témoigne en fait de l'altération poussée du thermocouple qui sera finalement détruit (D), par arrachage complet ou par rupture de la soudure chaude. Au cours de ce cycle, les relevés de températures aberrants apparaissent (températures négatives, températures extrêmement élevées, ruptures de continuité, etc.). Si la courbe de température a pourtant l'air « normale », cela s'explique par la méthode de construction de celle-ci: les données brutes enregistrées par la centrale de mesure sont « lissées » à l'aide d'une moyenne mobile sur un grand nombre de valeurs. L'acquisition étant réalisée plusieurs fois par seconde, elle fluctue rapidement, donnant un signal avec beaucoup de bruit de fond.

Il est certain que le fait d'employer un thermocouple dans ces conditions induit nécessairement des imperfections de la mesure de température. En effet, dès que le thermocouple est placé dans cette zone de pression et de friction intense, sa soudure chaude commence à être détériorée. Ceci n'entraîne pas nécessairement l'arrêt des mesures, mais des imprécisions ou des mesures aberrantes, puisque la mesure de température à l'aide d'un thermocouple réside justement dans la qualité de cette « soudure » et des différences de potentiel qu'elle engendre. Par ailleurs, il n'est pas impossible que la friction du thermocouple lui-même sur le rotor n'entraîne un léger échauffement supplémentaire qui n'existe pas lorsque la bûche est pyrolysée seule.

La Figure 60 présente l'acquisition de la température de pyrolyse au cours d'un autre essai et illustre mieux les problèmes posés par la détermination des températures de pyrolyse réelles à partir des enregistrements réalisés. Il est important de noter que même si la température semble s'être stabilisée à au cours du cycle 2, l'amplitude de la variation du

signal (pourtant présenté après « lissage » des données) sur cette portion est d'environ 100 °C, sans prendre en considération les mesures aberrantes.

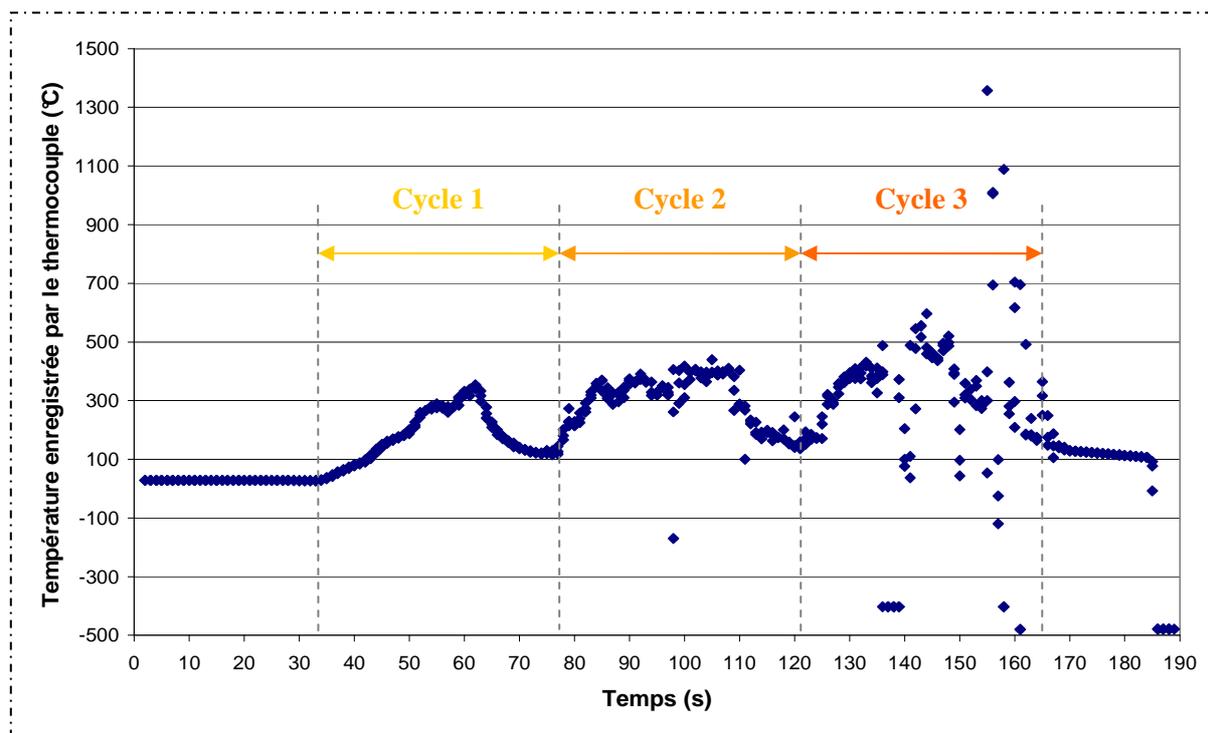


Figure 60 : Température mesurée au cœur de la bûche lors de la production de fumée à partir de bois de chêne, avec une durée d'appui de 20s

A cause des problèmes inhérents à la méthode employée, il n'a pas été possible à partir de nos relevés de donner avec précision une température de pyrolyse associée à chaque condition de génération de fumée mises en œuvre par la suite. Ces relevés de température permettent tout de même d'assurer le bon fonctionnement du pilote expérimental du point de vue du temps d'appui. Le générateur à friction a été utilisé pour faire varier la température de pyrolyse en faisant varier le temps d'appui. Il ressort de ces mesures que les trois temps d'appui considérés mènent bien à des niveaux de température différents (quelle que soit l'essence et l'humidité de bois considérées) :

- ♦ 5 secondes d'appui $T^{\circ} \approx 350^{\circ}\text{C}$;
- ♦ 25 secondes d'appui $T^{\circ} \approx 400^{\circ}\text{C}$;
- ♦ 45 secondes d'appui $T^{\circ} \approx 450^{\circ}\text{C}$.

Comme nous ne pouvons pas garantir avec précision les écarts de température réels entre les différentes conditions opératoires, ce paramètre sera toujours interprété par la suite comme un paramètre discret.

VIII.3. Choix d'une solution de rinçage des pièges à fumée

La soude et l'acide acétique molaires ont été testés en tant que solution de rinçage. Le choix a été réalisé à la fois selon un critère technique (efficacité de rinçage) et un critère analytique (qualité des extraits obtenus à partir des fumées liquides de rinçage).

D'abord, la solution de rinçage doit être capable de réaliser un rinçage des pièges à fumée « en profondeur ». En effet, à partir d'une certaine durée de piégeage en continu, un dépôt épais de goudrons de fumée peut se former à l'intérieur des pièges, en particulier le piège électrostatique. Il est nécessaire de pouvoir récupérer par le rinçage même les couches les plus « profondes » de dépôts. Si la composition de la fumée n'est pas la même dans les premiers et les derniers cycles de production, un rinçage superficiel entraînera une sous-estimation des composés générés préférentiellement au début de l'expérimentation et une surestimation des composés apparaissant plus tard.

De ce point de vue, la soude est largement plus efficace que l'acide acétique : elle permet un réel décapage du piège et la récupération systématique des dépôts de fumée les plus « profonds ». Par ailleurs, elle permet la récupération d'une plus grande quantité de dépôts de fumée avec un même volume de solution. Les fumées liquides obtenues avec de la soude sont donc plus concentrées, ce qui présente un avantage non négligeable pour les extractions ultérieures.

En plus de cela, la solution de rinçage doit permettre de maximiser les teneurs en analytes (HAP et composés phénoliques) dans les extraits obtenus après extraction. Une série d'essais a donc été réalisée pour comparer les extraits de fumées liquides obtenues avec des conditions de génération et de piégeage identique, mais des solutions de rinçage différentes.

- Les extraits de HAP de fumées liquides dans la soude sont plus concentrés pour l'ensemble des analytes détectés (résultats non présentés).

- Les extraits aromatiques sont plus concentrés pour la majorité de leurs composés (plus de 200 pics chromatographiques détectés). Seuls 9 composés sont plus concentrés pour l'extrait obtenu à partir d'acide acétique, sans qu'il soit possible d'affirmer si cette différence est établie lors de l'étape de rinçage ou l'étape d'extraction. Parmi ces composés volatils, un seul fait partie des composés phénoliques ciblés : le 4-vinylguaïacol (Figure 61).

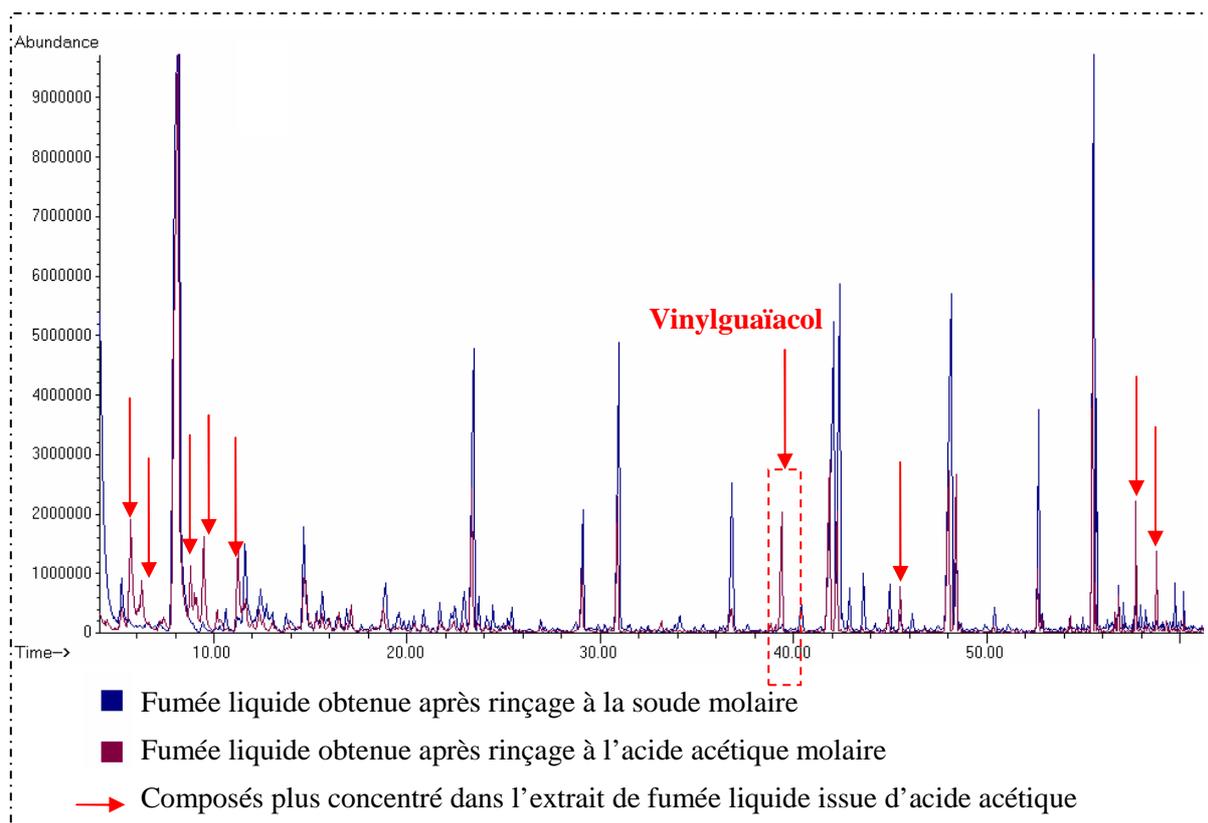


Figure 61 : Comparaison des chromatogrammes d'extraits aromatiques de fumées liquides obtenues par rinçage des pièges à fumée avec différentes solutions

Ces résultats préliminaires ont permis de choisir la soude en tant que solution de rinçage des pièges pour la récupération des dépôts de fumée. Ce choix est défavorable à un seul des composés ciblés par nos analyses : le 4-vinylguaiacol.

VIII.4. Choix du type de piège à fumée utilisé

Une autre série d'essais préliminaires a été réalisée pour tester la nécessité du piège frigorifique en complément du piège électrostatique lors des expérimentations.

La Figure 62 et la Figure 63 illustrent le fait que le piège frigorifique ne représente pas un apport significatif à l'analyse des fumées produites. En effet, on constate pour l'ensemble des composés ciblés (HAP et composés phénoliques) il n'y en a aucun que le piège frigorifique permette de mettre en évidence. Par ailleurs, tous les analytes détectés dans les deux pièges sont présents en quantités largement inférieures dans le piège frigorifique (la plupart des analytes n'étant même pas détectables à partir des eaux de rinçage de celui-ci).

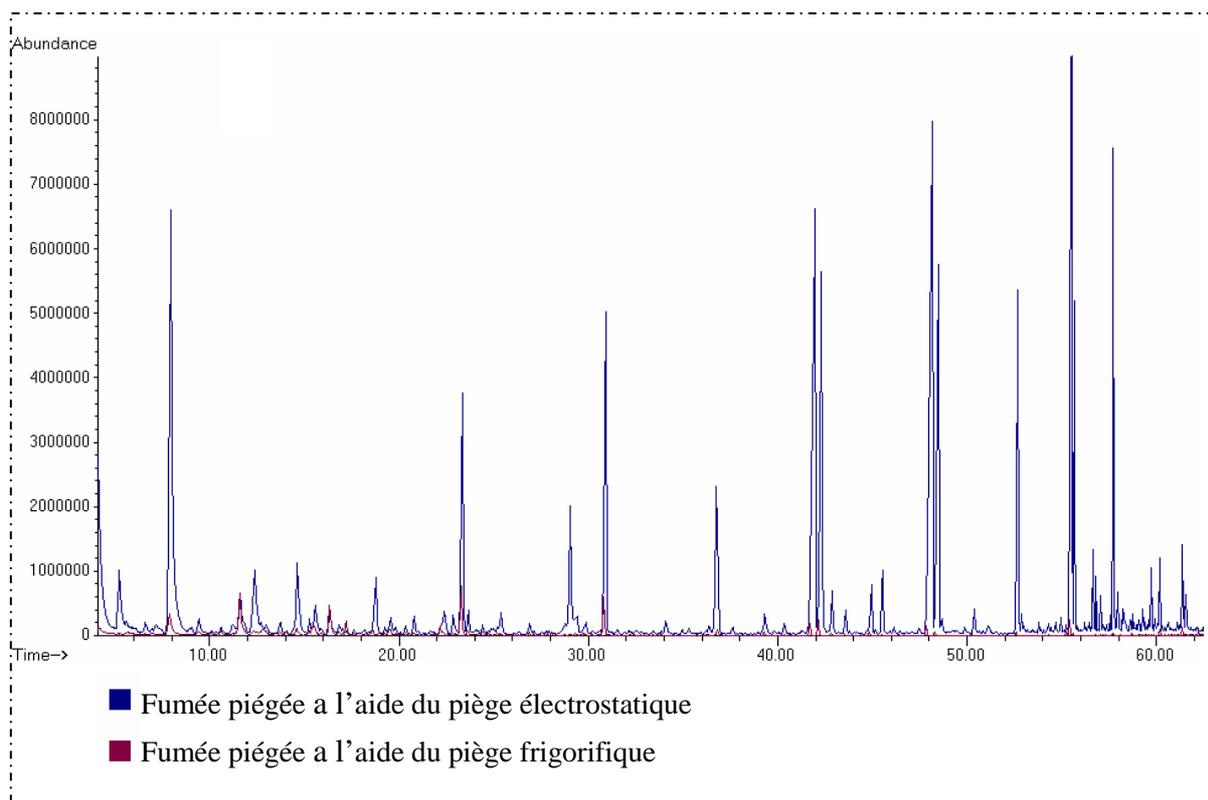


Figure 62 : Comparaison des chromatogrammes d'extraits aromatiques de fumées piégées à l'aide de l'un ou l'autre des deux pièges du pilote

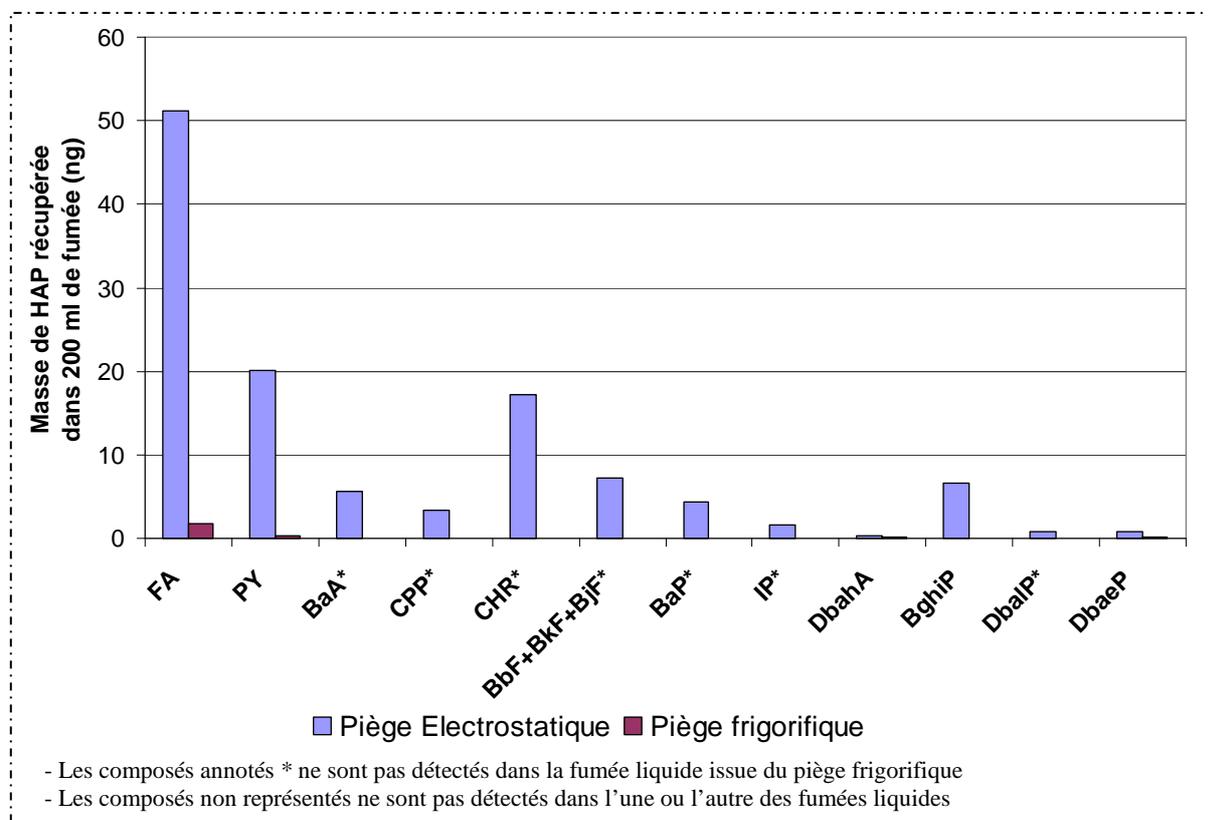


Figure 63 : Comparaison des quantités de HAP dosées dans des fumées liquides issues des deux pièges du pilote expérimental

Il a été décidé de ne pas utiliser le piège frigorifique en complément du piège électrostatique puisqu'il ne représente ni quantitativement ni qualitativement un apport significatif. Qui plus est, son élimination permet d'augmenter la durée des expériences, et donc la quantité de fumée piégée électrostatiquement. En effet, à cause de la formation rapide de bouchons de glace dans la double enveloppe du piège frigorifique à partir de l'humidité du flux d'air, la circulation de fumée dans le pilote était complètement interrompue au bout de deux à trois minutes.

Malgré les imprécisions de mesure sur les températures de pyrolyse inhérentes au matériel utilisé, les essais préalables ont permis de déterminer les conditions opératoires utilisées.

IX. Production des fumées, étude des variables expérimentales du pilote

IX.1. Variables expérimentales étudiées

Une fois le pilote validé, l'ensemble des 24 expérimentations de génération, piégeage, extraction et analyse de fumées du plan d'expérience a été réalisé dans un ordre aléatoire. Mais avant de pouvoir interpréter les données chimiométriques obtenues, il était nécessaire de valider le fonctionnement global du pilote sur l'ensemble du plan expérimental. Pour cela, nous avons utilisé les différentes valeurs de températures et de bilan matière associées à chacune des expériences.

Le relevé systématique de la température ambiante possède un double intérêt. Au cours de l'expérience, il a permis de contrôler le bon fonctionnement de la centrale de mesure. A posteriori, cette mesure a permis de vérifier que l'ensemble des expériences avait bien été mené dans les mêmes conditions ambiantes. Cela permet de vérifier entre autre que les fumées parcourant la conduite depuis le générateur jusqu'au piège sont exposées au même refroidissement.

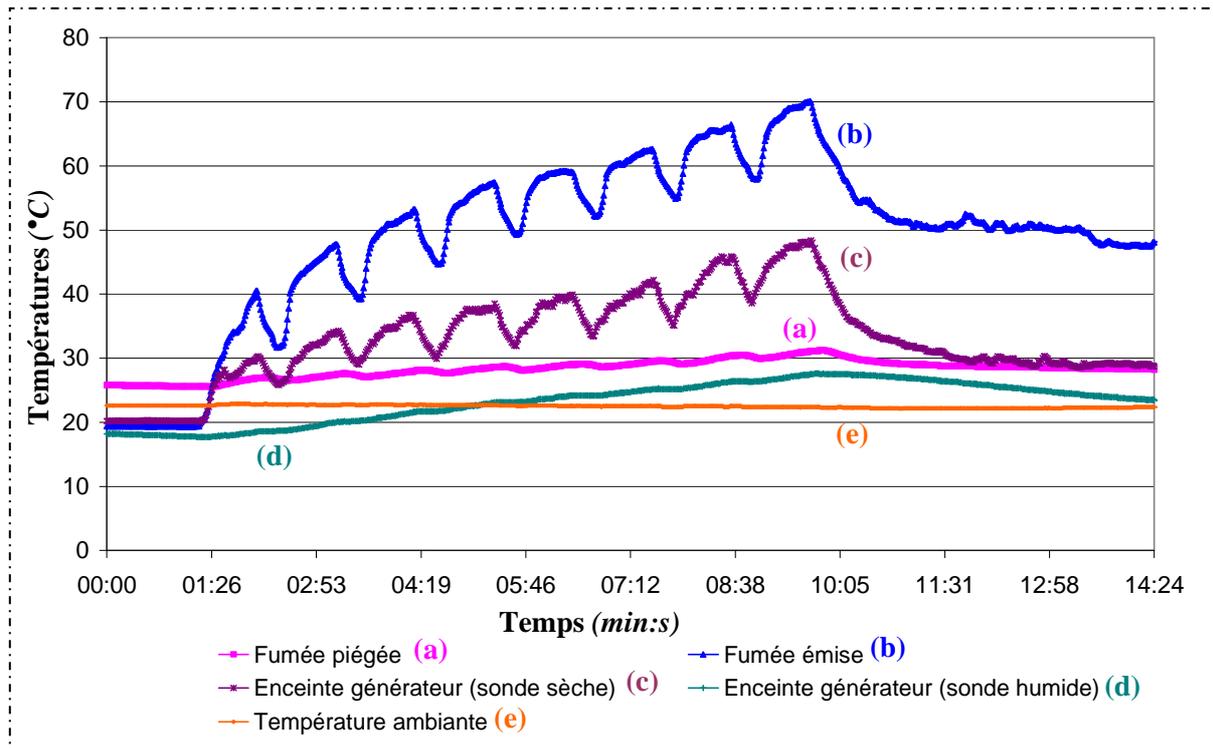


Figure 64 : Relevés de températures aux différents points du pilote expérimental pendant la génération et le piégeage de la fumée expérimentale P12 (temps d'appui : 45 secondes)

De même que nous l'avons vu pour la température de pyrolyse du bois, on constate des variations cycliques plus ou moins prononcées des autres températures qui correspondent au mode de fonctionnement « appui/repos » du générateur. Nous pouvons constater que les oscillations de température s'accompagnent d'une dérive globale. Ceci traduit le fait que le temps de relaxation entre deux temps d'appui de la bûche (20 secondes) n'est pas suffisant pour permettre le retour du système à sa température d'origine. Il a cependant été décidé de ne pas rallonger le temps de repos pour pallier cette dérive de température. Non seulement cela ne correspond pas au fonctionnement normal de ce type de générateur en industrie, mais en plus cela rallonge d'autant le temps d'attente de la fumée piégée avant sa récupération, laissant place à de potentielles évolutions de celle-ci.

L'ensemble de ces variations de température au cours du temps posent le problème du choix des paramètres de contrôle de l'expérience. Différents essais ont été réalisés afin de déterminer quels paramètres représentatifs des conditions réelles étaient exploitables (moyennes globales, moyennes par cycle de production, moyenne mobile sur un grand nombre de mesures, médiane, etc.). Les séries de données qui ont été conservées car représentatives et statistiquement exploitables sont les suivantes :

- ♦ température d'émission de fumée maximale atteinte,

- ♦ température de fumée piégée maximale atteinte,
- ♦ température « sèche » de l'enceinte du générateur,
- ♦ température « humide » de l'enceinte du générateur.

L'humidité relative (HR) moyenne au cours de l'expérience dans l'enceinte du générateur de fumée a été déterminée à partir de la température « sèche » moyenne et de la température « humide » moyenne. Bien que les valeurs obtenues de cette façon soient approximatives, elles ont été conservées car elles se révèlent être un paramètre discriminant dans les analyses et effectivement lié aux paramètres opérationnels.

Les bilans de matière réalisés par pesée des différents éléments (piège, bûche, cendrier, flacons de récupération) avant et après chaque opération ont permis d'évaluer les données suivantes pour chaque opération :

- ♦ masse de bois consommée au cours de l'expérience,
- ♦ masse d'imbrûlés résiduels produits au cours de l'expérience,
- ♦ masse de fumée piégée au cours de l'expérience,
- ♦ masse de fumée récupérée lors du rinçage.

A partir de ces valeurs, il a été possible d'approcher par le calcul certaines données non mesurables directement :

- ♦ masse de matière sèche de bois consommée au cours de l'expérience
(= masse de bois consommée – teneur en eau du bois utilisé * masse de bois consommée),
- ♦ la masse de fumée produite
(= matière sèche consommée – imbrûlés produits),
- ♦ le rendement de production
(= $100 * \text{masse de fumée produite} / \text{matière sèche consommée}$),
- ♦ l'efficacité de piégeage
(= $100 * \text{masse de fumée piégée} / \text{masse de fumée produite}$).

IX.2. Effets individuels des paramètres sur les variables

L'ensemble des données de ces paramètres de fonctionnement a été traité par analyse de la variance et test des étendues multiples afin d'identifier lesquels étaient variables selon les conditions opératoires. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Tableau 31.

Tableau 31 : Résultats d'analyse de la variance et test de comparaison multiple LSD réalisés sur les paramètres de contrôle du pilote mesurés au cours de la génération des fumées expérimentales

	Temps d'appui			Essence Bois			Teneur en eau		Distance		Air			
	ANOVA	LSD		ANOVA	LSD		ANOVA	LSD	ANOVA	LSD	ANOVA			
	Niveau de significativité	5	25	45	Niveau de significativité	Chêne	Hêtre	Niveau de significativité	Sec	Humide	Niveau de significativité	80 cm	400 cm	Niveau de significativité
Bois consommé (g)	0,042	217	267	271	0,486			0,034	271	232	0,867			0,625
Matière sèche consommée (g)	0,069				0,275			0,000	250	104	0,787			0,708
Imbrûlés produits (g)	0,164				0,692			0,239			0,990			0,929
Rendement de production (%)	0,714				0,312			0,409			0,463			0,642
Fumée produite (g)	0,337				0,821			0,001	169	47	0,790			0,314
Fumée piégée (g)	0,174				0,024	52	34	0,015	53	32	0,958			0,414
Efficacité piégeage (%)	0,218				0,021	69	52	0,001	90	31	0,579			0,747
Fumée récupérée (g)	0,054				0,016	29	19	0,031	28	20	0,202			0,804
Humidité relative de l'air moyenne (%)	0,176				0,257			0,031	40	54	0,312			0,118
Température fumée émise Max. (°C)	0,020	55	65	67	0,045	60	65	0,909			0,613			0,813
Température fumée piégée Max. (°C)	0,026	30	34	34	0,119			0,088			0,003	35	30	0,897

- Les niveaux de significativité témoignant d'un effet significatif au risque 5% est signalée en gras
- Les tests LSD ne sont réalisés que si l'effet associé est significatif
- Les valeurs reportées pour les niveaux du test LSD sont les moyennes par modalité de facteur
- Les moyennes sur une même ligne ne sont pas significativement différentes au risque 5%

Les différences constatées pour la production, le piégeage et la récupération de la fumée sont déterminants. Le fait que l'origine des fumées (essence de bois et humidité) influence les masses de fumée récupérée, indique que les fumées liquides obtenues n'ont pas les mêmes concentrations (puisque le volume de solution de rinçage est fixe). Ceci indique que les fumées liquides obtenues n'ont pas toutes la même concentration en goudrons de fumée. La

composition des fumées expérimentales ne peut pas être exprimée en teneurs d'analytes dans les fumées liquides, il est nécessaire de calculer les teneurs en analytes dans les goudrons de fumée condensées.

Les mesures de températures de fumée émise apportent plusieurs informations déterminantes. D'une part nous pouvons vérifier que la chute de température est très rapide dès que l'on s'éloigne du point de friction. La sonde n'est placée qu'à quelques centimètres de la zone de pyrolyse dont la température peut atteindre les 450 °C, mais les fumées les plus chaudes à son contact atteignent au maximum 70 °C. Nous pouvons donc affirmer que les étapes de décomposition pyrolytique ont déjà cessé, laissant place aux mécanismes de diversification des composés produits dans la zone anaérobie (Demirbaş, A. & Arin, G., 2002)

Par ailleurs, nous pouvons vérifier indirectement que les temps d'appui développent des températures de pyrolyse différentes, puisque les fumées émises ne sont pas à la même température. Par contre, alors que l'on aurait pu s'attendre à trois niveaux de température d'émission, nous constatons que les fumées produites par cycles de 25 et 45 secondes sont à la même température moyenne.

Signalons aussi que les deux essences de bois ont donné lieu à des fumées émises à des températures différentes, ce qui pourrait suggérer des niveaux de température de pyrolyse réelle différents. Nos mesures de température de pyrolyse n'ont mis en évidence que des différences dues au temps d'appui. Cependant, étant donné l'imprécision de cette mesure, il est possible qu'en restant dans la même gamme de températures, les deux bois soient pyrolysés à des niveaux sensiblement différents pour un temps d'appui donné. A temps d'appui, force d'appui et vitesse de rotation fixés, l'élévation de température engendrée par la friction du rotor sera d'autant plus grande que le bois utilisé est dense. Or, parmi les bois utilisés, c'est le hêtre qui est le plus dense et c'est donc lui qui serait porté à une température un peu plus élevée, expliquant cette différence de température d'émission. Cette hypothèse pourrait être vérifiée sans ambiguïté, mais pas avec un matériel industriel tel que celui que nous avons utilisé. Il serait nécessaire de pouvoir assurer une mesure parfaitement fiable de la température de pyrolyse.

Les fumées n'étant pas toutes émises à la même température, elles n'arrivent pas au piège avec la même température. Cependant, quelle que soit la température initiale des fumées, celles qui parcourent un plus long trajet arrivent au piège plus froides. Il ne sera donc pas possible d'interpréter ce paramètre comme correspondant à différentes températures de fumée

piégées, mais bien comme à différents refroidissements de la fumée entre son émission et son piégeage.

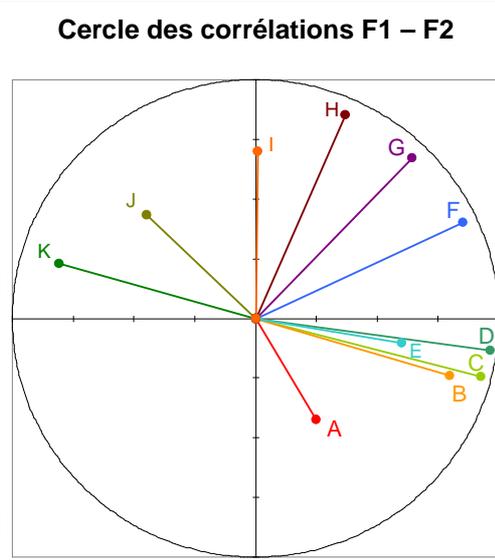
L'apport d'air comprimé n'affecte aucune des variables de contrôle. Ceci permet de garantir en particulier que ce paramètre n'influence pas les températures de fumées. On aurait en effet pu craindre que le flux d'air au niveau de la zone de pyrolyse ne puisse refroidir immédiatement les fumées. Comme la diversification des composés volatils néoformés par la pyrolyse dépend justement de ce refroidissement, cela aurait pu modifier la composition finale de la fumée. Il aurait par ailleurs été envisageable que l'air issu du compresseur ne soit pas à température ambiante et modifie les conditions de température et d'humidité relative dans l'enceinte de génération de fumée.

IX.3. Analyses en composantes principales des variables

Afin de pouvoir visualiser l'ensemble des l'effets des paramètres expérimentaux sur les variables expérimentales, une analyse en composantes principales a été réalisée sur ces données. Les différentes variables expérimentales n'étant pas homogènes entre elles, l'ACP a été normalisée.

Tableau 32 : Caractéristiques des trois premières composantes principales de l'analyse réalisée sur les variables expérimentales

Composantes principales	F1	F2	F3	
Inertie propre (%)	45,26	21,77	15,99	
Inertie cumulée (%)	45,26	67,03	83,02	
Coefficients de corrélation entre variables expérimentales et composantes principales				
Bois consommé	0,854	0,403	0,181	F
Mat. Sèche consommée	0,963	-0,136	-0,120	D
Imbrûlés produits	0,644	0,672	-0,272	G
Rendement de production	0,248	-0,425	0,743	A
Fumée produite	0,927	-0,246	-0,105	C
Fumée piégée	0,799	-0,240	0,433	B
Efficacité piégeage	-0,806	0,230	0,300	K
Fumée récupérée	0,603	-0,105	0,456	E
HR air Moy.	-0,445	0,431	0,692	J
T°fumée émise Max.	0,368	0,852	-0,069	H
T°fumée piégée Max.	0,008	0,699	0,324	I



Les trois caractéristiques des trois premières composantes principales sont présentées dans le Tableau 32. Bien que les deux premières composantes (F1 et F2) ne représentent que 67% de l'inertie totale des données, la composante F3 n'a pas été intégrée à l'analyse, car elle ne

permet pas d'améliorer la représentation globale de la dispersion des expériences et des variables. Par ailleurs, les composantes F1 et F2 présentent un effet particulier puisque la première est construite essentiellement grâce aux bilans matière, alors que la seconde représente principalement des données de températures.

A partir de ces informations sur la construction des composantes principales, il est possible d'interpréter la disposition des différentes conditions opératoires dans les plans qu'elles définissent.

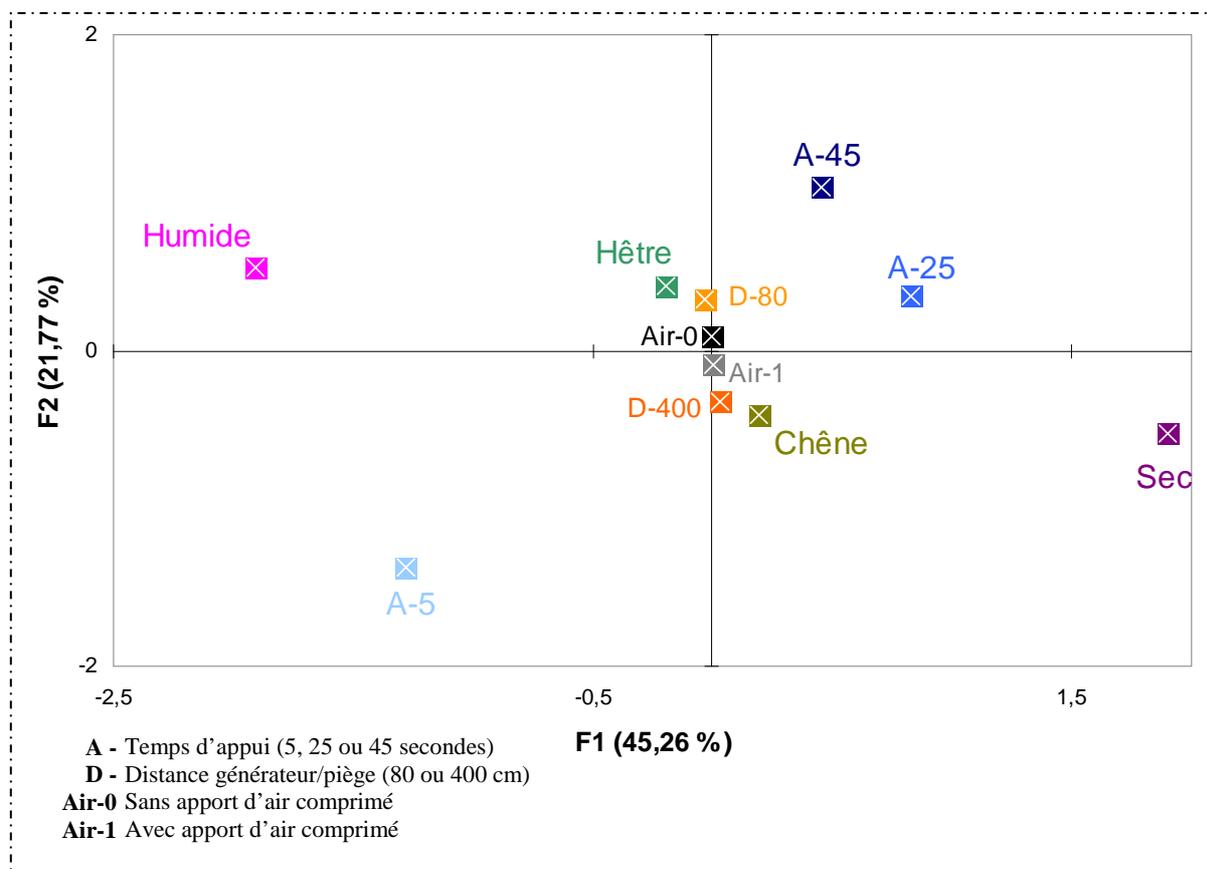


Figure 65 : Projection des barycentres de classes d'expériences dans le plan F1-F2 (données variables opérationnelles)

Sur le plan F1-F2 notamment (Figure 65) l'importance relative des différents paramètres s'observe aisément. L'humidité du bois utilisé est le paramètre le plus discriminant, celui qui entraîne les plus grandes disparités parmi les 24 expériences. Cela se comprend facilement, étant donné que c'est le facteur qui influence le plus grand nombre de variables expérimentales. Le bois sec étant situé très à droite du plan, il est celui qui augmente les quantités de bois consommé, de fumée produite et de fumée piégée. Le fait que le bois

humide soit fortement corrélé à l'efficacité de piégeage s'explique indirectement : le bois humide produisant moins de fumée, il est plus facile d'en piéger une part élevée, puisque l'énergie d'ionisation du piège est répartie sur une quantité plus faible de particules de fumées.

Nous pouvons aussi observer qu'il existe effectivement peu de différences entre les expériences réalisées avec un temps d'appui de 25 et de 45 secondes, puisque leurs barycentres associés sont relativement proches l'un de l'autre. De même que l'ensemble des autres conditions expérimentales sont beaucoup plus proche les unes des autres au centre du plan, soulignant une influence plus marginale sur les variables expérimentales.

Le fonctionnement du pilote sur l'ensemble des 24 expériences réalisées a pu être validé par l'analyse postérieure des variables expérimentales mesurées au cours de fonctionnement. Le pilote globalement répondu aux exigences techniques de l'expérience.

X. Mise en place des dosages des composés cible

X.1. Composés phénoliques

X.1.1. Analyse en chromatographie monodimensionnelle

X.1.1.1. Séparation chromatographique

Un exemple de chromatogramme de la gamme étalon des standards de composés phénoliques est présenté à la Figure 66. Bien que la programmation de température ait été mise au point pour améliorer la séparation des composés phénoliques natifs dans des extraits de fumée, elle a été utilisée aussi pour les gammes de calibration dérivatisées. Il n'a en effet pas été possible d'améliorer significativement la séparation obtenue (en particulier la co-élution du guaiacol et du 2,4-diméthylphénol, cf. paragraphe suivant) en modifiant la programmation de température. Il a donc été décidé de conserver la même programmation pour les deux analyses, afin de faciliter les comparaisons.

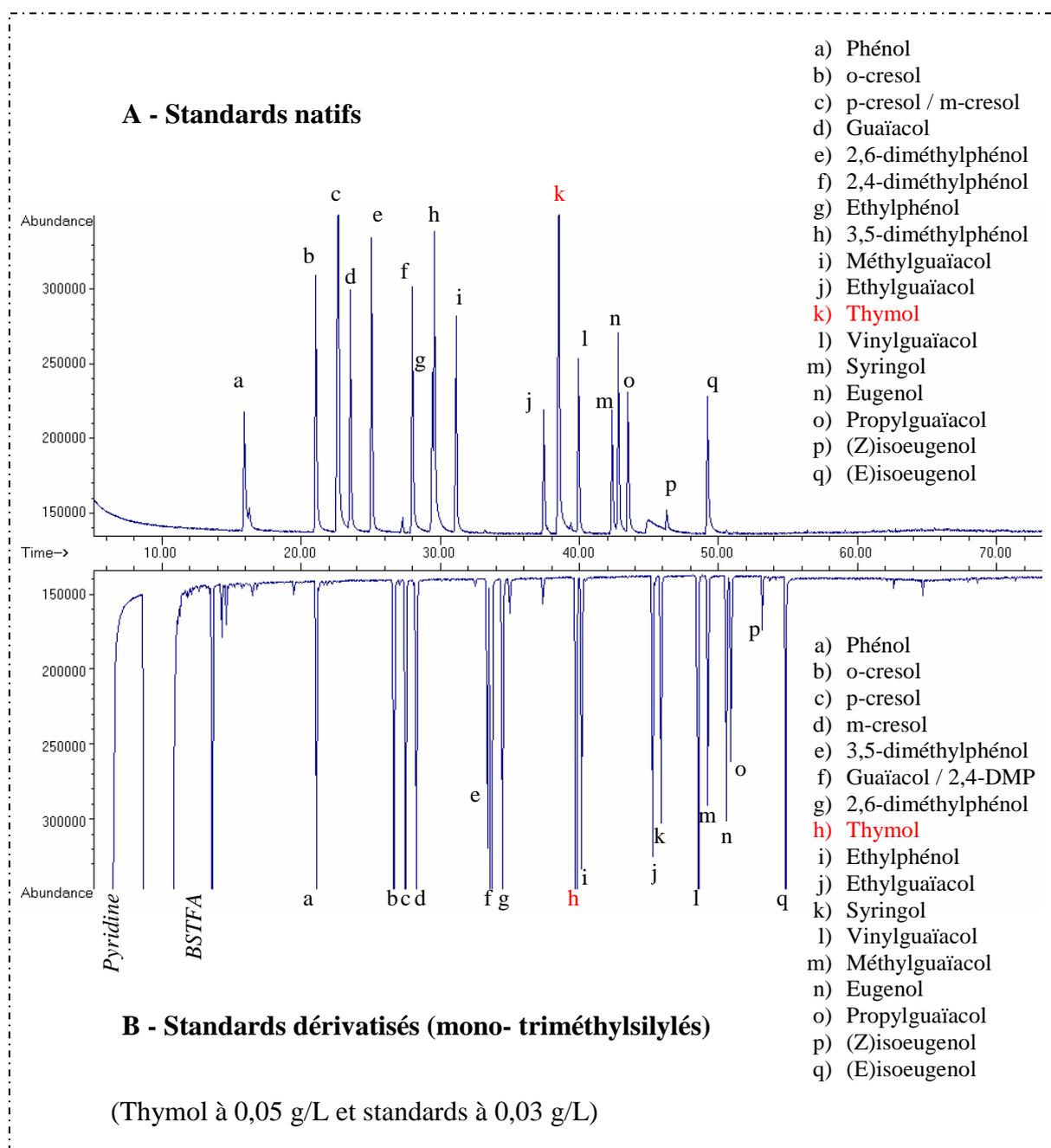


Figure 66 : Comparaison des chromatogrammes GC-FID d'un même point de la gamme de calibration des composés phénoliques « natif » et « dérivatisés »

Tableau 33 : Largeurs de pics à mi-hauteur des standards natifs et dérivatisés

Points de calibration		T1	T2	T3	T4	T5	T1 → T5
Standards Natif	Moyenne	0,156	0,112	0,104	0,108	0,112	0,118
	Ecart-type	0,067	0,023	0,013	0,021	0,027	0,030
Standards Dérivatisés	Moyenne	0,087	0,087	0,089	0,090	0,090	0,088
	Ecart-type	0,012	0,013	0,014	0,017	0,015	0,014

(moyenne et écart-type des pics d'un même point de calibration exprimées en minutes)

Comme reporté dans la bibliographie, (Kornreich, M.R. & Issenberg, P., 1972) la dérivation des standards de composés phénoliques permet d'obtenir des pics plus étroits (Tableau 33), ce qui indique une meilleure qualité de la séparation chromatographique pour nos analytes.

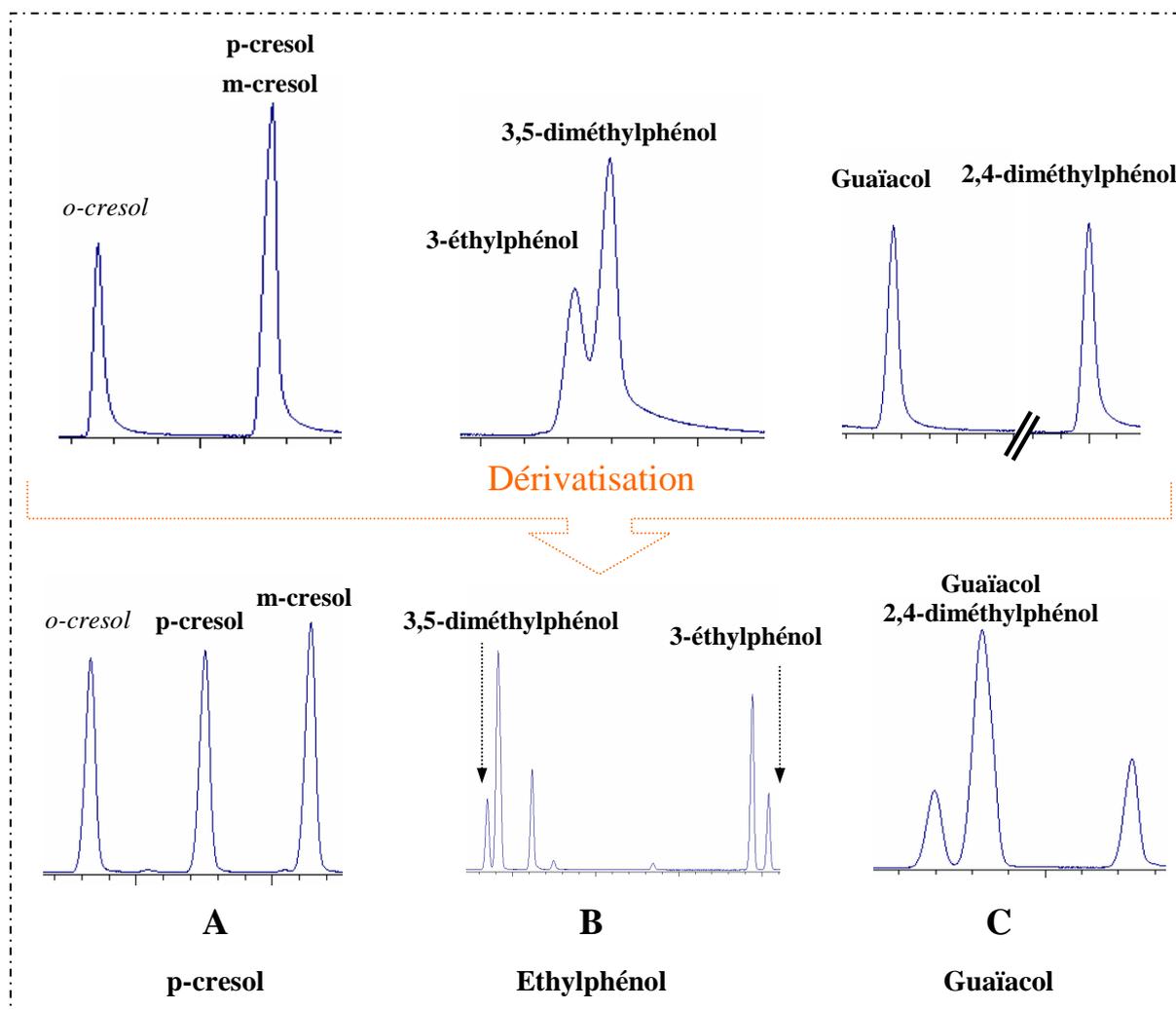


Figure 67 : Co éluions rencontrées dans les gammes étalons de composés phénoliques avant et après dérivation

En plus de donner de meilleurs pics chromatographiques, la dérivation modifie l'indice de rétention et l'ordre d'éluion de certains des analytes. Ainsi, le *p*-crésol et le *m*-crésol qui sont co-élus à l'état natif sont parfaitement séparés une fois dérivatisés (Figure 67-A). De même, le 3-éthylphénol et le 3,5-diméthylphénol qui ne sont pas parfaitement séparés l'un de l'autre ne sont plus co-élus avec aucun autre phénol une fois triméthylsilylés (Figure 67-B). Cependant, le point le plus important à constater est que l'étape de dérivation fait

apparaître une co-élution plus problématique que celles qu'elle permet de résoudre : le guaiacol et le 2,4-diméthylphénol se retrouvent complètement co-élus (Figure 67-C). Le guaiacol étant unanimement reporté comme l'un des composés volatiles les plus importants, cette coélution peut poser de réels problèmes lors de l'analyse des fumées expérimentales. C'est d'autant plus vrai que la quantification du guaiacol est utilisée pour le calcul de ratios (notamment guaiacol / phénol) permettant de caractériser les fumées et les produits de fumage, sa quantification dans les échantillons ne doit donc pas être sujette à caution.

X.1.1.2. Calibration linéaire

Le calcul des coefficients de corrélation linéaires (R^2) ne montre pas de réel gain d'ajustement des droites de calibration (exemple de le 4-éthylguaiacol présenté Figure 68). grâce à l'utilisation de la dérivation (Tableau 34-A et Tableau 34-B). Par ailleurs, les gammes d'étalons natifs et dérivatisés s'avèrent toutes les deux extrêmement répétables, avec moins de 2% d'écart entre les points répétés. Il est donc difficile parler de réel apport de la dérivation, puisque les deux gammes présentent de bons critères de linéarité.

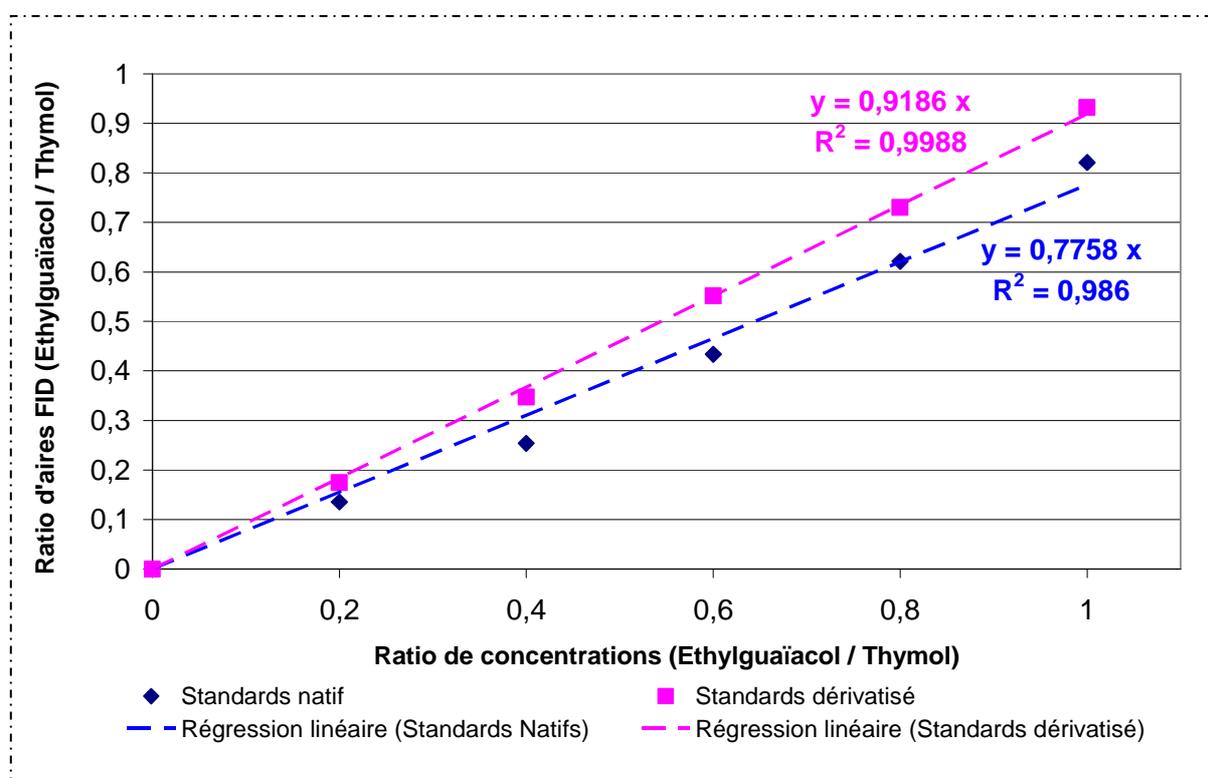


Figure 68 : Droites de calibration du 4-éthylguaiacol

Tableau 34 : Paramètres des gammes de calibration de composés phénoliques natifs et dérivatisés

A - Analytes et Etalon Interne Natifs					B - Analytes et Etalon Interne Dérivatisés				
	IRL*	F*	R ² *	LDQ*		IRL*	F*	R ² *	LDQ*
				µg/g					µg/g
Phénol	973	0,51	0,98	7,59	Phénol	1049	0,76	0,94	5,15
m-crésol	1048	0,85	0,94	4,60	o-crésol	1126	1,03	0,93	3,78
p-crésol					p-crésol	1137	1,07	0,94	3,64
o-crésol	1071	1,80	0,96	2,17	m-crésol	1148	1,22	0,95	3,19
Guaïacol	1083	0,63	0,96	6,19	Guaïacol	1217	0,70	0,95	5,60
2,6-DMP*	1104	0,84	0,96	4,66	2,4-DMP*				
2,4-DMP*	1143	0,79	0,95	4,95	3,5-DMP*	1221	2,69	0,95	1,45
3-éthylphénol	1163	0,45	0,97	8,65	2,6-DMP*	1232	0,94	0,94	4,16
3,5-DMP*	1165	0,96	0,94	4,05	3-éthylphénol	1311	0,71	0,95	5,49
4-méthylguaïacol	1186	0,61	0,97	6,45	4-éthylguaïacol	1388	0,92	1,00	4,26
4-éthylguaïacol	1271	0,78	0,99	5,03	Syringol	1394	0,61	0,95	6,37
4-vinylguaïacol	1310	0,45	0,96	8,64	4-vinylguaïacol	1433	1,01	0,99	3,86
Syringol	1343	0,37	0,96	9,07	4-méthylguaïacol	1447	0,59	0,95	5,74
Eugénol	1349	0,57	0,96	5,73	Eugénol	1468	0,63	0,96	5,17
4-propylguaïacol	1359	0,43	0,94	9,07	4-propylguaïacol	1473	0,48	0,96	8,20
(Z)isoeugénol	1400				(Z)isoeugénol	1517			
(E)isoeugénol	1446	0,60	0,94	6,52	(E)isoeugénol	1569	0,73	0,96	5,33

* DMP - diméthylphénol ; IRL - indice de rétention linéaire ; F - facteur de réponse ; R² - coefficient de corrélation linéaire de la droite de calibration ; LDQ - limite de quantification dans la fumée

Même s'il a été vu précédemment que les deux isomères d'isoeugénol (Z et E) sont effectivement séparés en chromatographie à l'état natif et à l'état dérivatisé, ils sont quantifiés comme un seul analyte. Leurs proportions respectives dans le standard analytique utilisé pour la gamme de calibration étant inconnue, il est impossible de calculer des facteurs de réponse spécifiques.

Comme attendu, les limites de quantification des analytes dérivatisés sont plus basses que celles des analytes natifs (les exceptions du m-crésol et du 3,5-diméthylphénol s'expliquent par les co-élutions qui existent dans une gamme mais pas dans l'autre). Cette amélioration provient de l'étrécissement des pics chromatographiques qui permet une augmentation du rapport « signal / bruit ». Cependant, les limites de quantification individuelles restent du même ordre de grandeur, le rapport LDQ_{natif}/LDQ_{dérivatisé} allant de 1,1 pour le propylguaïacol et l'eugénol à 3,4 pour le 2,4-diméthylphénol.

Bien que l'utilisation du BSTFA en tant qu'agent dérivatisant des composés présente des intérêts certains, ses inconvénients semblent dépasser ses avantages pour notre application. En effet, les pics chromatographiques sont de meilleure qualité, mais la co-élution engendrée sur le guaïacol est potentiellement trop problématique. Par ailleurs, les droites de calibration

obtenues ne sont pas de meilleure qualité et le gain de limite de quantification n'est pas probant.

L'analyse des extraits aromatiques de fumées a été réalisée sans utiliser d'agent dérivatisant pour l'ensemble des expériences.

X.1.2. Analyse en chromatographie bidimensionnelle totale

Nous avons identifié deux co-élutions problématiques pour la GC (Figure 67, p.167) : p-crésol + m-crésol et 3-éthylphénol + 3,5-diméthylphénol. La seconde est parfaitement résolue grâce à la GCxGC, bien que la représentation en deux dimensions ne le montre pas clairement (Figure 69).

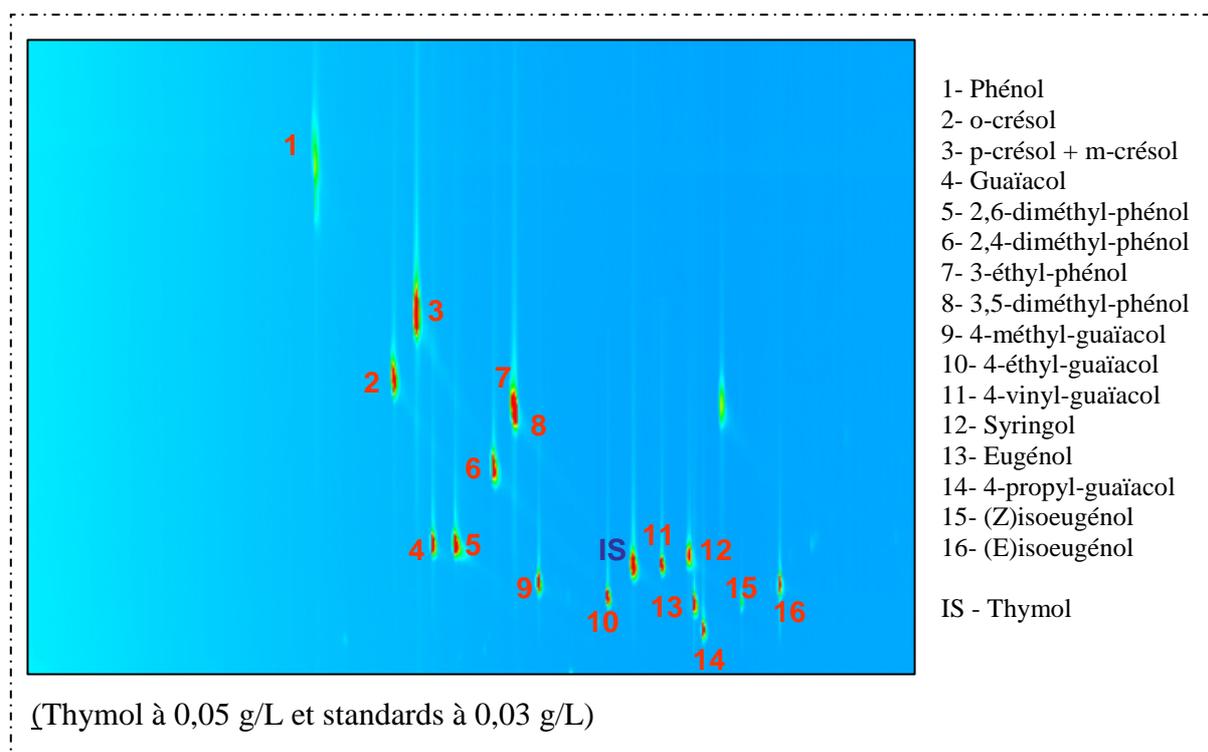


Figure 69 : « Contour plot » d'un point de la gamme de calibration des composés phénoliques « natif » en GCxGC-TOFMS

En revanche, le p-crésol et le m-crésol restent parfaitement superposés même avec la séparation en deux dimensions. Comme en plus leurs spectres de masse sont extrêmement proches (Figure 70), il n'est pas possible de réaliser une déconvolution de pics à l'aide du

logiciel de traitement de données. Ces deux isomères sont donc ici aussi intégrés et quantifiés comme un seul analyte.

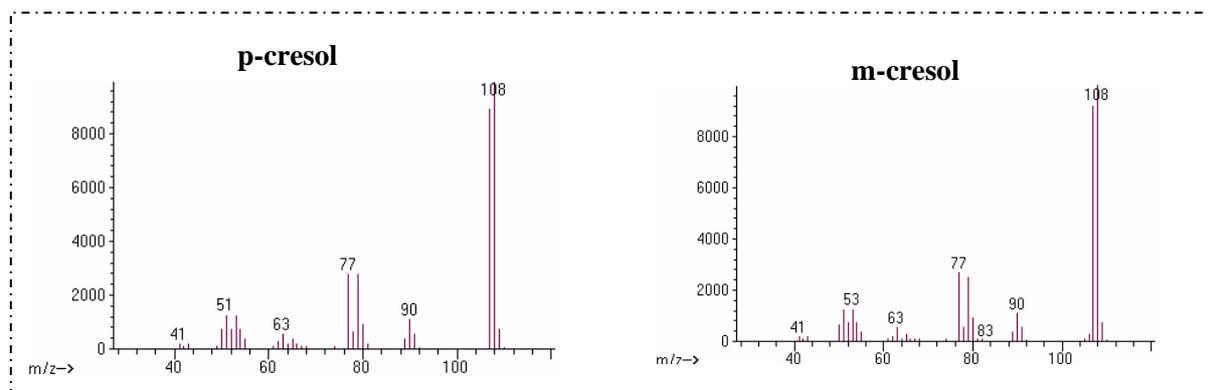


Figure 70 : Spectres de masse des analytes sujets à des co-élutions (énergie d'ionisation 70 eV)

La co-élution p-crésol/m-crésol mise à part, les résultats obtenus avec la gamme de calibration permettent d'obtenir des droites de régression de qualité suffisante pour réaliser la quantification des composés phénoliques.

Tableau 35 : Paramètres de la gamme calibration de composés phénoliques en GCxGC-TOFMS

	Masse Unique	F*	R ² *	LDQ* µg/g
Phénol	94	0,0439	0,99	2,16
m-crésol	108	0,0799	0,99	1,26
p-crésol	108	0,0407	0,99	0,61
o-crésol	108	0,0355	0,99	1,72
Guaïacol	109	0,0450	0,99	1,34
2,6-diméthylphénol	107	0,0435	0,99	1,45
2,4-diméthylphénol	121	0,0150	0,98	2,24
3-éthylphénol	107	0,0754	0,97	1,33
3,5-diméthylphénol	123	0,0219	0,99	1,98
4-méthylguaïacol	137	0,0377	0,99	1,58
4-éthylguaïacol	135	0,0572	0,97	2,42
4-vinylguaïacol	154	0,0132	0,99	2,34
Syringol	164	0,0097	0,99	1,97
Eugénol	137	0,0363	0,99	3,05
4-propylguaïacol	164	0,0100	0,98	2,12
(Z)isoeugénol				
(E)isoeugénol				

* F - facteur de réponse ; R² - coefficient de corrélation linéaire de la droite de calibration ; LDQ - limite de quantification dans la fumée

Par comparaison avec les gammes de calibration en GC-FID, la GCxGC-TOFMS permet au premier abord un gain significatif en terme de limites de quantification et de résolution de

co-élutions. Cependant, elle possède aussi des contraintes inhérentes aux appareillages utilisés (en terme de manutention lors de l'utilisation mais principalement de traitement des données obtenues) qui doivent être prises en considération pour déterminer le choix de la technique la plus appropriée à notre analyse. A ce stade là de l'étude, nous avons donc choisi de ne pas faire de choix définitif concernant la technique d'analyse des extraits aromatiques de fumées, afin de pouvoir les comparer ultérieurement en prenant en considération les résultats auxquels elles nous donnent respectivement accès (voir XI.3, p.178).

X.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

De la même façon que pour les composés phénoliques, les droites de calibration (exemple du benzo[a]pyrène en Figure 71) des HAP permettent de calculer les facteurs de réponse. Bien que la dilution isotopique impose l'utilisation d'un grand nombre de standards marqués, elle offre une excellente linéarité de réponse pour l'ensemble des analytes, comme le montrent les coefficients de corrélation linéaires associés (Tableau 36).

Tableau 36 : Paramètres des gammes de calibration des HAP

HAP	F*	R ² *	LDQ* ng/g
Phénanthrène	1,01	1,00	0,039
Anthracène	1,09	0,99	0,060
Fluoranthène	0,19	1,00	0,072
Pyrène	0,08	1,00	0,124
Benz[a]anthracène	0,15	1,00	0,042
Cyclopenta[c;d]pyrène	0,06	1,00	0,107
Chrysène	0,13	1,00	0,047
5-Méthylchrysène	0,11	1,00	0,059
Benzo[b/j/k]fluoranthène	0,13	1,00	0,059
Benzo[a]pyrène	0,13	1,00	0,072
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	0,35	1,00	0,037
Dibenz[a,h]anthracène	0,08	1,00	0,158
Benzo[g,h,i]perylène	0,38	1,00	0,036
Dibenzo[a,l]pyrène	0,34	1,00	0,074
Dibenzo[a,e]pyrène	0,44	1,00	0,056
Dibenzo[a,i]pyrène	0,59	1,00	0,127
Dibenzo[a,h]pyrène	1,00	1,00	0,075

* F - facteur de réponse ; R² - coefficient de corrélation linéaire de la droite de calibration ; LDQ - limite de quantification dans la fumée

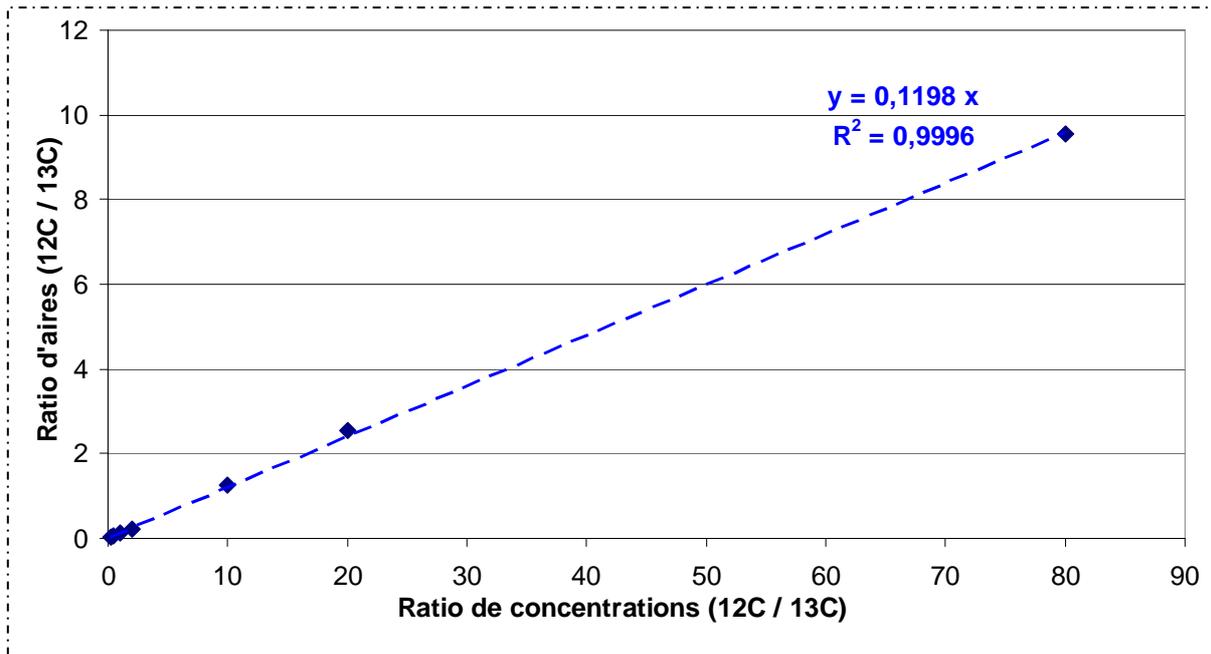


Figure 71 : Droites de calibration du Benzo[a]pyrène

XI. Influence des paramètres de génération sur la composition des fumées

XI.1. Teneur des fumées en analytes

Le pilote a été utilisé pour produire, piéger et récupérer sous forme liquide 24 fumées expérimentales selon le plan d'expérience prédéfini. Après extractions spécifiques, les composés phénoliques et HAP ciblés ont été quantifiés dans chacun des extraits. Les résultats obtenus sont présentés aux pages suivantes dans le Tableau 37 (composés phénoliques dosés par GC-FID), le Tableau 38 (composés phénoliques dosés par GCxGC-TOFMS) et le Tableau 39 (HAP dosés par GC-MS/MS).

Tableau 37 : Teneur des 24 fumées expérimentales en composés phénoliques dosés par GC-FID

Point exp.	Temps d'appui	Essence de bois	Humidité du bois	Distance au piège	Apport en air	Phénol	o-crésol	p+m-crésol	Guaiacol	2,6-diméthylphénol	2,4-diméthylphénol	3-éthylphénol	3,5-diméthylphénol	4-methylguaiacol	4-éthylguaiacol	4-vinylguaiacol	Syringol	Eugénol	4-propylguaiacol	(Z+E)isoeugénol	Somme
F01	5	C	S	80	X	144,01	12,05	15,74	571,33	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	561,75	133,29	33,34	1143,25	699,27	61,78	404,09	3779,91
F02	25	C	S	80	o	151,98	C.E.	14,74	499,02	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	536,79	270,84	9,97	934,21	344,32	40,32	108,92	2911,11
F03	45	C	S	80	o	173,90	11,51	19,63	616,16	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	753,80	284,17	16,50	1463,67	385,34	58,95	257,92	4041,55
F04	5	H	S	80	o	44,93	12,56	8,58	217,92	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	240,17	88,28	9,28	625,07	350,04	30,43	204,81	1832,06
F05	25	H	S	80	X	298,87	37,62	67,53	1439,53	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1673,77	538,62	24,34	3806,09	1195,80	162,96	620,53	9865,67
F06	45	H	S	80	X	301,53	45,38	64,80	1496,06	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1577,92	486,98	15,49	3660,14	761,91	154,42	309,45	8874,07
F07	5	C	S	400	o	204,79	C.E.	12,80	609,67	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	554,63	373,43	49,84	1500,84	638,95	60,59	517,92	4523,46
F08	25	C	S	400	X	142,12	C.E.	N.Q.	368,04	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	481,31	227,12	8,42	846,96	259,82	35,28	100,73	2469,80
F09	45	C	S	400	X	176,97	N.Q.	16,85	725,61	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	686,42	265,14	13,62	1500,71	379,67	63,90	243,94	4072,83
F10	5	H	S	400	X	63,85	C.E.	10,52	283,26	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	302,82	93,34	10,30	891,06	447,58	38,39	198,96	2340,07
F11	25	H	S	400	o	258,05	C.E.	62,98	1445,47	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1597,58	452,67	15,39	4329,53	699,31	156,02	416,30	9433,29
F12	45	H	S	400	o	248,52	C.E.	60,34	1402,35	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1563,94	468,53	14,80	4246,76	621,54	150,49	374,81	9152,10
F13	5	C	H	80	o	25,71	N.Q.	N.Q.	61,60	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	53,76	43,70	20,78	206,17	93,39	8,64	130,06	643,82
F14	25	C	H	80	X	113,72	N.Q.	4,83	223,17	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	175,39	131,84	6,96	469,56	240,87	14,54	88,14	1469,01
F15	45	C	H	80	X	151,34	N.Q.	6,62	408,74	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	348,68	196,69	11,45	890,89	345,69	32,94	154,06	2547,11
F16	5	H	H	80	X	152,66	24,05	28,05	644,91	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	986,67	263,86	20,02	1976,51	1457,20	108,11	704,31	6366,33
F17	25	H	H	80	o	160,11	32,95	32,61	724,33	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1134,53	307,35	23,11	1829,74	1358,49	113,89	740,37	6457,48
F18	45	H	H	80	o	172,26	51,67	39,66	894,10	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1247,65	347,63	17,09	2613,83	1222,52	127,18	595,45	7329,03
F19	5	C	H	400	X	133,67	N.Q.	6,17	249,30	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	221,55	197,68	23,56	839,39	385,86	25,23	372,47	2454,88
F20	25	C	H	400	o	125,34	3,22	6,93	311,17	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	252,89	177,58	16,42	762,14	342,22	20,60	215,47	2233,98
F21	45	C	H	400	o	124,90	3,93	5,41	308,29	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	240,26	172,91	15,58	562,86	376,84	19,78	233,28	2064,03
F22	5	H	H	400	o	17,03	N.Q.	4,05	57,10	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	150,96	47,07	9,64	439,66	244,84	17,14	206,52	1194,03
F23	25	H	H	400	X	179,29	C.E.	32,42	927,08	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1143,14	318,70	15,11	2538,97	906,45	117,09	475,97	6654,22
F24	45	H	H	400	X	181,91	C.E.	36,05	926,85	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1187,80	323,98	21,34	2103,58	1443,11	122,96	712,20	7059,78

- Les concentrations sont toutes exprimées en µg de composé par g de fumée utilisée pour l'extraction

- N.Q. Composé dont la concentration est inférieure à sa limite de quantification

- C.E. Composé non quantifiable car co-élué avec une molécule parasite

- Niveaux de paramètres : temps d'appui - 5 s / 25 s / 45 s ; essence de bois - Chêne / Hêtre ; humidité de bois - Sec / Humide ; distance - 80 / 400 cm ; apport d'air - sans (X) / avec (o)

Tableau 38 : Teneur des 24 fumées expérimentales en composés phénoliques dosés par GCxGC-TOFMS

Point exp.	Paramètres expérimentaux					Composés phénoliques															
	Temps d'appui	Essence de bois	Humidité du bois	Distance au piège	Apport en air	Phénol	o-crésol	p+m-crésol	Guaiacol	2,6- diméthylphénol	2,4- diméthylphénol	3-éthylphénol	3,5- diméthylphénol	4-methylguaiacol	4-éthylguaiacol	4-vinylguaiacol	Syringol	Eugénol	4-propylguaiacol	(Z+E)isoeugénol	Somme
F01	-1	C	S	80	X	101,65	3,55	9,52	549,23	0,23	1,74	0,65	0,74	546,06	142,10	1,26	777,32	711,55	51,68	4,39	2901,65
F02	0	C	S	80	o	145,06	5,08	10,75	647,73	0,23	2,28	1,64	1,43	552,76	171,96	N.Q.	784,43	471,25	56,59	3,78	2854,95
F03	1	C	S	80	o	158,93	6,39	13,78	797,16	0,33	3,58	2,36	2,16	726,51	227,50	0,80	924,98	705,81	101,77	234,85	3906,90
F04	-1	H	S	80	o	33,44	4,71	6,26	234,92	0,29	2,86	1,10	0,55	251,08	41,22	0,41	635,91	377,45	39,56	201,54	1831,30
F05	0	H	S	80	X	221,35	30,24	38,57	1237,24	2,27	5,24	6,84	10,54	1464,16	260,38	N.Q.	2346,89	1688,62	41,62	6,51	7360,49
F06	1	H	S	80	X	240,56	29,81	38,40	1148,75	1,90	14,14	6,01	2,93	745,94	460,84	N.Q.	1599,16	1351,95	202,44	397,82	6280,14
F07	-1	C	S	400	o	117,81	2,67	9,19	654,52	0,19	2,62	1,57	0,43	608,05	164,90	1,76	1391,71	708,24	58,76	224,19	3946,62
F08	0	C	S	400	X	119,24	4,13	8,01	493,28	0,23	1,80	1,03	1,09	401,98	120,55	0,47	605,71	375,25	43,27	132,10	2308,13
F09	1	C	S	400	X	143,35	5,11	10,84	600,10	0,23	2,76	1,98	1,74	568,60	184,57	N.Q.	1643,84	577,21	76,23	1,22	3817,76
F10	-1	H	S	400	X	42,34	4,57	5,38	260,74	0,37	0,93	1,14	0,41	284,36	43,81	0,31	543,20	396,59	42,71	86,06	1712,92
F11	0	H	S	400	o	235,31	30,65	35,89	1051,26	2,29	5,01	5,94	9,57	1175,92	226,86	0,66	2116,64	1288,78	222,84	481,78	6889,41
F12	1	H	S	400	o	238,18	34,06	42,90	1157,49	2,67	5,55	6,93	3,45	1314,25	243,20	0,61	3490,09	1372,19	226,67	494,09	8632,33
F13	-1	C	H	80	o	20,51	N.Q.	0,73	68,42	N.Q.	0,14	0,04	0,14	61,54	15,87	0,53	140,94	99,33	6,16	92,72	507,08
F14	0	C	H	80	X	91,94	1,29	3,58	226,58	0,07	1,31	0,47	0,21	179,99	43,27	0,36	417,33	252,94	16,00	41,54	1276,90
F15	1	C	H	80	X	122,48	1,85	6,11	395,80	0,09	0,86	0,95	0,37	341,56	98,65	0,53	762,44	386,28	34,87	138,71	2291,55
F16	-1	H	H	80	X	125,95	13,31	22,84	672,29	0,73	7,69	3,34	1,55	1033,74	151,69	0,82	1883,13	1625,81	145,45	5,23	5693,56
F17	0	H	H	80	o	114,84	9,14	6,80	691,47	0,87	2,16	2,58	0,35	1105,47	165,21	0,77	1493,16	1332,17	138,38	379,64	5443,01
F18	1	H	H	80	o	139,49	17,00	25,27	855,93	0,98	1,61	3,00	5,00	1195,76	183,34	0,93	1704,49	1477,56	159,61	494,76	6264,71
F19	-1	C	H	400	X	90,15	N.Q.	3,63	243,44	N.Q.	0,90	0,57	0,13	241,91	57,86	1,45	822,88	433,43	25,15	273,46	2194,97
F20	0	C	H	400	o	73,33	N.Q.	2,38	286,85	N.Q.	0,71	0,44	0,17	249,60	57,63	0,55	522,85	300,68	19,06	157,14	1671,41
F21	1	C	H	400	o	121,76	1,35	5,27	350,45	0,12	1,07	0,57	0,11	292,83	61,95	N.Q.	561,18	451,79	25,01	195,64	2069,09
F22	-1	H	H	400	o	13,73	N.Q.	1,86	104,37	N.Q.	0,31	0,54	0,15	150,97	25,13	0,35	340,87	224,77	21,92	124,70	1009,66
F23	0	H	H	400	X	137,39	10,66	24,93	753,93	1,13	2,41	4,03	6,12	1000,56	181,62	0,65	3780,24	1244,13	159,49	306,87	7614,14
F24	1	H	H	400	X	123,56	13,89	16,96	893,07	1,11	2,56	3,26	0,59	1180,93	180,22	0,96	1762,81	1553,78	158,78	621,22	6513,70

- Les concentrations sont toutes exprimées en µg de composé par g de fumée utilisée pour l'extraction

- N.Q. Composé dont la concentration est inférieure à sa limite de quantification

- Niveaux de paramètres : temps d'appui - 5 s / 25 s / 45 s ; essence de bois - Chêne / Hêtre ; humidité de bois - Sec / Humide ; distance - 80 / 400 cm ; apport d'air - sans (X) / avec (o)

Tableau 39 : Teneur des 24 fumées expérimentales en HAP dosés par GC-MS/MS

Point exp.	Temps d'appui	Essence de bois	Humidité du bois	Distance au piège	Apport en air	Phénanthrène	Anthracène	Fluoranthène	Pyrène	Benz[a]anthracène	Cyclopenta[c,d]pyrène	Chrysène	5-Méthylchrysène	Benzo[b,j,k]fluoranthène	Benzo[a]pyrène	Indénol[1,2,3-c,d]pyrène	Dibenz[a,h]anthracène	Benzo[g,h,i]perylène	Dibenzo[a,i]pyrène	Dibenzo[a,e]pyrène	Dibenzo[a,l]pyrène	Dibenzo[a,h]pyrène	TEQ
F01	-1	C	S	80	X	41,67	N.Q.	6,60	6,15	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	2,01	N.Q.	1,12	2,28	N.D.	N.Q.	2,00	N.Q.	11,37	0,119
F02	0	C	S	80	o	N.Q.	N.Q.	2,20	1,25	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1,07	0,48	0,38	N.Q.	1,07	N.Q.	N.Q.	N.Q.	9,17	0,093
F03	1	C	S	80	o	N.Q.	N.Q.	4,67	3,57	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1,37	N.Q.	N.Q.	1,07	N.Q.	6,85	N.Q.	N.Q.	0,190
F04	-1	H	S	80	o	9,66	N.Q.	2,61	2,68	0,12	0,33	0,30	0,33	0,51	0,33	0,15	0,16	0,18	N.Q.	0,11	N.Q.	N.Q.	0,043
F05	0	H	S	80	X	24,50	N.Q.	8,67	6,05	0,61	1,09	1,32	1,47	1,26	1,60	0,39	N.Q.	0,49	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,100
F06	1	H	S	80	X	N.Q.	N.Q.	7,33	4,78	0,57	1,51	1,02	N.Q.	0,73	0,34	0,26	N.Q.	0,64	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,045
F07	-1	C	S	400	o	50,06	N.Q.	6,56	8,00	N.Q.	N.Q.	N.Q.	3,49	2,60	N.Q.	1,58	3,76	N.D.	N.Q.	4,68	N.Q.	20,22	0,140
F08	0	C	S	400	X	N.Q.	N.Q.	1,19	1,59	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,28	N.Q.	N.Q.	N.D.	1,14	0,39	N.Q.	2,52	0,053
F09	1	C	S	400	X	N.Q.	N.Q.	4,93	3,32	N.Q.	N.Q.	N.Q.	2,05	N.Q.	N.Q.	0,72	N.Q.	1,48	N.Q.	5,32	N.Q.	22,17	0,018
F10	-1	H	S	400	X	N.Q.	N.Q.	18,72	17,05	1,02	2,02	2,32	N.Q.	2,08	2,87	0,47	N.Q.	1,09	N.Q.	0,82	N.Q.	N.Q.	0,046
F11	0	H	S	400	o	N.Q.	N.Q.	7,45	4,37	0,22	0,80	0,52	N.Q.	0,57	0,08	0,31	N.Q.	0,23	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,025
F12	1	H	S	400	o	N.Q.	N.Q.	8,87	5,79	0,46	0,95	0,85	N.Q.	0,69	1,45	0,38	N.Q.	0,74	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,139
F13	-1	C	H	80	o	N.Q.	N.Q.	1,64	1,97	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,30	0,14	N.Q.	N.Q.	0,08	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,013
F14	0	C	H	80	X	N.Q.	N.Q.	3,69	2,80	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,44	0,13	N.Q.	N.Q.	0,22	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,017
F15	1	C	H	80	X	N.Q.	N.Q.	3,28	2,44	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,54	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,18	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,010
F16	-1	H	H	80	X	N.Q.	N.Q.	9,36	7,54	0,39	1,26	0,64	N.Q.	1,11	1,26	0,33	N.Q.	0,77	N.Q.	0,27	N.Q.	N.Q.	0,047
F17	0	H	H	80	o	N.Q.	N.Q.	6,97	6,10	0,32	1,11	0,74	N.Q.	0,86	1,23	0,22	N.Q.	0,56	N.Q.	0,26	N.Q.	N.Q.	0,060
F18	1	H	H	80	o	N.Q.	N.Q.	6,93	5,68	0,30	1,27	0,80	N.Q.	0,86	0,92	0,23	N.Q.	0,52	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,069
F19	-1	C	H	400	X	N.Q.	N.Q.	4,08	3,70	N.Q.	0,45	N.Q.	N.Q.	0,36	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,17	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,006
F20	0	C	H	400	o	N.Q.	N.Q.	2,68	2,23	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,36	0,16	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,16	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,004
F21	1	C	H	400	o	N.Q.	N.Q.	2,79	2,43	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,28	0,16	N.Q.	0,07	N.Q.	0,11	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,004
F22	-1	H	H	400	o	N.Q.	N.Q.	2,06	2,41	0,22	0,26	0,20	0,26	0,30	0,32	0,07	N.Q.	0,27	N.Q.	0,08	N.Q.	N.Q.	0,037
F23	0	H	H	400	X	N.Q.	N.Q.	6,30	4,38	0,30	0,91	0,62	0,75	0,78	0,61	0,30	N.Q.	0,88	N.Q.	0,10	N.Q.	N.Q.	0,062
F24	1	H	H	400	X	N.Q.	N.Q.	8,00	6,54	0,48	1,42	0,66	0,95	1,02	0,96	0,33	N.Q.	0,50	N.Q.	0,31	N.Q.	N.Q.	0,048

- Les concentrations sont toutes données en µg de composé par g de fumée utilisée pour l'extraction ; les TEQs sont calculés selon la saisie AFSSA 2000-SA-0005 (TEF et HAP pris en compte)

- N.Q. Composé dont la concentration est inférieure à sa limite de quantification

- Niveaux de paramètres : temps d'appui - 5 s / 25 s / 45 s ; essence de bois - Chêne / Hêtre ; humidité de bois - Sec / Humide ; distance - 80 / 400 cm ; apport d'air - sans (X) / avec (o)

XI.2. Comparaison des résultats de teneurs en composés phénoliques obtenues en GC-MS-FID et GCxGC-TOFMS

Le meilleur pouvoir séparatif ainsi que la plus grande sensibilité de la GCxGC-TOFMS permettent l'étude d'un plus grand nombre de composés phénoliques que la GC-MS-FID. Le 2,4-diméthylphénol, 2,6-diméthylphénol, 3-éthylphénol et 3,5-diméthylphénol ne sont quantifiés dans les échantillons que grâce à la GCxGC-TOFMS.

Par ailleurs, les données relatives à l'o-crésol ne sont exploitables que dans le cas de la GCxGC-TOFMS, car il n'est effectivement quantifié que dans 10 échantillons sur 24 en GC-MS-FID à cause de ses trop faibles concentrations et de co-élutions non résolues (Tableau 37).

Pour les composés phénoliques effectivement quantifiés par les deux techniques, il n'est pas possible de déterminer laquelle des deux techniques est la plus fiable. La méthode normalement utilisée dans ce genre de cas consiste à enrichir une matrice exempte profondeur avec une quantité connue des standards. En effectuant le dosage par les deux techniques, il est alors possible de les comparer en calculant l'écart des résultats obtenus avec la valeur réelle connue.

En l'absence de standards marqués aux isotopes stables, appliquer cette démarche à notre dosage des composés phénolique supposerait pouvoir obtenir des fumées liquides d'origine pyrolytiques exemptes de composés phénoliques, ce qui n'est à notre connaissance pas possible. Nous ne pouvons donc que comparer relativement les résultats obtenus à l'aide de la GC et de la GCxGC.

Tableau 40 : Ecart relatif moyens entre les résultats de quantifications obtenues en GC et GCxGC

Analyte	Ecart (%)	Analyte	Ecart (%)
Phénol	24,75	4-vinylguaïacol	182,41
p-crésol	47,75	Syringol	27,86
m-crésol	14,71	Eugénol	23,65
Guaïacol	11,34	4-propylguaïacol	67,54
4-méthylguaïacol	63,05	(Z+E)isoeugénol	15,02
4-éthylguaïacol		Somme	

Le Tableau 40 présente une évaluation moyenne des écarts constatés entre les résultats des deux modes de quantification. Les écarts sont calculés par rapport à la moyenne des deux

valeurs, car considérer arbitrairement une des deux valeurs comme étant la « référence » revient à présumer *a priori* de leur efficacité relative :

$$\text{Ecart} = |\text{Conc.}_{\text{GCxGC}} - \text{Conc.}_{\text{GC}}| / ((\text{Conc.}_{\text{GCxGC}} + \text{Conc.}_{\text{GC}}) / 2)$$

Par analyse de la variance, il ressort que les résultats de quantification ne sont pas statistiquement significativement différents (au risque de 5%) pour le guaiacol, le 4-méthylguaiacol et le 4-propylguaiacol. Tous les autres composés phénoliques restants (ainsi que la somme globale) sont évalués à des niveaux plus faibles par la GCxGC.

Les différences de résultats de quantification constatées peuvent avoir deux origines. D'une part, elles peuvent être en partie dues à l'erreur expérimentale induite par l'étape de dilution des extraits réalisée avant injection des extraits en GCxGC. D'autre part, ceci peut s'expliquer par la séparation additionnelle de la GCxGC (élution secondaire mais aussi déconvolution de pic). Les pics intégrés sont mieux isolés du bruit de fond et des éventuels pics parasites. Ainsi, le signal correspondant à un analyte est moins augmenté par les pics minoritaires de composés co-élus et indétectables en GC.

C'est pour le 4-vinylguaiacol que les différences sont les plus importantes, avec des concentrations déterminées par GCxGC en moyenne 20 fois plus basses que celles obtenues en GC-FID. Cette différence se comprend facilement en regard des pics minoritaires de composés non-identifié qui en sont séparés grâce à la GCxGC.

La sensibilité plus élevée de la GCxGC permet de détecter un plus grand nombre de composés phénoliques dans les échantillons.

Nous ne pouvons pas déterminer laquelle des deux techniques est la plus fiable lors du dosage des composés phénoliques.

XI.3. Analyses comparées des résultats de GC et GCxGC

Les résultats de quantification des composés phénoliques ont été traités par analyse de la variance afin d'identifier les facteurs expérimentaux qui influencent significativement les teneurs en composés phénoliques des fumées. Des analyses de la variance ont été réalisées séparément sur les données obtenues par GC et GCxGC.

Il n'est en effet pas possible de simplement « cumuler » les données obtenues par les deux techniques et de réaliser l'analyse de variance sur l'ensemble des 48 valeurs expérimentales

(24 points expérimentaux en GC et 24 points expérimentaux en GCxGC). Le fait que la GCxGC conduise globalement à des teneurs calculées plus basse n'est pas le principal obstacle. Cette différence peut être prise en considération comme un effet de block en intégrant un paramètre supplémentaire à l'analyse de variance (facteur « technique chromatographique employée » discret à deux modalités : « GCxGC » et « GC »). Doubler la quantité de données utilisées permettrait de compenser le fait d'avoir un effet supplémentaire à estimer, tout en permettant de mieux estimer les effets des paramètres expérimentaux.

Cependant, les quantifications obtenues avec les deux techniques ont été réalisées sur les mêmes extraits aromatiques. Procéder de cette façon serait donc contraire aux hypothèses de l'analyse de la variance, puisque les échantillons ne sont alors plus indépendants deux à deux. En effet, l'écart de deux mesures réalisées à partir du même extrait ne prend pas en compte la variabilité de l'expérience issue des étapes précédentes la quantification par chromatographie (génération, piégeage et récupération de la fumée ; extraction des composés volatiles ; concentration de l'extrait). Il en résulterait une sous-estimation de la variabilité réelle de l'expérience (estimée par la somme des carrés résiduelle) par rapport à la variabilité induite par l'effet de chaque facteur (somme des carrés liée à chaque facteur), et l'identification « artificielle » d'effets significatifs.

En premier lieu, il a été important de vérifier qu'il n'existe pas de contradiction entre les résultats obtenus avec la GCxGC et la GC. Les effets identifiés comme significatifs par analyse de la variance (au risque de se tromper de 5%) à la fois grâce aux données de GC et de GCxGC sont effectivement du même type.

Un exemple d'effet principal et d'interaction est présenté en Figure 72: l'effet principal ainsi que l'interaction de facteur sont bien positifs dans les deux cas. On retrouve également bien le fait que la GCxGC conduit à une estimation globalement plus basse des concentrations en composés phénoliques.

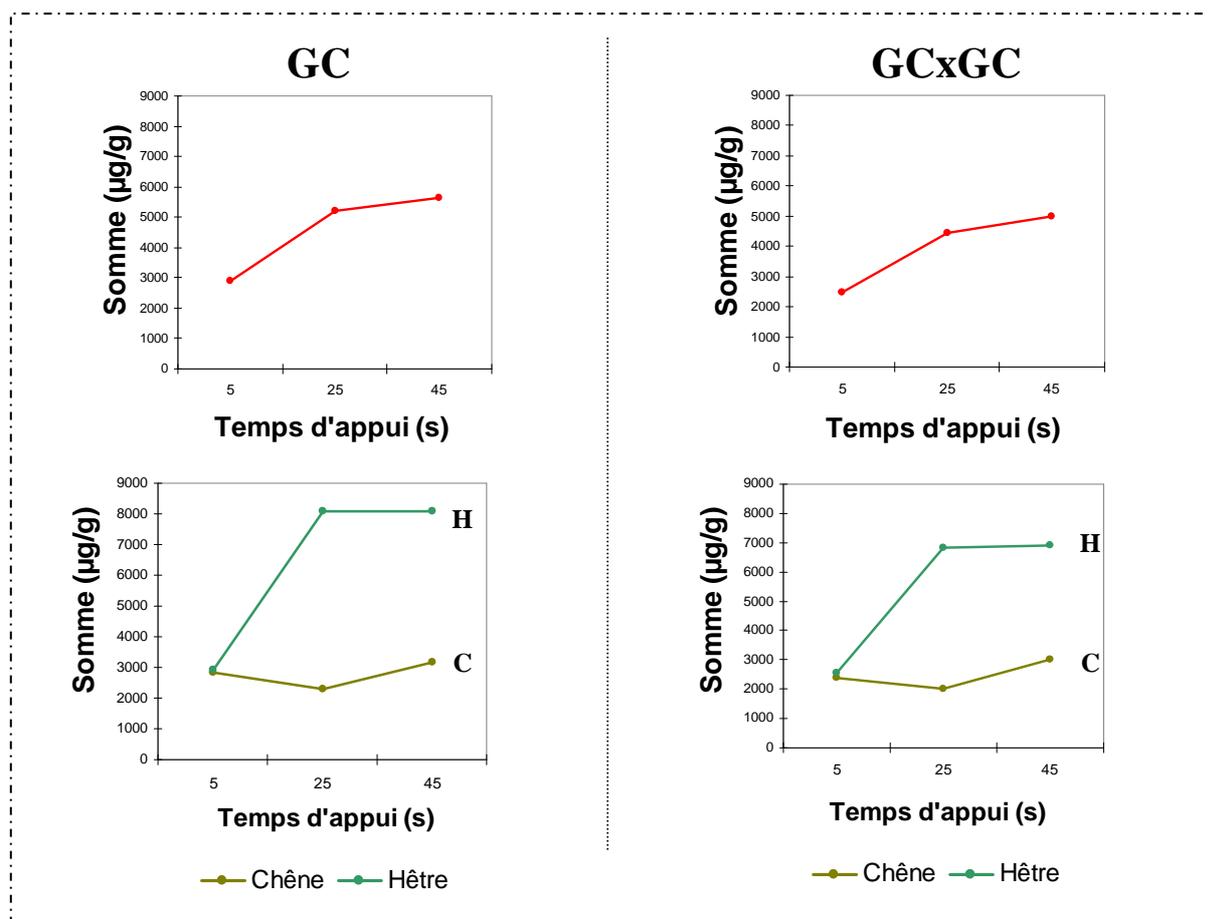


Figure 72 : Comparaison d'effets de paramètres déterminés par GC et GCxGC, représentation sous forme de graphiques des moyennes

Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'un facteur (ou une interaction de facteurs) qui influence significativement la concentration de plusieurs composés phénoliques agira toujours dans le même sens. Par exemple, tous les composés phénoliques étant influencés par l'humidité du bois utilisé sont dosés en plus faible quantité dans des fumées issues de bois humide (Figure 73).

Ainsi, il n'y a pas de contradiction entre les conclusions apportées par les deux techniques analytiques, ni de différence de comportement des différents composés phénoliques. Ceci nous permet en partie de valider notre méthode d'analyse puisque de nombreux auteurs ont reporté jusqu'à maintenant que les différents composés phénoliques des fumées variaient toujours conjointement dans des expériences de ce type.

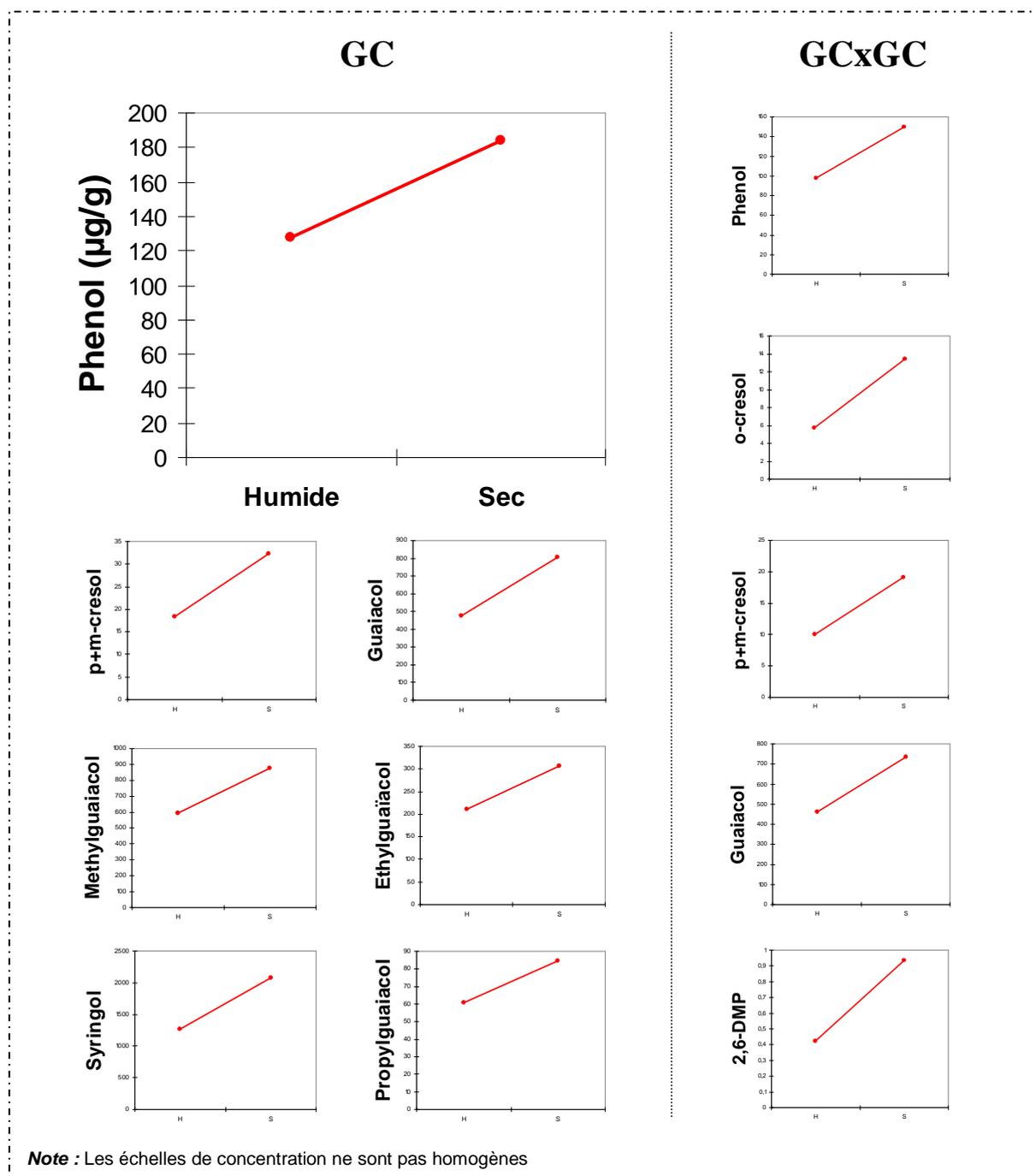


Figure 73 : Comparaison d'effets de paramètres déterminés pour plusieurs analytes par GC et GCxGC, représentation sous forme de graphiques des moyennes

La seule distinction effective entre les résultats d'analyses réalisées par GC et GCxGC concerne en fait le nombre des effets de paramètres identifiés comme statistiquement significatifs. En prenant un risque de se tromper de 5%, 29 effets significatifs sont identifiés par GC-FID-MS alors que la GCxGC-TOFMS ne permet d'en identifier que 24 (en ne considérant que les analytes détectés grâce aux deux méthodes). Cette différence de résultats

est due à une augmentation globale des niveaux de significativité associé aux différentes analyses de la variance réalisées.

L'ANOVA est utilisée comme un outil permettant de comparer sur un ensemble d'expériences le « signal » (variation de teneurs en analytes liée à la variation des paramètres expérimentaux) au « bruit » (variabilité du dosage chromatographique). La perte de significativité constatée en passant de la GC à la GCxGC peut donc s'interpréter de deux façons :

- ♦ une diminution du « signal » : la GCxGC isole mieux le signal chromatographique correspondant aux composés-cibles des variations de signal liées aux composés co-élus ou participant au bruit de fond ;

- ♦ une augmentation du « bruit » : la GCxGC induit plus de variabilité dans la quantification des composés-cibles dans les extraits injectés.

Dans le cas présent, la deuxième hypothèse semble être à privilégier. En effet, les extractions ayant été réalisées en double sur chaque échantillon de fumée, nous pouvons apprécier la répétabilité des deux méthodes de dosage à travers ces répétitions. Il en ressort que sur l'ensemble des analytes et des échantillons, les écarts de dosage sont plus importants en GCxGC

Cette variabilité du dosage chromatographique peut être imputée soit à l'acquisition du signal soit au traitement de celui-ci lors de l'intégration des pics chromatographique. Ainsi, alors que les tracés chromatographiques obtenus en GC-FID sont parfaitement superposables, cela semble parfois moins évident en GCxGC. Il ne s'agit cependant que d'une simple appréciation visuelle car les écarts de signaux ne sont quantifiables qu'une fois qu'ils ont été traités à l'aide des logiciels.

Or, le système d'intégration du signal est totalement différent pour les deux techniques. Alors qu'il est très facile de contrôler et de réaliser directement l'intégration d'un signal monodimensionnel, le traitement des données de GCxGC-TOF impose l'utilisation de l'intégrateur du logiciel. L'expérimentateur possède donc moins de maîtrise sur la façon dont le signal brut est utilisé, d'autant moins que l'intégration des pics est réalisée sur plusieurs modulations d'un même pic, rendant plus complexe le contrôle ultérieur des intégrations réalisées par le logiciel (que ce soit en terme d'intégration des pics modulés ou de regroupement des modulation appartenant à un même pic).

Il est donc probable que la plus grande variabilité expérimentale du dosage réalisé en GCxGC provienne du traitement du signal brut.

Il est important de souligner également que cette même étape de traitement des données est pour d'autres raisons une des limitations de l'emploi de cette technique : elle nécessite beaucoup plus de temps. L'utilisation pratique du chromatographe bidimensionnel impose par ailleurs en elle-même de nombreuses contraintes de coût supplémentaires tant en termes de consommation de fluides que de maintenance (quotidienne et périodique).

Il semble d'autant plus discutable dans notre cas de justifier l'utilisation de cet appareil pour les expérimentations réalisées ultérieurement et qui nécessitent un grand nombre d'analyses chromatographiques.

Nous avons décidé d'utiliser la chromatographie monodimensionnelle pour l'analyse des teneurs en composés phénoliques dans les fumées car les résultats obtenus après traitement du signal chromatographique semblent être plus fiables.

Par ailleurs, l'apport ici limité de la GCxGC ne semble pas justifier le coût supplémentaire de son utilisation pour ce type d'analyses.

XI.4. Effets individuels des paramètres opérationnels sur les teneurs en composés phénoliques des fumées

Pour tenter d'appréhender le plus concrètement possible les résultats, nous avons dans un premier temps étudié uniquement les effets principaux facteur par facteur pour l'ensemble des composés phénoliques. Ceux-ci représentent globalement la façon donc chaque condition opératoire détermine la composition de la fumée analysée. Les résultats des analyses de la variance réalisées sur l'ensemble des composés phénoliques sont synthétisés facteur par facteur du Tableau 41 au Tableau 44. Seuls ceux qui concernent la distance parcourue par la fumée entre le générateur et le piège ne sont pas reportés, car aucun effet direct de ce facteur n'a été identifié comme significatif au seuil de 5%.

Tableau 41 : Résumé de l'étude de l'effet du temps d'appui dans le générateur de fumée sur les teneurs en composés phénoliques des fumées

Graphique des moyennes de concentrations pour le phénol	Analyte	Niveau de significativité (%)	Valeur absolue de l'effet 5-45 ($\mu\text{g/g}$)
	Phénol	0,000	93,09
	p-crésol+m-crésol	0,012	19,45
	Guaïacol	0,005	510,38
	4-méthylguaïacol	0,002	566,77
	4-éthylguaïacol	0,004	163,17
	<i>4-vinylguaïacol</i>	<i>0,097</i>	<i>7,13</i>
	Syringol	0,016	1177,56
	<i>Eugénol</i>	<i>0,386</i>	<i>152,44</i>
	4-propylguaïacol	0,006	47,54
	<i>(Z+E)isoeugénol</i>	<i>0,964</i>	<i>17,74</i>
	Somme	0,011	2750,74

Note : seul l'effet 5-45 est reporté, car les tests des étendues multiple (Fisher LSD, seuil de 5%) réalisés pour tous les analytes montrent que les contrastes 25-45 ne sont jamais significatifs.

Tableau 42 : Résumé de l'étude de l'effet de l'essence de bois utilisée sur les teneurs en composés phénoliques des fumées

Graphique des moyennes de concentrations pour le phénol	Analyte	Niveau de significativité (%)	Valeur absolue de l'effet ($\mu\text{g/g}$)
	Phénol	0,003	34,21
	p-crésol+m-crésol	0,003	26,33
	Guaïacol	0,002	458,91
	4-méthylguaïacol	0,000	661,64
	4-éthylguaïacol	0,004	105,22
	<i>4-vinylguaïacol</i>	<i>0,276</i>	<i>2,54</i>
	Syringol	0,002	1495,03
	Eugénol	0,008	518,05
	4-propylguaïacol	0,001	71,37
	(Z+E)isoeugénol	0,028	227,72
	Somme	0,001	3612,22

Tableau 43 : Résumé de l'étude de l'effet de l'humidité du bois sur les teneurs en composés phénoliques des fumées

Graphique des moyennes de concentrations pour le phénol	Analyte	Niveau de significativité (%)	Valeur absolue de l'effet ($\mu\text{g/g}$)
	Phénol	0,001	55,96
	p-crésol+m-crésol	0,008	13,79
	Guaïacol	0,005	328,15
	4-méthylguaïacol	0,005	282,30
	4-éthylguaïacol	0,005	96,12
	<i>4-vinylguaïacol</i>	<i>0,443</i>	<i>1,69</i>
	Syringol	0,014	809,58
	<i>Eugénol</i>	<i>0,196</i>	<i>136,16</i>
	4-propylguaïacol	0,012	23,79
	<i>(Z+E)isoeugénol</i>	<i>0,291</i>	<i>72,49</i>
	Somme	0,021	1401,85

Tableau 44 : Résumé de l'étude de l'effet de l'apport d'air comprimé au niveau de la zone de pyrolyse sur les teneurs en composés phénoliques des fumées

Graphique des moyennes de concentrations pour le phénol	Analyte	Niveau de significativité (%)	Valeur absolue de l'effet ($\mu\text{g/g}$)
	Phénol	0,005	27,70
	<i>p-crésol+m-crésol</i>	0,062	1,98
	<i>Guaiacol</i>	0,124	93,06
	<i>4-méthylguaiacol</i>	0,115	85,02
	<i>4-éthylguaiacol</i>	0,432	11,92
	<i>4-vinylguaiacol</i>	0,573	1,21
	<i>Syringol</i>	0,579	96,05
	<i>Eugénol</i>	0,158	153,79
	<i>4-propylguaiacol</i>	0,085	11,13
	<i>(Z+E)isoeugénol</i>	0,613	31,92
	<i>Somme</i>	0,203	511,48

Comme nous l'avons déjà vu par ailleurs, les différents composés phénoliques sont influencés de la même manière par les différents paramètres. L'ensemble de ces molécules étant issues des constituants du bois selon des chemins réactionnels comparables, cela se comprend parfaitement bien. La description détaillée de tous ces effets serait superflue, mais certains points qui ressortent comme particulièrement intéressants doivent être soulignés.

L'effet positif de la température de pyrolyse (à travers le temps d'appui de la bûche) était attendu dans la gamme de températures mesurée sur le pilote ($\approx 350\text{ }^{\circ}\text{C} / 400\text{ }^{\circ}\text{C} / 450\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Par contre, l'absence de différence entre les fumées produites avec 25 et 45 secondes d'appui ne semble pas normale au premier abord. Jusqu'à une température de pyrolyse d'environ $700\text{ }^{\circ}\text{C}$, la production de composés phénoliques suit une augmentation linéaire (Maga, J.A., 1987). Ainsi, comme le laissait penser l'absence de différence de température de fumée émise (voir IX.2, p.160), il est probable que le passage de 25 à 45 secondes d'appui n'entraîne pas une augmentation de température aussi importante que celle estimée par les relevés instrumentaux (sonde de température placée à l'interface bûche / rotor).

Nous retrouvons cependant bien les recommandations généralement admises d'une augmentation de la température de pyrolyse pour améliorer la qualité de la fumée par augmentation de sa teneur en composés phénolique (Maga, J.A., 1987). L'absence de différence effective entre 25 et 45 secondes peut se révéler technologiquement intéressant. Cela ouvre la perspective de pouvoir choisir par exemple le réglage le plus rentable d'un point de vue énergétique sans entraîner une diminution de la qualité « phénolique » de la fumée produite.

En dépit de l'importance particulière du temps d'appui, l'essence de bois reste le paramètre le plus déterminant, avec un plus grand nombre de composés phénoliques influencés directement, et des variations de teneurs plus importantes.

Le bois de hêtre ayant déjà été reporté comme menant à des concentrations de composés phénoliques plus importants, ce résultat est parfaitement en accord avec la littérature (Maga, J.A., 1987).

Nous pouvons aussi constater que le seul composé phénolique étudié à n'être influencé par aucun des paramètres expérimentaux est le 4-vinylguaïacol. Ce résultat pourrait sembler surprenant à première vue, puisque sa production suit globalement les mêmes lois que celle des autres dérivés du phénol. Il faut cependant prendre en considération que contrairement aux autres composés phénoliques, notre méthode d'étude n'est pas parfaitement adaptée au 4-vinylguaïacol puisque nous avons vu que le rinçage de piège à la soude ne lui était pas favorable. Il est donc possible qu'il subisse les mêmes effets lors de la production de la fumée, mais que ceux-ci ne soient pas identifiables à cause des trop faibles quantités récupérées dans les fumées.

En plus des concentrations en composés phénoliques, deux ratios de concentrations ont été étudiés : [guaïacol] / [phénol] (G/P) et [guaïacol] / [syringol] (G/S).

L'évolution de ces ratios en fonction de chaque paramètre est facilement prédite grâce aux sens et aux intensités des effets respectifs sur le phénol, le guaïacol et le syringol. Par exemple, comme la concentration en guaïacol augment plus rapidement (effets de paramètres plus intense pour le guaïacol que pour le phénol) que celle du phénol selon tous les facteurs expérimentaux, le ratio G/P suit la même évolution que celle des deux composés. Cependant, la significativité de ces variations a tout de même dû être testée par analyse de la variance (Tableau 45).

Ces facteurs représentent un intérêt tout particulier puisqu'ils sont sensés avant tout être déterminés par l'essence de bois, et plus particulièrement par le type de celui-ci (bois dur / bois tendre). Les bois utilisés étant tous les deux des bois durs, nous aurions pu nous attendre à ce que l'essence de bois n'ait pas d'effet significatif sur ces ratios. En fait, nous constatons une variabilité significative, bien que faible, de ces ratios en fonction des paramètres expérimentaux.

Tableau 45 : Evolution des ratios G/P et G/S selon les variations de paramètres de génération

		G/P	G/S
Moyenne générale		3,8	0,31
Temps d'appui	5	3,8*	0,33
	25		0,42*
	45		
Essence de bois	Chêne	2,7	0,44
	Hêtre	4,8	0,33
Humidité du bois	Sec	4,2	0,31*
	Humide	3,5	

* moyennes sur différentes modalités non-significativement différentes

Ces variations peuvent se révéler intéressantes, puisque ces ratios peuvent trouver une utilité en tant que marqueur des conditions de production de la fumée. Comme ces deux ratios ne varient pas de manière identique selon les différentes conditions expérimentales (par exemple G/P n'est pas dépendant du temps d'appui, et donc pas de la température de pyrolyse), ils pourraient être employés conjointement pour extrapoler les conditions de génération de la fumée à partir de sa teneur en guaiacol, syringol et phénol.

Cette première analyse des résultats montre que la teneur en composés phénoliques des fumées produites est globalement maximisée de trois façons :

- ♦ *augmentation du temps d'appui de la bûche de 5 à 25 secondes*
- ♦ *utilisation du bois de hêtre*
- ♦ *utilisation de bois sec*

XI.5. Interactions entres paramètres opérationnels

Bien que les effets principaux décrits apportent des informations précieuses pour la caractérisation du générateur de fumée utilisé, notre plan d'expérience a été conçu pour pouvoir prendre en considération également les interactions de niveau 2 (interaction de deux facteurs). Les deux principales interactions (en terme de nombre de composés concernés et d'intensité) statistiquement significatives identifiées sont présentées à la Figure 74 à travers l'exemple représentatif du 4-méthylguaiacol.

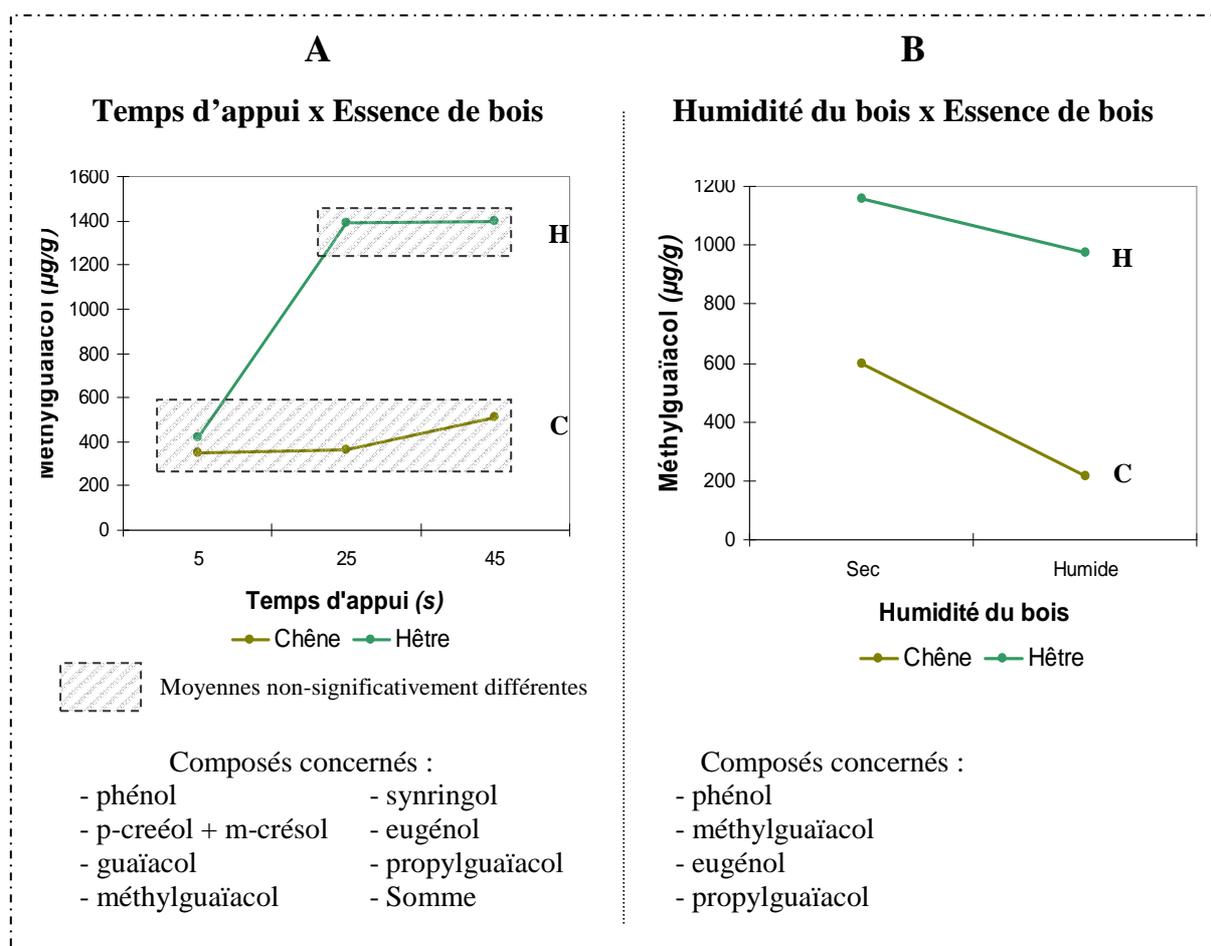


Figure 74 : Graphiques des moyennes représentant les deux principales interactions de facteurs significativement influentes sur les teneurs en composés phénoliques

Il s'avère en fait que l'effet du temps d'appui n'est pas déterminé dans l'absolu : il dépend totalement de l'essence de bois utilisée. Pour le bois de hêtre, on retrouve l'effet identifié auparavant : l'augmentation du temps d'appui de 5 à 25 ou 45 entraîne une augmentation des teneurs en composés phénoliques. Par contre, le bois de chêne a produit des fumées ayant des teneurs en composés phénoliques identiques quel que soit le temps d'appui utilisé.

Une explication très probable à cette différence de réaction des deux bois au temps de friction est une différence de température de pyrolyse effective. Comme semblaient déjà l'indiquer le même type de comportement pour les températures de fumées émises (voir IX.2, p.160), le bois de chêne étant moins dense, il s'échaufferait en fait moins que le hêtre pour des temps de friction comparables.

Qu'elle soit ou non liée à la densité du bois et à la température de pyrolyse effective, cette différence d'effet est déterminante. Elle nous montre clairement qu'augmenter le temps d'appui n'est pas en soit suffisant pour maximiser la production des composés phénoliques, encore faut-il utiliser un bois adapté, le hêtre dans notre cas.

L'interaction entre l'essence de bois et l'humidité semble moins déterminante. Elle ne montre pas d'effet de différence de type d'effet, mais une simple potentialisation de l'effet de l'humidité par l'essence de bois. Globalement, les bois humides donnent effectivement moins de composés phénoliques que les bois secs, conformément à ce qu'indiquait l'effet principal de l'humidité. Cependant, la différence est beaucoup plus importante pour le bois de chêne que pour le bois de hêtre.

Cette interaction est plus difficilement interprétable puisqu'elle ne peut pas être reliée aux températures de fumée émises. Elle n'est pas ailleurs expliquée par les différences de teneurs en eau existant entre les bûches « sèches » et « humides » des deux essences de bois : c'est pour le bois de chêne qu'il y a le moins d'écart le bois « sec » et le bois « humide » alors que c'est pour lui qu'il y a le plus d'effet de l'humidité.

L'allongement du temps d'appui ne semble être pertinent pour augmenter la formation des composés phénoliques que dans le cadre de l'utilisation de bois de hêtre.

XI.6. Analyse en composantes principales des teneurs en composés phénoliques

Afin de tenter d'expliquer de manière plus globale les résultats obtenus précédemment, une analyse en composantes principales a été réalisée. La somme des concentrations ainsi que les ratios G/P et G/S n'ont pas été utilisés en tant que variables actives puisqu'ils ont été construits à partir des données brutes. Ces trois résultats ont été ajoutés à l'analyse par projection sur les composantes principales obtenues, à titre illustratif. Comme l'analyse ne prend en compte que des variables homogènes (elles sont toutes des valeurs de concentrations obtenues à partir de la même méthode de quantification), il n'était pas nécessaire de la normaliser pour qu'elle soit valide.

Cependant, l'effet organoleptique et technologique de chaque composé phénolique n'est pas fonction que de sa concentration, il dépend aussi de ses propriétés intrinsèques (pouvoir aromatisant, antioxydant, etc.). C'est particulièrement vrai du point de vue aromatique, où les faibles variations d'un composé peu concentré peuvent être plus déterminantes que la forte amplitude d'un composé majoritaire. Ainsi, afin de ne pas privilégier la représentation des très fortes variations des composés les plus abondants, l'analyse en composante principale a

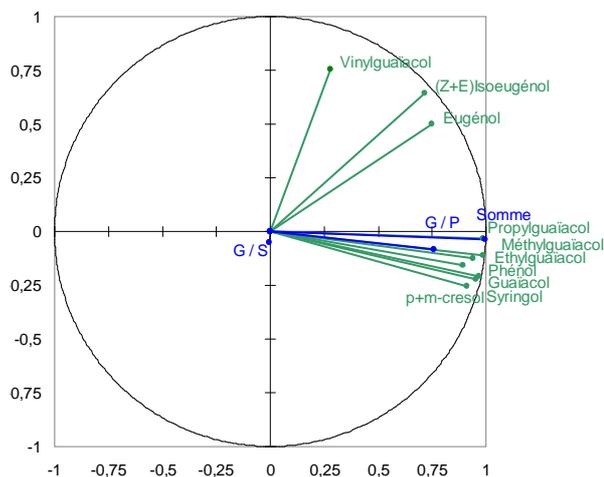
été réalisée sur des données standardisées. Toutes les variances sont ramenées à 1 en divisant chaque concentration d'un composé par l'écart-type calculé sur l'ensemble des 24 fumées. Il faut tout de même garder à l'esprit que ce choix a un effet non-négligeable sur les résultats : en ramenant les variances de toutes les variables au même niveau, on diminue l'efficacité de la procédure, dans le sens où les inerties de chaque composante principale seront plus réduite. Concrètement, l'utilisation de l'ACP standardisée imposera l'utilisation d'un plus grand nombre de composantes principales pour restituer assez d'information pour que celle-ci soit pertinente et exploitable (par rapport à ce qui serait réalisable avec la même ACP réalisée sur les données non-normée).

Le Tableau 46 présente les caractéristiques des deux premières composantes principales. Les composantes suivantes (3 à 10) ne représentent que peu d'inertie (moins de 7% par composantes à partir de la troisième) et ne constituent pas une amélioration de la représentation graphique offerte par le couple F1-F2, elles n'ont donc pas été retenues.

Tableau 46 : Caractéristiques des deux premières composantes principales de l'analyse réalisée sur les variables expérimentales

Composantes principales	F1	F2
Inertie propre (%)	74,59	14,49
Inertie cumulée (%)	74,59	89,08
Coefficients de corrélation entre variables actives et composantes principales		
Phénol	0,895	-0,157
p+m-crésol	0,912	-0,255
Guaïacol	0,968	-0,210
4-méthylguaïacol	0,985	-0,111
4-éthylguaïacol	0,941	-0,125
4-vinylguaïacol	0,280	0,755
Syringol	0,956	-0,221
Eugénol	0,748	0,501
4-propylguaïacol	0,985	-0,033
(Z+E)isoeugénol	0,716	0,645
Coefficients de corrélation entre variables illustratives et composantes principales		
Somme	0,995	-0,039
G / P	0,757	-0,084
G / S	-0,005	-0,049

Cercle des corrélations F1 – F2



Le poids de la composante F1, qui avec presque 75% d'inertie représente la majorité de la dispersion totale des données. Ce sont donc les positions relatives des individus et des variables selon cet axe qui seront représentatives. Ceci s'explique par une très forte corrélation de la plupart des variables de concentrations entre elles. En dépit de ce que la

représentation graphique (cercle des corrélations) semble montrer, même l'eugénol et les isomères d'isoeugénol sont fortement corrélés avec la composante F1, et l'ensemble des composés phénoliques, 4-vinylguaïacol exclu. Le 4-vinylguaïacol est le seul composé considéré qui définit principalement la composante F2. Mais comme il a été vu auparavant que sa concentration n'est influencée par aucun des facteurs expérimentaux, cela revient à dire que F2 n'est pas non plus vraiment discriminante, en particulier comparée à F1.

Considérant la forte corrélation des concentrations à la composante F1, il est normal que la somme le soit aussi très fortement.

Des deux ratios calculés, seul le ratio G / P présente une réelle corrélation avec une des composantes. Le ratio G / S constituerait une valeur permettant de qualifier l'ensemble des expériences alors que le ratio G / P permettrait de les discriminer les unes par rapport aux autres. Comme celui-ci varie dans le même sens que les concentrations en phénol et en guaïacol, on le retrouve également fortement corrélé positivement par la composante F1.

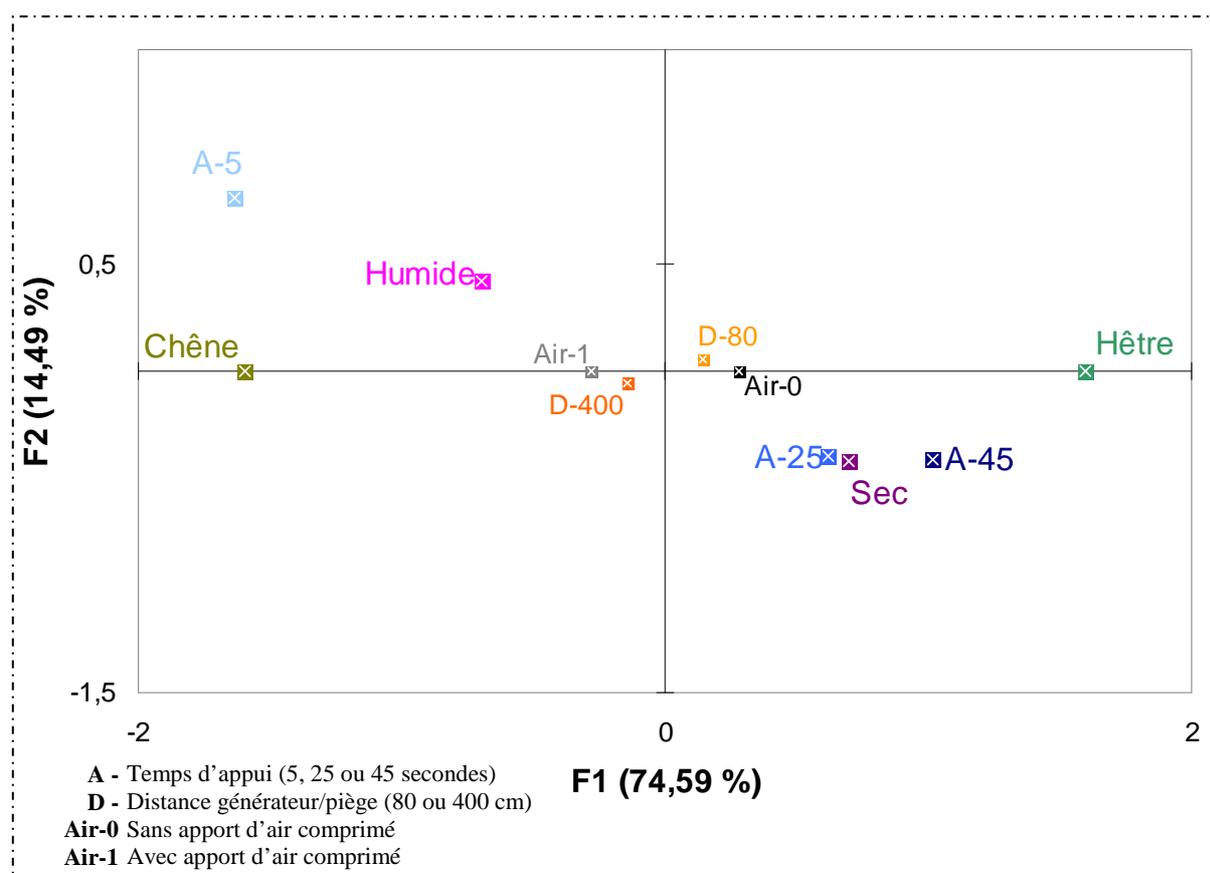


Figure 75 : Projection des barycentres de classes de fumées dans le plan F1-F2 (données de teneurs en composés phénoliques)

La Figure 75 synthétise bien ce qui avait pu être déterminé pour les effets individuels des différents paramètres. Sont situés sur la droite du plan les conditions opératoires qui maximisent les teneurs en composés phénoliques étudiés dans la fumée, avec par ordre d'importance : l'utilisation de bois de hêtre, d'un long temps d'appui de bûche et d'un bois sec. Cet ordre d'importance se retrouve bien en identifiant les fumées selon leurs conditions de production. Celles-ci sont mieux discriminées selon le temps d'appui, mais surtout par l'essence de bois, comme on peut le voir à la Figure 76 où les données ont été représentées sur une seule dimension pour plus de lisibilité.

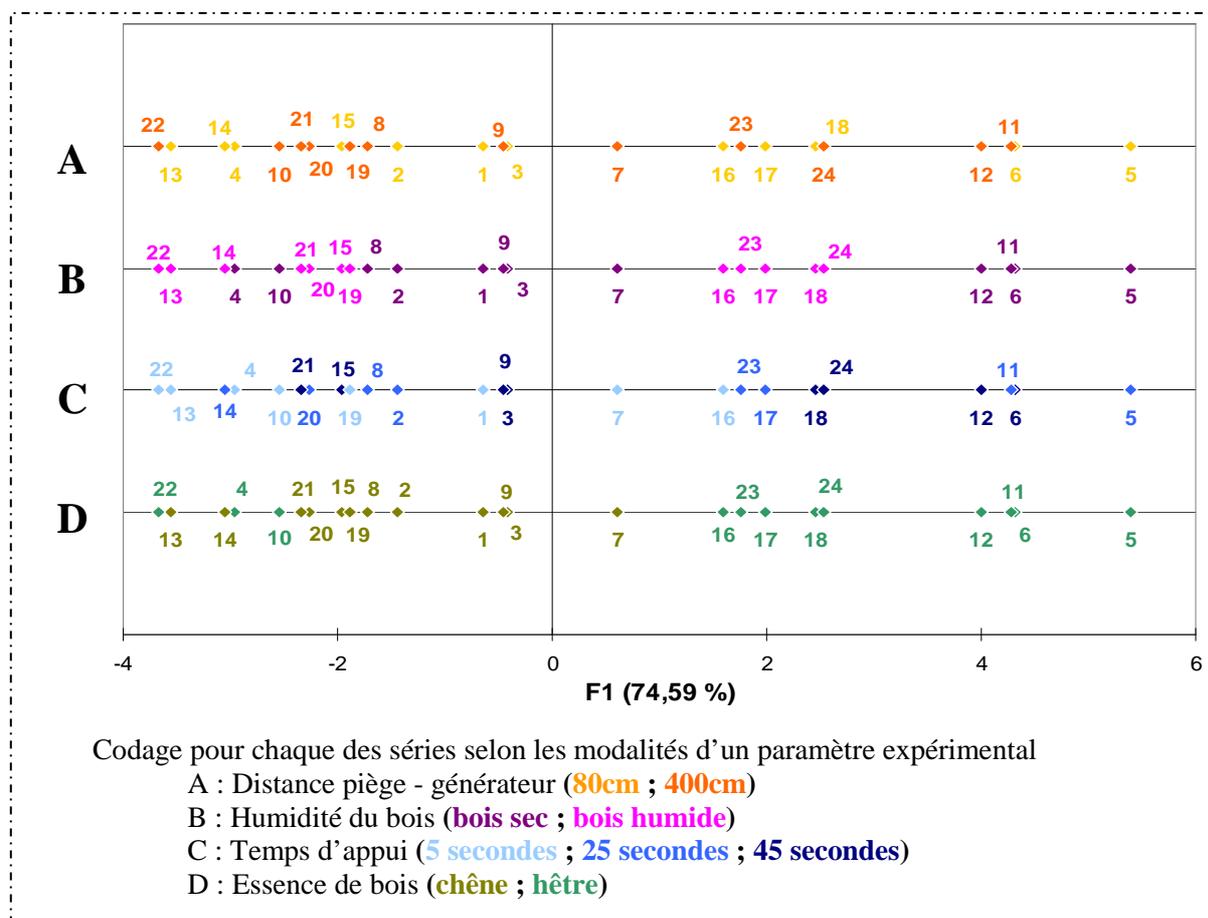


Figure 76 : Projection des 24 fumées sur la composante F1 (données de teneurs en composés phénoliques)

La présence des fumées 4, 10 et 22 obtenues avec du bois de hêtre dans le groupe des fumées de bois de chêne (Figure 76-D) s'explique par les interactions existant entre l'essence de bois et le temps d'appui. En effet, en utilisant du bois de hêtre avec un temps d'appui de 5 secondes, les teneurs en composés phénoliques correspondent à celles obtenues pour n'importe quel temps d'appui pour du bois de chêne (Figure 74.). C'est ce qui explique aussi que parmi les autres fumées de bois de hêtre, la fumée 16 (la seule autre à avoir été également

produite à la fois avec du hêtre et 5 secondes d'appui) soit la plus proche des fumées de bois de chêne. Par ailleurs, on peut constater l'effet de l'humidité de bois par exemple avec les fumées 5, 6, 11, 12 d'une part et 17, 18, 23, 24 : l'apport en air mis à part (car non-influent), ces deux groupes de fumées ne diffèrent que par l'humidité du bois utilisé. On retrouve bien les fumées issues de bois sec (5, 6, 11 et 12) plus à droite de la composante F1 (Figure 76-B).

Ainsi, pour ce qui concerne les composés phénoliques de la fumée uniquement, nous avons pu déterminer que le facteur le plus déterminant reste l'essence de bois utilisée. Non seulement son effet direct est le plus important (qualitativement et quantitativement) de tous, mais en plus elle agit indirectement comme potentiateur des autres paramètres par ailleurs influents que sont le temps d'appui et l'humidité de bois.

Comme indiqué par l'étude directe des effets de paramètres, l'essence de bois est le paramètre le plus discriminant pour la fraction phénolique des fumées produites expérimentalement. Le temps d'appui et l'humidité du bois sont déterminants dans une moindre mesure.

XI.7. Effets individuels des paramètres opérationnels sur les teneurs en HAP des fumées

Tableau 47 : Résumé de l'étude de l'effet du temps d'appui sur les teneurs en HAP des fumées

Graphique des moyennes de concentrations pour le Pyrène	Analyte	Niveau de significativité (%)	Valeur absolue de l'effet 5-45 ($\mu\text{g/g}$)
	<i>Fluoranthène</i>	0,186	1,56
	Pyrène	0,042	2,59
	<i>Benz[a]anthracène</i>	0,497	0,04
	<i>Cyclopenta[c,d]pyrène</i>	0,091	0,15
	<i>Chrysène</i>	0,877	0,03
	Benzo[b,j,k]fluoranthène	0,024	0,66
	<i>Benzo[a]pyrène</i>	0,965	0,08
	<i>Indénof[1,2,3-c,d]pyrène</i>	0,198	0,26
	<i>Benzo[g,h,i]perylène</i>	0,350	0,34
	<i>TEQ</i>	0,795	0,01

Note : seul l'effet 5-45 est reporté, car les tests des étendues multiple (Fisher LSD, seuil de 5%) réalisés pour tous les analytes montrent que les contrastes 25-45 ne sont jamais significatifs.

Tableau 48 : Résumé de l'étude de l'effet de l'essence de bois sur les teneurs en HAP des fumées

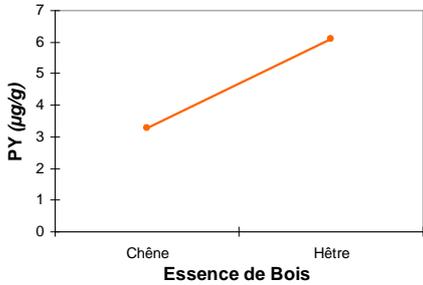
Graphique des moyennes de concentrations pour le Pyrène	Analyte	Niveau de significativité (%)	Valeur absolue de l'effet ($\mu\text{g/g}$)
	Fluoranthène	0,004	4,08
	Pyrène	0,009	2,83
	Benz[a]anthracène	0,001	0,42
	Cyclopenta[c;d]pyrène	0,000	1,04
	Chrysène	0,001	0,83
	<i>Benzo[b/j/k]fluoranthène</i>	<i>0,077</i>	<i>0,26</i>
	<i>Benzo[a]pyrène</i>	<i>0,055</i>	<i>0,80</i>
	<i>Indéno[1,2,3-c,d]pyrène</i>	<i>0,722</i>	<i>0,04</i>
	<i>Benzo[g,h,i]perylène</i>	<i>0,310</i>	<i>0,19</i>
	TEQ	0,790	0,00

Tableau 49 : Résumé de l'étude de l'effet de l'humidité du bois sur les teneurs en HAP des fumées

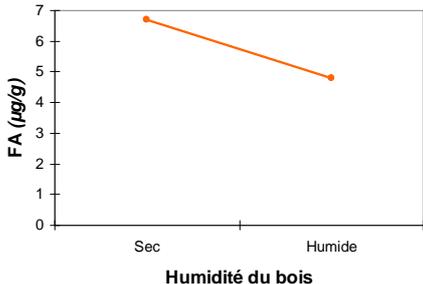
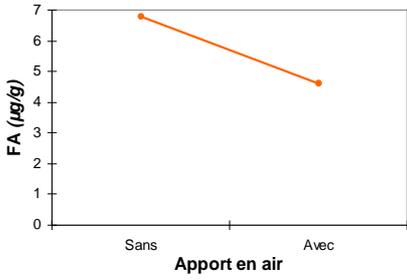
Graphique des moyennes de concentrations pour le Fluoranthène	Analyte	Niveau de significativité (%)	Valeur absolue de l'effet ($\mu\text{g/g}$)
	Fluoranthène	0,038	1,83
	<i>Pyrène</i>	<i>0,062</i>	<i>1,36</i>
	<i>Benz[a]anthracène</i>	<i>0,066</i>	<i>0,08</i>
	<i>Cyclopenta[c;d]pyrène</i>	<i>0,992</i>	<i>0,00</i>
	Chrysène	0,024	0,22
	Benzo[b/j/k]fluoranthène	0,030	0,38
	<i>Benzo[a]pyrène</i>	<i>0,379</i>	<i>0,27</i>
	Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	0,034	0,35
	<i>Benzo[g,h,i]perylène</i>	<i>0,270</i>	<i>0,21</i>
	TEQ	0,046	0,05

Tableau 50 : Résumé de l'étude de l'effet de l'apport d'air comprimé au niveau de la zone de pyrolyse sur les teneurs en HAP des fumées

Graphique des moyennes de concentrations pour le Fluoranthène	Analyte	Niveau de significativité (%)	Valeur absolue de l'effet ($\mu\text{g/g}$)
	Fluoranthène	0,023	2,23
	Pyrène	0,038	1,66
	Benz[a]anthracène	0,016	0,14
	Cyclopenta[c;d]pyrène	0,003	0,33
	Chrysène	0,015	0,26
	<i>Benzo[b/j/k]fluoranthène</i>	<i>0,151</i>	<i>0,19</i>
	<i>Benzo[a]pyrène</i>	<i>0,621</i>	<i>0,14</i>
	<i>Indéno[1,2,3-c,d]pyrène</i>	<i>0,673</i>	<i>0,04</i>
	<i>Benzo[g,h,i]perylène</i>	<i>0,501</i>	<i>0,12</i>
	TEQ	0,292	0,02

L'apport d'air comprimé au niveau de la zone de pyrolyse influence directement un nombre non-négligeable d'analytes : le fluoranthène, pyrène, benz[a]anthracène, cyclopenta[c;d]pyrène et chrysène sont présents en moins grande quantité dans les fumées générées avec cette arrivée d'air forcée.

Si l'on relie cet effet à la production même des molécules de HAP, alors celui-ci peut prolonger les constatations réalisées par certains auteurs qui ont mis en évidence une diminution de la production des HAP par pyrolyse en augmentant les teneurs en oxygène ambiantes (McGrath, T.E. et al., 2003). Bien qu'il ne soit pas possible à notre échelle d'étude de déterminer réellement le mode d'action de ce paramètre et de confirmer cette hypothèse, ce résultat reste particulièrement intéressant. En effet, un aménagement technique mineur du générateur à friction a permis de réduire significativement la teneur en certains HAP dans les fumées obtenues.

Par ailleurs, le temps d'appui se révèle peu déterminant pour les teneurs en HAP, tant en terme de nombre que d'amplitude d'effets. Même si les temps d'appui employés permettent d'obtenir des températures de pyrolyses différentes, celles-ci restent toutes largement inférieures à 600 °C, c'est-à-dire très en dessous des zones favorables à la production de HAP (McGrath, T.E. et al., 2003). Il est par contre surprenant de trouver des effets négatifs, c'est-à-dire que les plus hauts niveaux de températures ont mené à des fumées plus pauvres en pyrène et benzo[b/j/k]fluoranthène. En effet, il est unanimement admis que la production des HAP est augmentée linéairement avec la température de pyrolyse jusqu'à des températures d'au moins 1000 °C.

Cet effet est donc plus probablement relié aux conditions ambiantes qu'aux conditions de production. En effet, les relevés de température de fumées piégées ont montré que les fumées produites avec 25 et 45 secondes d'appui arrivent au piège avec une température plus élevée. Etant dans un environnement plus chaud au moment de leur entrée dans le piège, les HAP semi-volatils quitteront en partie la phase de fumée particulaire pour passer à l'état gazeux. Notre piège retenant spécifiquement les particules de fumée, les dépôts obtenus seraient donc proportionnellement moins riches en certains HAP.

Cependant, cette hypothèse reste non démontrable à notre échelle d'étude et ne permet pas d'expliquer que cet effet ne soit pas retrouvé pour d'autres HAP plus légers que les benzo[b/j/k]fluoranthènes. Cette apparente complexité prouve bien la nécessité d'approfondir la connaissance des mécanismes de production pyrolytique des HAP et de leur évolution dans les fumées.

Considérant les valeurs d'effets de l'ensemble des paramètres, c'est l'essence de bois qui influence le plus fortement les concentrations en HAP individuels dans les fumées produites. C'est en particulier vrai pour le benz[a]anthracène, le cyclopenta[c;d]pyrène et le chrysène puisque ceux-ci n'ont pratiquement pas pu être quantifiés dans les fumées issues de bois de chêne (exception faite du cyclopenta[c;d]pyrène dans la fumée 19). Mais c'est aussi le facteur qui fait varier le plus les teneurs en fluoranthène et pyrène.

Comme c'est aussi le paramètre qui influence le plus grand nombre d'analytes (avec l'apport en air qui influence les même cinq composés : fluoranthène, pyrène, benz[a]anthracène, cyclopenta[c;d]pyrène et chrysène mais dans des proportions plus faibles), il aurait pu être considéré que c'est le paramètre le plus important à prendre en considération pour la qualité sanitaire des fumées produites. L'utilisation de bois de chêne aurait alors permis d'obtenir des fumées moins toxiques. Cependant, il n'existe pas de différence significative entre les TEQ des fumées issues de bois de chêne et les fumées issues de bois de hêtre. Ceci s'explique par le fait que certains des HAP qui sont favorisés par le bois de hêtre ne sont pas pris en considération pour le calcul du TEQ (le pyrène et le cyclopenta[c;d]pyrène ne possèdent pas de TEF). Les autres ne possèdent pas des TEF respectifs très élevés à même de d'influencer vraiment le TEQ ($TEF_{\text{fluoranthène}} = 0,01$; $TEF_{\text{benz[a]anthracène}} = 0,1$; $TEF_{\text{chrysène}} = 0,01$). Ainsi, le seul facteur étudié à même de modifier la toxicité des fumées (évaluée par le TEQ) est l'humidité du bois qui fait simultanément diminuer des HAP plus toxiques ($TEF_{\text{Benzo[b/j/k]fluoranthène}} = 0,1$; $TEF_{\text{Indéno[1,2,3-c,d]pyrène}} = 0,1$). Si l'on ne considère que l'aspect sanitaire des fumées, la seule recommandation pertinente serait celle d'utiliser des bois à forte teneur en eau pour la génération de fumée à visée alimentaire.

Par ailleurs, nous avons ici une nouvelle preuve en faveur de la nouvelle réglementation européenne visant à ne plus prendre uniquement en compte le benzo[a]pyrène comme indicateur des contaminations en HAP. Cela ressort particulièrement à travers le fait que les variations de teneur en benzo[a]pyrène ne suivent pas les variations de TEQ qui est par définition un indicateur plus précis de la toxicité liée induite par la contamination en HAP. Dans le cadre de notre étude, l'indicateur « HAP4 » se révélerait particulièrement intéressant puisqu'il prend en compte des congénères aux teneurs effectivement variables dans les fumées de notre expérience : benz[a]anthracène, chrysène et benzo[b]fluoranthène.

L'apport en air comprimé et l'utilisation du bois de chêne ont permis de diminuer les teneurs des fumées expérimentales en 5 HAP.

Seule l'utilisation de bois humide a permis de diminuer significativement le TEQ des fumées produites, par rapport à celles obtenues avec du bois sec.

XI.8. Interactions entre paramètres opérationnels

La plupart des interactions de facteur détectées concernent l'essence de bois, mais elles ne sont pas à prendre en considération, car elles ne représentent pas une réalité expérimentale. Dans l'exemple présenté Figure 77 il est évident que nous ne pouvons pas considérer que les deux essences de bois modifient l'effet de l'humidité du bois. La « différence d'effet » détectée par l'analyse de la variance résulte du fait que le chrysène n'est quantifié dans aucune des fumées de bois de chêne, ce qui explique l'absence totale d'effet.

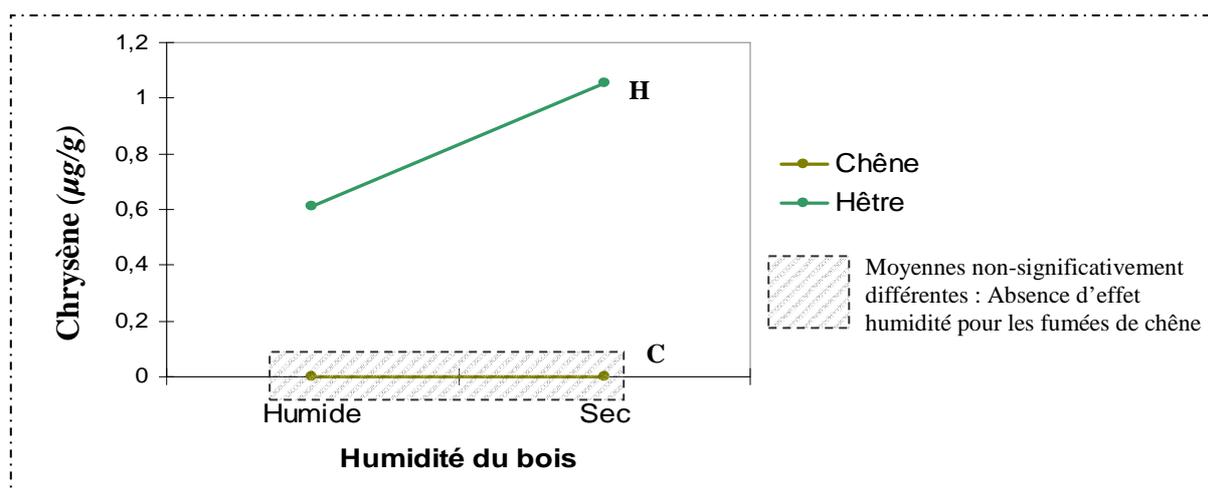


Figure 77 : Graphiques des moyennes représentant l'interaction de facteurs « humidité du bois x essence de bois » pour le chrysène

Les autres interactions de paramètres concernent l'apport en air au niveau de la zone de pyrolyse. D'une part, nous pouvons mettre en évidence des effets du temps d'appui qui n'étaient pas détectables précédemment (Figure 78-A). En fait, l'effet du temps d'appui sur ces composés dépend totalement de l'apport en air puisqu'il est positif dans un cas (avec apport d'air comprimé) et négatif dans l'autre. Qui plus est, pour le fluoranthène, chrysène et cyclopenta[c;d]pyrène, les effets sont de même intensité, ce qui engendre une compensation : l'effet direct du temps d'appui global est estimé nul. Pour le pyrène, les deux effets ne sont pas exactement aussi intenses, ce qui permet de détecter quand même un effet du temps

d'appui seul. C'est un élément déterminant pour la qualité sanitaire des fumées produites puisque sans la connaissance de cette interaction, le temps d'appui serait considéré comme un facteur opérationnel à l'importance marginale (car influençant peu de composés) qu'il faudrait tout de même maximiser (puisque ses effets directs sont négatifs, son augmentation doit diminuer les teneurs en HAP). Par ailleurs, il faut atténuer les conclusions précédentes sur l'intérêt d'avoir un apport d'air comprimé comme il a été intégré à notre générateur de fumée, puisque selon le temps d'appui utilisé, il peut être plus favorable de s'en priver pour minimiser les teneurs en HAP.

De même, l'interaction entre l'humidité du bois et l'apport d'air comprimé est à prendre en considération puisque l'effet de réduction des teneurs en HAP de l'apport en air n'est valable que dans le cas d'un bois sec. Les bois humides conduisent dans tous les cas à la même teneur réduite en benz[a]anthracène et chrysène.

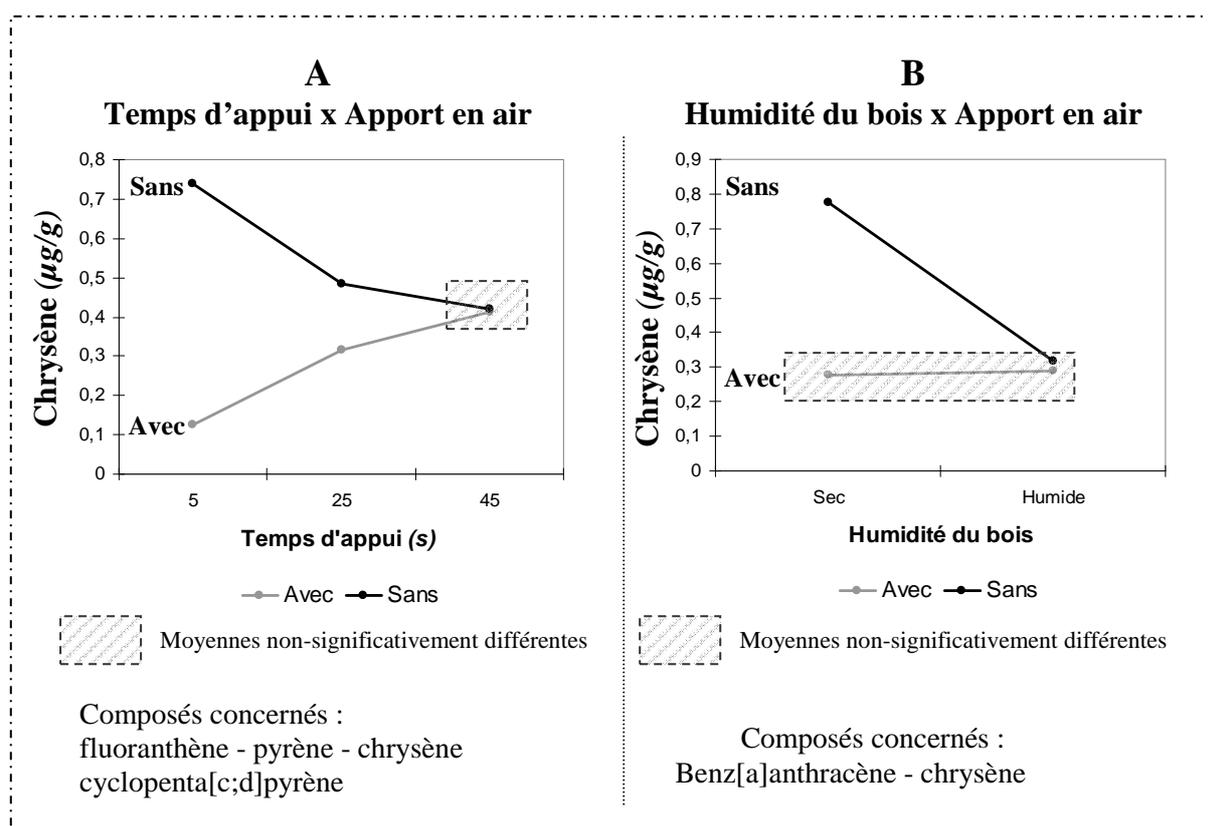


Figure 78 : Graphiques des moyennes représentant les deux principales interactions de facteurs significativement influentes sur les teneurs en HAP

A partir de nos résultats, donner une explication à ces différentes interactions entre les paramètres expérimentaux est au mieux hasardeux, en particulier en ce qui concerne l'inversion d'effet du temps d'appui par l'apport en air.

Une explication envisageable serait être ici aussi de considérer les effets négatifs non pas une moins grande production des HAP concernés, mais comme leur plus grande conversion en des HAP plus lourds. Ainsi, l'apport d'air n'aurait pas un effet positif sur les teneurs en FA, PY, CPP et CHR avec l'élévation de température, mais un effet négatif sur les HAP produits à partir d'eux. Ce sont malheureusement encore des explications que nous ne pourrions prouver, d'autant moins qu'il y aurait là une contradiction entre la compensation d'effet qui supporterait cette hypothèse, et le fait que l'air apporté aurait en fait un effet positif sur les mécanismes de production des HAP.

Le fait que l'utilisation de bois humide mène aux mêmes concentrations que l'apport en air pourrait indiquer que les deux paramètres agissent à travers le même mécanisme. Ainsi, si l'apport en air permet de se placer dans des conditions où l'oxygène ambiant limite la production de HAP, alors la pyrolyse du bois très humide s'accompagnerait de libération d'oxygène avec des conséquences comparables. Cependant, la thermolyse de l'eau est négligeable aux températures atteintes, elle ne peut donc pas justifier une hypothétique libération d'oxygène à partir de l'eau vaporisée dans la zone de pyrolyse. Nous ne sommes donc pas réellement en mesure d'apporter une cause sous-jacente à ces observations.

Ces interactions d'effet ont donc une double répercussion sur l'interprétation de nos résultats. En plus de nous prouver une fois de plus la complexité des phénomènes mis en œuvre mais non-mesurables, elles indiquent l'importance de pouvoir comprendre le fonctionnement global d'un générateur de fumée, puisque l'analyse détaillée comme nous venons de la voir ne fait pas sens à elle toute seule.

XI.9. Analyse en composantes principales des teneurs en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

De même que pour les teneurs en composés phénoliques, l'analyse en composante principale a été réalisée sur les données standardisées, alors que l'homogénéité d'unité des données ne l'imposait pas de fait. Ici, c'est la différence de toxicité relative des HAP étudiés qui a imposé ce choix, puisque de faibles variations sur un composé au TEF élevée sont potentiellement plus importantes que les grandes amplitudes de composés à la toxicité plus faible. Il aurait été envisageable de pondérer les teneurs de chaque HAP par leurs TEF respectifs, et de procéder à une ACP non-normée. Cependant, certains HAP ne possèdent pas de TEF dans la référence que nous avons choisi d'appliquer, ce qui imposerait pour ceux-ci l'utilisation de TEF arbitrairement choisis. C'est donc là encore une ACP normée qui a été

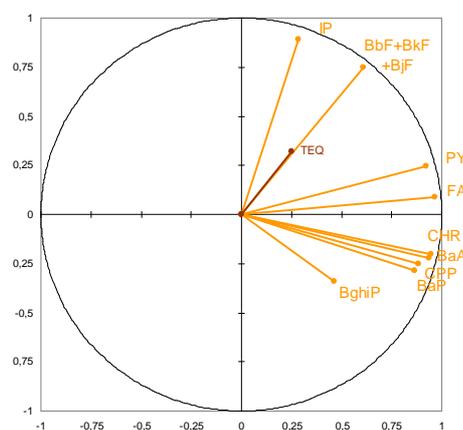
utilisée pour analyser les données, qui présente par ailleurs l'avantage de faciliter la mise en relation avec les résultats vus de la même manière pour les composés phénoliques. Afin d'avoir tout de même des informations prenant en compte les toxicités relatives de HAP, les TEQ calculés pour les fumées a été intégré à l'analyse en tant que variable illustrative.

Bien que les deux premières composantes principales F1 et F2 ne représentent ensemble que 83,77% de l'inertie totale des données (Tableau 51), l'utilisation d'une ou deux composantes supplémentaires ne se justifie ni par le gain d'inertie (12% cumulé sur la troisième et quatrième composante) ni sur la qualité de la représentation.

Tableau 51 : Caractéristiques des trois premières composantes principales de l'analyse réalisée sur les variables expérimentales

Composantes principales	F1	F2
Inertie propre (%)	64,04	19,72
Inertie cumulée (%)	64,04	83,77
Coefficients de corrélation entre variables actives et composantes principales		
Fluoranthène - FA	0,968	0,090
Pyrène - PY	0,925	0,246
Benz[a]anthracène - BaA	0,937	-0,223
Cyclopenta[c,d]pyrène-CPP	0,884	-0,251
Chrysène - CHR	0,948	-0,202
Benzofluoranthènes-Bb/j/kF	0,607	0,751
Benzo[a]pyrène - BaP	0,865	-0,284
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène - IP	0,285	0,891
Benzo[g,h,i]érymène-BghiP	0,463	-0,340
Coefficients de corrélation entre variables illustratives et composantes principales		
TEQ	0,249	0,320

Cercle des corrélations F1 – F2



La première composante est définie par la plupart des concentrations en HAP alors que la deuxième représente plus spécifiquement l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène et les benzofluoranthènes. Comme nous avons pu voir que ce sont justement ces composés qui définissent les variations de TEQ des fumées, nous retrouvons également celui-ci plutôt lié à la deuxième composante principale.

La projection des barycentres des différents groupes de fumées dans l'espace F1-F2 permet de d'appréhender dans l'ensemble l'importance relative des différents paramètres pour ce qui est des contaminations des fumées ne HAP.

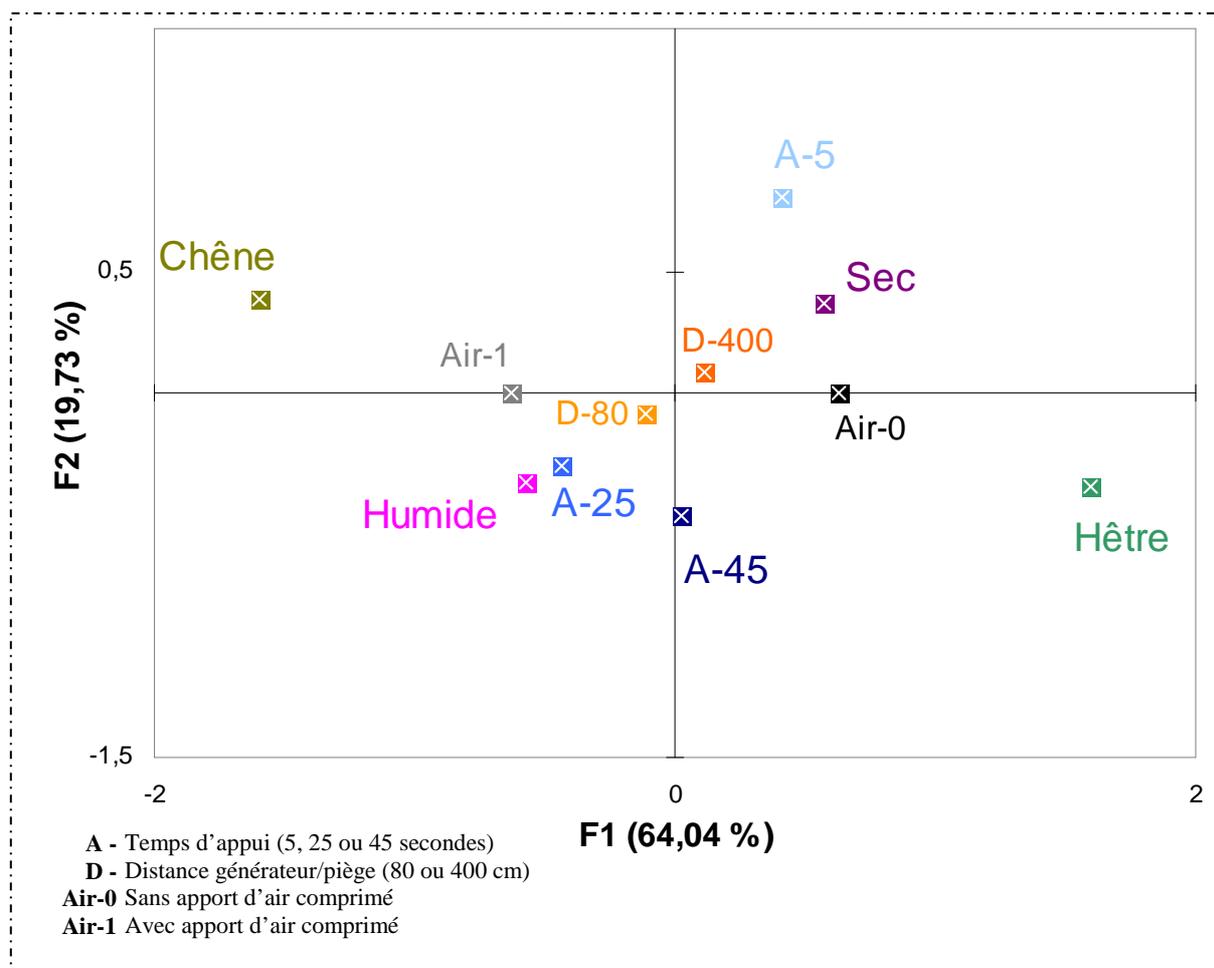


Figure 79 : Projection des barvcentres de classes dans le plan factoriel F1-F2 (données de teneurs en HAP)

Nous retrouvons dans cette projection la caractéristique principale que nous avons pu remarquer pour les composés phénoliques : l'importance prépondérante de l'essence de bois (le hêtre étant celle qui est favorable à nos analytes). Les autres conditions expérimentales sont à première vue réparties de la même façon dans le plan factoriel, mais les différences identifiées grâce aux effets principaux ressortent : l'effet plus important de l'apport en air (barycentres associés plus éloignés l'un de l'autre), celui plus limité de l'humidité du bois et enfin une influence du temps d'appui moins marquée (barycentres associés plus proches).

Il semble a priori difficile de déterminer des conditions de fonctionnement de notre générateur qui soient à la fois favorables à la formation des composés phénoliques tout en limitant les teneurs en HAP puisque l'on retrouve des plans factoriels très ressemblants pour les deux familles chimiques.

XI.10. Caractérisation globale du générateur de fumée

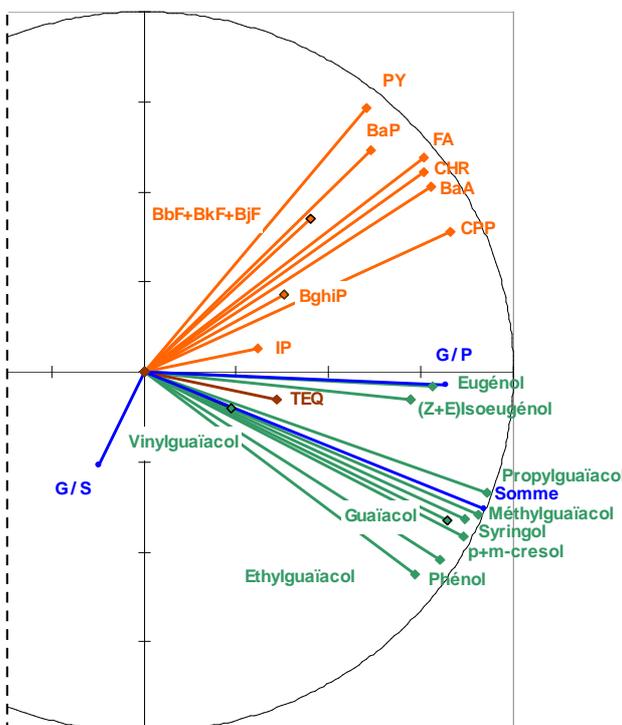
Il y a plusieurs façons envisageables de synthétiser les différents résultats obtenus jusqu'à présent pour tenter d'aboutir à une vision d'ensemble et une caractérisation aussi globale que possible du générateur de fumée. Il est par exemple possible de cumuler les données de teneurs en phénols et en HAP pour réaliser une analyse en composantes principales normalisée.

Le fait de cumuler les deux jeux de données pour la même analyse implique nécessairement que les composantes principales construites restitueront moins d'inerties que celles qui ont été réalisées jusqu'à présent. Ceci est d'autant plus vrai que nous avons fait le choix de garder même les variables chimiométriques qui se révèlent peu discriminantes pour nos fumées expérimentales. Les composantes F1 et F2 ne cumulent que 68% de l'inertie totale des données, mais nous pouvons voir sur le cercle des corrélations qu'elles définissent un espace de représentation tout à fait intéressant (Tableau 52).

Tableau 52 : Caractéristiques des trois premières composantes principales de l'analyse réalisée sur les teneurs en composés phénoliques et HAP dans les fumées

Composantes principales	F1	F2	F3
Inertie propre (%)	49,29	18,28	14,34
Inertie cumulée (%)	49,29	67,57	81,91
Coefficients de corrélation entre variables actives et composantes principales			
Phénol	0,736	-0,561	0,094
p+m-crésol	0,822	-0,413	-0,218
Guaïacol	0,864	-0,458	-0,060
4-méthylguaïacol	0,903	-0,399	-0,108
4-éthylguaïacol	0,801	-0,524	0,041
4-vinylguaïacol	0,237	-0,103	0,897
Syringol	0,870	-0,410	-0,118
Eugénol	0,780	-0,041	0,120
4-propylguaïacol	0,929	-0,336	-0,069
(Z+E)isoeugénol	0,723	-0,079	0,300
Coefficients de corrélation entre variables illustratives et composantes principales			
Somme	0,920	-0,381	-0,037
G / P	0,817	-0,037	-0,144
G / S	-0,121	-0,260	0,225
TEQ	0,360	-0,076	0,416

Cercle des corrélations F1 – F2



L'analyse en composantes principales donne ici aussi un premier axe (F1) prépondérant défini positivement par l'ensemble des variables d'étude. Ceci reprend bien les similitudes d'effets que nous avons pu constater entre les HAP et les composés phénoliques. Comme les teneurs des fumées en ces deux types d'analytes sont globalement influencés de la même façon par les paramètres expérimentaux, les fumées riches en HAP sont également riches en composés phénoliques. La deuxième composante principale (F2) présente un intérêt particulier puisqu'elle est définie positivement par les teneurs en HAP et négativement par les teneurs en composés phénoliques.

Bien que la représentation graphique semble montrer que le TEQ est corrélé principalement aux composés phénoliques, les caractéristiques de la composante F3 nous montrent que celui-ci reste corrélé avec les benzofluoranthènes et l'indénopyrène qui définissent F3 (avec le 4-vinylguaiacol). Cette composante pourrait donc être pertinente pour représenter les fumées en fonction de leur toxicité relative, mais son étude détaillée et les plans de projection qu'elle permet de construire (non représentés) ne montrent pas de réelle discrimination des fumées expérimentales exploitables.

En plus des paramètres expérimentaux, nous disposons des données de variables expérimentales du pilote que nous pouvons tenter d'intégrer à cette caractérisation du générateur. La projection à titre illustratif des variables expérimentales dans l'espace F1-F2 obtenu précédemment permet d'apprécier visuellement les relations explicitées, notamment entre températures de fumées et teneurs en analytes (Figure 80).

Au premier abord, il s'avère difficile de trouver une corrélation avec celles-ci puisque les effets des paramètres expérimentaux ne présentent pas d'adéquation comparable à celle rencontrée entre les résultats de composés phénoliques et de HAP. En effet, alors que l'essence de bois est le paramètre prépondérant pour les teneurs en analytes, celle-ci est moins importante que l'humidité du bois pour l'ensemble des données de bilan matière (Figure 80). Cependant, comme l'essence de bois détermine les données de température il est possible qu'elle soit un lien pertinent à prendre en compte. Comme nous l'avons déjà souligné, les différentes observations suggèrent qu'une partie des différences observées entre le bois de chêne et le bois de hêtre est liée aux différences de températures qu'ils induisent lors de la friction de la bûche. C'est ce qui justifierait que l'on identifie l'essence de bois comme étant le paramètre le plus déterminant, alors que les deux essences choisies sont relativement

proches (au sein de la diversité des bois disponibles) et que l'on se serait attendu à ce que la température de pyrolyse prédomine.

Dans ce cas là, il serait possible de considérer qu'effectivement c'est la température de pyrolyse qui est prédominante, non seulement pour les variables expérimentales, mais aussi pour les teneurs en composés phénoliques et en HAP. Le fait que le bois de hêtre fournisse des fumées plus riche résulterait non seulement de sa composition, mais aussi de la pyrolyse plus intense qu'il induit lors des cycles d'appui de la bûche. En l'absence de mesure totalement fiable des températures de pyrolyse à l'interface de la bûche et du générateur pour confirmer cette hypothèse, nous ne pouvons que considérer les paramètres « temps d'appui » et « essence de bois » indépendamment, tout en prenant en compte leur interaction clairement démontrée sur l'ensemble des résultats.

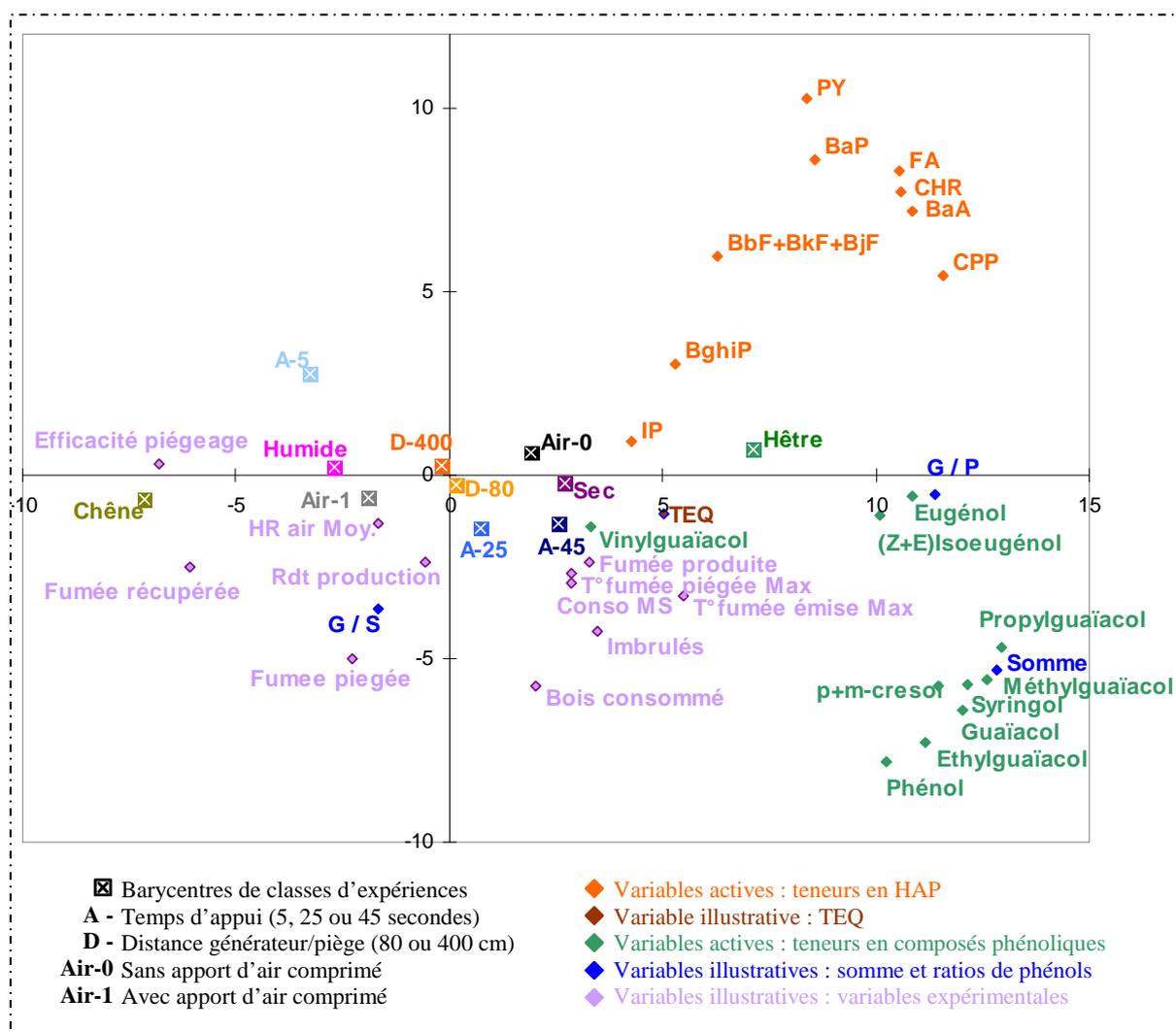


Figure 80 : Projection des barycentres de classes et des variables expérimentales dans le plan factoriel F1-F2 (données de teneurs en composés phénoliques et HAP)

Le fait que les composantes principales restituent relativement peu d'inertie rend par ailleurs l'identification graphique des fumées « optimales » (relativement riches en composés phénoliques et pauvres en HAP) partiellement hasardeuse. En effet, même si l'espace F1-F2 est bien défini, il peut ne pas rendre compte de certaines distances réelles entre plusieurs échantillons.

Nous avons donc réalisé deux classifications ascendantes hiérarchiques selon les teneurs en composés phénoliques et en HAP. Celles-ci permettent en effet d'identifier des groupes d'individus en prenant en compte la totalité de l'information chimiométrique disponible, et pas uniquement celle qui est restituée par le plan factoriel F1-F2. Les classifications sont réalisées sur les données centrées et réduites en utilisant la distance euclidienne au carré et le critère de Ward. La troncature est effectuée automatiquement au saut de classe le plus important.

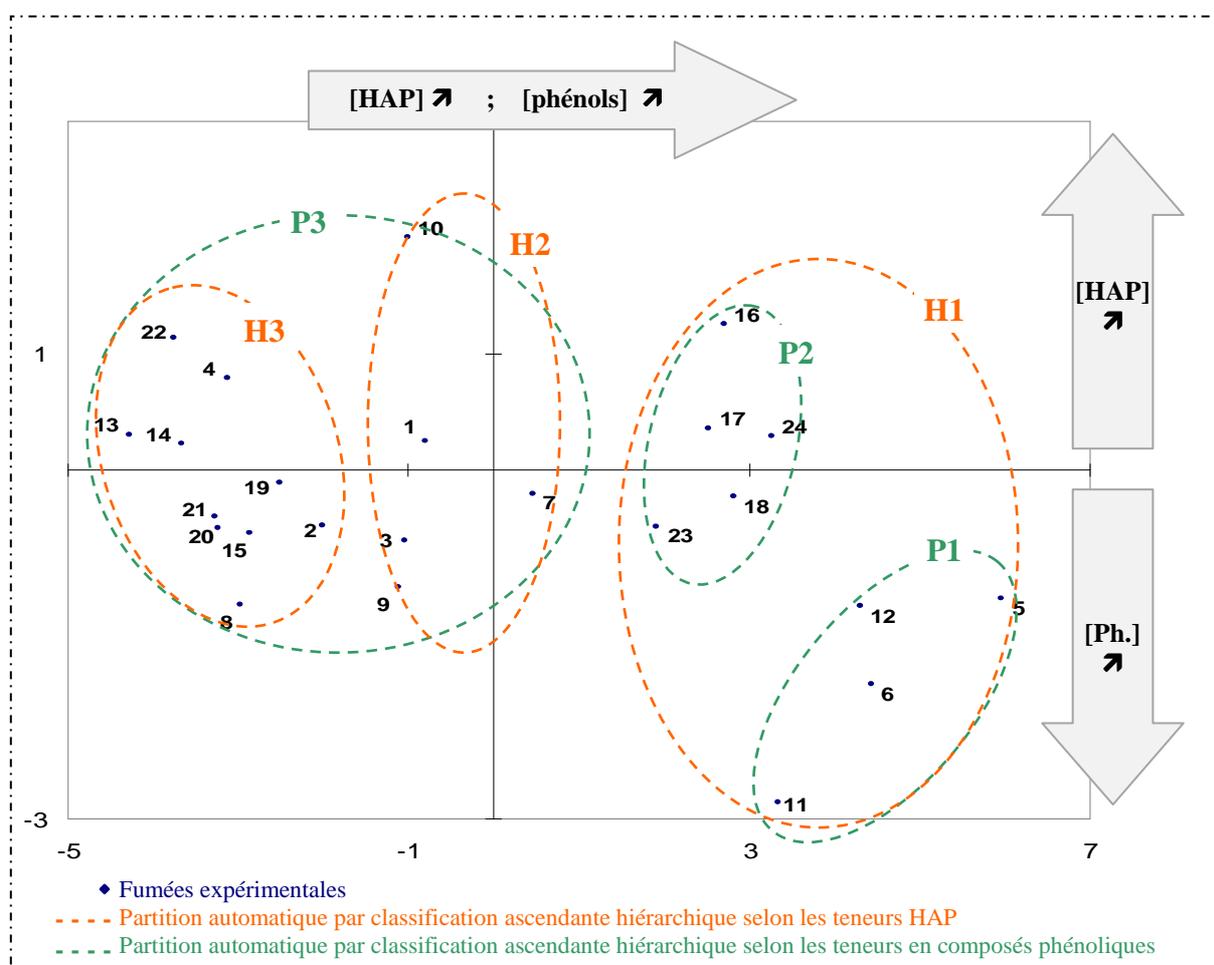


Figure 81 : Projection des 24 fumées expérimentales dans le plan factoriel F1-F2 (données de teneurs en composés phénoliques et HAP)

Cette approche ne permet pas en première approximation de discriminer les fumées expérimentales plus précisément. Bien que les deux partitions soient différentes, leur représentation graphique (Figure 81) montre bien qu'elles sont homogènes et se recoupent parfaitement. Ceci prouve bien que les fumées expérimentales sont sensiblement les mêmes du point de vue des composés phénoliques et des HAP : on distingue les fumées sur leur « richesse » et leur « pauvreté », indifféremment sur leurs teneurs en composés phénoliques ou en HAP.

Ces classifications reprennent globalement les observations déjà réalisées au travers des analyses précédentes mais permettent en plus de les traduire en groupes de fumées bien définis. Par exemple, l'existence du groupe H1 (ou P1 et P2) sur la droite du plan traduit bien l'importance prépondérante de l'essence de bois, puisque n'y sont présentes que des fumées à base de bois de hêtre. Par ailleurs, la séparation des classes P1 et P2 résulte de l'effet de l'humidité du bois et nous permet d'identifier les fumées 5, 6, 11 et 12 comme étant clairement les fumées les plus riches en composés cible. L'ensemble des observations est donc bien confirmé puisque ces 4 fumées sont les seules à avoir été produites avec du bois de hêtre sec avec un temps d'appui « long » (25 et 45 secondes).

C'est précisément cette séparation du groupe H1 en groupes P1 et P2 qui s'avère importante à nos yeux. En effet, pour ce qui est des HAP, ces fumées sont relativement proches (regroupées dans la même classe H1) alors qu'elles sont séparées en deux groupes (P1 et P2) selon leurs teneurs en composés phénoliques. Considérant qu'un déplacement vers la droite du plan représente une augmentation globale des teneurs en HAP et composés phénoliques, il existe un classement des groupes de fumées selon leur « richesse globale » :

$$H3 < H2 < P2 < P1$$

Or, nous pouvons constater que seule le passage du groupe P2 au groupe P1, entraîne un déplacement vertical dans le plan. Le déplacement se faisant vers le bas, il témoigne d'une augmentation plus déterminante en composés phénoliques qu'en HAP. Ainsi, le groupe P1 se révèle intéressant car même s'il est celui où les fumées sont les plus riches en HAP, c'est aussi le groupe où le poids des composés phénoliques est le plus fort par rapport à celui des HAP. Les fumées obtenues dans ces conditions avec du bois de hêtre sec pyrolysé avec des longs temps d'appui seraient donc plus porteuses de HAP, mais cette toxicité potentielle pourrait être contrebalancée par la forte teneur en composés phénolique. En effet, la fumée étant potentiellement plus aromatisante, elle pourrait permettre de réduire la durée d'exposition du produit lors du fumage et donc sa charge finale en HAP.

XII. Conclusions - Première partie

L'utilisation de la précipitation électrostatique en couplage avec les analyses chromatographiques a permis la caractérisation des fumées alimentaires produites par le générateur industriel étudié.

D'un point de vue analytique, la GCxGC permet un apport significatif au dosage des composés phénoliques principalement grâce à sa sensibilité légèrement plus élevée. Par ailleurs, il est possible de tirer parti de son plus grand pouvoir résolutif pour la séparation sélective de certains HAP. Cependant, en dépit de ses avantages comparativement à la GC, ce n'est pas la technique la mieux adaptée à notre étude et nos objectifs. En effet, les résultats apportés par la GC permettent une meilleure caractérisation du mode de fonctionnement du générateur de fumée et un traitement analyses plus aisé. Ceci est en grande partie dû à la meilleure maîtrise du traitement du signal et une plus faible variabilité de réponse.

C'est donc à l'aide de la GC qu'ont été établis des liens clairs entre la composition de la fumée et ses conditions de génération. C'est en particulier la matière première utilisée qui a un rôle prépondérant. L'utilisation de bois de hêtre sec entraîne une augmentation globale des teneurs en HAP et composés phénoliques, de même que l'augmentation du temps de friction des bûches sur le rotor.

Cependant, à l'issue de cette étude, une incertitude persiste quant au mode d'action de l'essence de bois. Bien que les études antérieures montrent que la différence de composition chimique des bois utilisés peut expliquer les différences de génération de composés étudiés, certains de nos résultats nuancent cette conclusion. Il semblerait en effet que la densité des bûches puisse aussi être une raison des effets de l'essence de bois : le bois de hêtre serait en réalité pyrolysé à une température plus élevée que celui de chêne.

L'objectif de caractérisation du générateur de fumée industriel à friction a ainsi été rempli dans les limites fixées par la complexité de son fonctionnement et l'imprécision de certains outils de mesure utilisées. Il semble à présent que la mesure précise des températures de pyrolyses à l'interface rotor/bûche est l'enjeu capital pour une meilleure compréhension de ce type de générateur et incidemment pour une meilleure maîtrise des fumées qu'il permet de produire. Il ne sera cependant peut-être pas possible d'atteindre une détermination parfaite des phénomènes sous-jacents par l'étude de générateurs réels à taille industrielle. Une meilleure maîtrise de l'ensemble des paramètres opérationnels de génération des fumées pourrait alors passer par l'utilisation de pilotes mieux contrôlés et instrumenté spécifiquement pour ce genre d'études.

Résultats et Discussion

Seconde partie

Influence de la composition du produit sur le dépôt
et la sorption des composés de la fumée lors du fumage.

XIII. Influence de la composition du produit sur le processus de fumage réel

XIII.1. Composés phénoliques déposés au cours du fumage

L'analyse des composés phénoliques déposés sur les matrices au cours du fumage a été réalisée en parallèle par SPME de l'espace de tête et par extraction-distillation simultanée des échantillons. Seuls les résultats obtenus grâce au dosage par extraction-distillation simultanée seront présentés ici, car les analyses par SPME ont permis d'obtenir globalement les mêmes résultats mais pour un nombre moins important de composés phénoliques. Comme par ailleurs ces résultats ne sont que semi-quantitatifs, ils n'apportent pas d'information supplémentaire.

Les teneurs en composés phénoliques des matrices modèles fumées sont reportées dans le Tableau 54. Les constituants utilisés pour la fabrication des matrices n'étant pas initialement significativement contaminés en phénols (aucun des composés phénoliques cibles n'a pu être détecté dans les extraits d'huile ou de pulpe de poisson), ce sont ces résultats « bruts » qui ont été analysés et interprétés.

Par ailleurs, afin de tenter de mettre en évidence des liens entre le dépôt des composés phénoliques et leur teneur dans la fumée, les résultats ont aussi été analysés en comparaison avec la composition de la fumée utilisée (déterminée au chapitre précédent, fumée P12, Tableau 53). Ces analyses n'ont cependant pas permis d'établir des relations probantes, ils ne seront pas présentés spécifiquement.

Tableau 53 : Composition de la fumée utilisée en composés phénoliques

	$\mu\text{g/g}$ de fumée	% sur total
Phénol	248,52	2,72
o-crésol *	$\approx 30,00$	$\approx 0,33$
p+m-crésol	60,34	0,66
Guaïacol	1402,35	15,32
4-méthylguaïacol	1563,94	17,09
5-éthylguaïacol	468,53	5,12
4-vinylguaïacol	14,80	0,16
Syringol	4246,76	46,40
Eugénol	621,54	6,79
4-propylguaïacol	150,49	1,64
(Z+E)isoeugénol	374,81	4,10
Somme	9152,10	100,00

* valeurs estimées avec les données de GCxGC-TOFMS

Tableau 54 : Teneurs en composés phénoliques des différentes matrices modèles fumées

Point exp.	Durée de fumage (min)	Huile ajoutée	Quantité d'huile (mL)	Quantité d'eau (mL)	Phénol	o-crésol	p+m-crésol	Guaiacol	4-méthylguaiacol	4-éthylguaiacol	4-vinylguaiacol	Syringol	Eugénol	4-propylguaiacol	(Z+E)isoeugénol	Somme
M01	30	C	5	0	14,61	2,50	2,63	49,05	41,33	8,64	36,38	15,72	24,85	3,27	46,61	245,59
M02	30	C	10	0	18,15	2,71	3,37	59,21	50,28	10,44	39,92	8,57	28,06	6,03	48,70	275,44
M03	30	0	0	10	7,14	3,74	3,06	48,86	37,38	8,20	27,36	19,30	21,54	3,50	37,00	217,09
M04	30	0	0	20	13,65	2,20	1,62	58,42	46,64	8,78	19,83	8,13	25,27	3,19	42,06	229,78
M05	30	B	5	20	14,97	2,61	2,04	55,64	47,36	9,79	37,21	11,25	26,92	4,01	47,18	258,98
M06	30	B	10	10	2,12	2,90	2,14	63,35	58,63	12,00	36,62	5,60	30,14	4,61	33,12	251,21
M07	30	B	10	0	3,33	3,65	2,45	76,61	73,79	15,11	40,23	6,13	38,81	7,22	50,66	318,02
M08	30	0	0	20	17,24	3,59	3,70	54,04	42,50	7,46	27,07	23,37	23,65	3,48	42,79	248,88
M09	30	0	0	0	13,74	2,26	2,11	48,79	39,97	8,62	19,41	6,80	23,14	2,87	44,50	212,20
M10	30	A	5	10	12,86	2,84	2,14	62,52	55,40	11,22	43,91	7,81	31,60	5,45	56,09	291,85
M11	30	A	10	20	14,93	3,15	2,26	71,08	60,26	13,30	41,65	11,50	34,49	8,17	57,82	318,60
M12	30	0	0	0	17,76	3,97	3,73	53,34	40,88	8,56	21,96	18,71	23,36	3,05	42,38	237,71
M13a	60	C	5	10	38,29	10,29	8,23	164,90	144,72	33,66	58,85	62,93	80,35	14,90	144,91	762,02
M13b	60	C	5	10	33,32	10,90	6,46	165,26	143,15	27,39	55,02	50,33	74,71	13,01	130,11	709,66
M13c	60	C	5	10	28,30	5,50	5,08	130,18	111,26	22,54	58,73	32,09	63,49	9,84	108,52	575,53
M14	60	C	10	20	24,49	6,65	5,48	166,36	141,87	26,49	52,00	9,25	70,46	13,17	88,09	604,30
M15	60	0	0	0	21,71	4,98	4,28	86,17	67,18	11,98	22,66	34,75	35,91	5,48	58,32	353,42
M16	60	B	5	0	27,34	5,90	4,90	132,54	115,78	22,42	28,66	24,73	67,97	10,44	106,21	546,90
M17	60	B	10	0	27,26	7,13	4,94	161,96	152,79	29,27	54,42	17,68	81,78	14,79	109,13	661,15
M18	60	0	0	10	23,40	4,12	3,12	103,67	77,87	13,28	13,11	17,39	42,09	5,39	55,53	358,97
M19	60	0	0	20	21,98	5,27	4,31	127,29	93,97	16,46	14,62	20,40	51,38	7,41	65,54	428,64
M20	60	A	5	20	27,37	6,74	4,59	127,26	107,34	25,35	44,72	42,80	61,62	11,37	101,29	560,45
M21	60	A	10	10	19,18	5,40	4,12	133,30	120,31	23,99	59,62	27,23	69,25	12,94	126,77	602,11
M22	60	0	0	0	23,01	6,06	3,25	108,93	98,95	14,64	23,63	15,72	44,90	6,43	87,41	432,94
M23	120	C	5	20	64,06	20,75	12,03	312,80	274,51	46,41	68,56	64,40	126,11	24,88	198,57	1213,09
M24	120	C	10	10	55,95	13,62	11,38	313,16	292,93	58,86	97,60	150,28	115,93	30,12	218,33	1358,17
M25	120	C	10	0	57,32	13,73	14,05	254,58	227,58	41,63	105,52	100,51	102,68	28,15	188,70	1134,45
M26	120	0	0	20	34,16	8,36	6,22	208,93	155,82	25,81	21,30	40,49	82,46	11,04	121,06	715,65
M27	120	0	0	0	47,71	11,69	6,68	210,58	159,18	26,67	13,25	54,83	79,50	11,33	147,14	768,57
M28	120	B	5	10	35,73	13,52	6,43	228,27	205,73	39,69	52,48	28,79	111,62	19,64	179,38	921,28
M29	120	B	5	0	44,55	15,13	9,47	262,02	228,29	41,56	58,66	124,13	107,91	19,75	189,80	1101,27
M30	120	B	10	20	49,73	11,36	9,19	275,03	245,37	57,26	101,25	104,87	115,52	24,58	209,79	1203,94
M31	120	0	0	10	30,41	7,27	5,54	193,48	147,21	24,97	17,18	41,87	80,10	10,72	128,86	687,60
M32	120	0	0	0	30,28	9,10	8,19	152,86	118,67	19,76	24,89	51,33	59,57	9,55	105,50	589,69
M33	120	A	5	0	45,68	17,35	8,99	221,87	191,88	39,43	52,40	94,87	86,46	17,79	175,32	952,06
M34	120	A	10	0	25,88	9,97	5,06	192,22	148,06	23,52	17,27	11,25	78,99	10,72	103,93	626,87
M35	120	0	0	10	46,54	16,59	8,77	286,71	257,57	49,77	75,85	27,53	135,40	26,68	216,52	1147,93
M36	120	0	0	20	48,92	12,50	9,11	230,37	173,31	33,85	21,19	102,69	69,89	10,93	156,61	869,36

- Les concentrations sont exprimées en µg d'analytes déposés sur la matrice
 - Les analytes qui ne sont quantifiés dans aucun échantillon ne sont pas présentés
 - Huiles utilisées : A - Chimère ; B - Arachide ; C - Saumon

Tableau 55 : Résultats d'analyse de la variance et test de comparaison multiple LSD réalisés sur les teneurs en composés phénoliques dans les matrices fumées

	Durée de fumage (min)			ANOVA Niveau de significativité	Huile utilisée				ANOVA Niveau de significativité	
	ANOVA Niveau de significativité	LSD			Aucune	Chimère	Arachide	Saumon		
	30	60	120							
Phénol	< 0,0001		26,3	44,06	0,038				37,16	0,732
		12,54				26,51	24,32	25,63		
o-crésol	< 0,0001		6,58	12,92	0,245					0,854
		3,01								
p-crésol + m-crésol	< 0,0001		4,9	8,65	0,001				7,63	0,192
		2,6				4,91	4,53	5,2		
Guaiacol	< 0,0001		133,99	238,78	0,002			156,93	179,5	0,282
		58,41				131,5	134,71	156,93		
4-méthylguaiacol	< 0,0001		114,6	201,87	0,001			140,97	158,63	0,523
		49,53				103,8	113,87	140,97		
4-éthylguaiacol	< 0,0001		22,29	37,8	0,002			28,39	30,67	0,494
		10,18				18,59	22,8	28,39		
							22,8			
4-vinylguaiacol	0,001		40,5	51,96	0,0001			51,19	63,62	0,297
		32,63	40,5			24,22	43,26	51,19		
Syringol	< 0,0001		29,61	71,27	0,292					0,772
		11,91								
Eugénol	< 0,0001		61,99	96,58	0,002			72,58	76,3	0,604
		27,65				53,21	60,4	72,58		
							60,4			
4-propylguaiacol	< 0,0001		10,43	18,28	0,001			13,13	15,93	0,694
		4,57				8,07	11,07	13,13		
							11,07			
(Z+E) isoeugénol	< 0,0001		98,49	167,11	0,011			103,54	130,28	0,852
		45,74				90,08	103,54			
								657,84	764,25	
Somme	< 0,0001		549,67	949,28	0,001			657,84	764,25	0,854
		258,78				499,9	558,66	657,84		
							558,66			

- Les niveaux de significativité témoignant d'un effet significatif au risque 5% est signalée en gras

- Les tests LSD ne sont réalisés que si l'effet associé est significatif

- Les valeurs reportées pour les niveaux du test LSD sont les moyennes par modalité de facteur (en µg déposés)

- Les moyennes sur une même ligne ne sont pas significativement différentes au risque 5%

- Les moyennes pour chaque huile sont calculées sur les matrices contenant 5 et 10 mL, les résultats pour ces deux niveaux n'étant jamais significativement différents au risque 5%

XIII.1.1. Effets technologiques et de formulation du produit

Un ensemble d'analyse de la variance et de tests de comparaison multiple (LSD) a été réalisé sur les teneurs en composés phénoliques en fonction du temps de fumage et de la composition des matrices. Aucune interaction de facteur significative n'ayant été identifiée, seuls les effets principaux des facteurs expérimentaux (temps de fumage, ajout d'eau et ajout d'huile) seront présentés (Tableau 55).

XIII.1.1.1. Durée du fumage

Le temps de fumage se révèle être le facteur le plus déterminant. C'est le seul qui influence l'ensemble des composés phénoliques considérés et c'est celui qui fait varier les quantités de composés phénoliques déposés avec la plus grande amplitude. Comme cela a déjà pu être montré par de nombreux auteurs, lors des premiers temps du fumage la quantité en composés phénoliques déposés sur les produits augmente linéairement avec le temps (Luten, J.B. et al., 1979).

Tableau 56 : Taux d'enrichissement linéaire en analytes selon le temps de fumage et données physico-chimiques des composés phénoliques

	Pente ($\mu\text{g} / \text{min}$)	R ²	Masse molaire (g / mol)	LogP (a)	LogP (b)	pression de vapeur saturante (a) (mmHg à 25°C)
Phénol	0,34	0,99	94	1,54	1,50 **	0,614
o-crésol	0,11	1,00	108	1,96	1,98 **	0,379
p-crésol	0,07	1,00	108	1,94	1,97 **	0,207
m-crésol				2,04	1,98 **	0,207
Guaïacol	1,97	0,99	124	1,34	1,18±0,22 *	0,179
4-méthylguaïacol	1,66	0,99	138	1,65	1,64±0,22 *	0,0783
4-éthylguaïacol	0,30	0,99	152	2,47	-	0,0173
4-vinylguaïacol	0,21	0,99	150	1,93	1,92±0,22 *	0,0188
Syringol	0,66	1,00	154	0,77	-	0,0059
Eugénol	0,74	0,97	164	2,22	2,20±0,23 *	0,0104
4-propylguaïacol	0,15	0,99	166	2,71	2,70±0,22 *	0,011
(Z+E)isoeugénol	1,32	0,99	164	2,45	-	0,0052
Somme	7,53	0,99	-	-	-	-

LogP - expression de l'hydrophobie par le logarithme du coefficient de partage n-octanol/eau

(a) valeurs estimées par le logiciel ACD-Lab

(b) valeurs issues de la bibliographie (*Karbowski, T. et al., 2010 ; **Sangster, J., 1989)

Les différences de pentes de régression linéaire (Tableau 56) nous montrent que les composés phénoliques considérés ne se déposent pas tous à la même vitesse au cours du fumage. Ceci ne s'explique pas par les différences d'abondance dans la fumée (déterminée

par analyse directe au chapitre précédent). L'exemple le plus flagrant est celui du syringol : alors qu'il est 3 fois plus concentré que le guaiacol dans la fumée, il se dépose 3 fois moins vite. Ceci est donc une preuve indirecte de ce que les composés phénoliques ne passent pas uniquement dans le produit par un dépôt de particules de fumées, comme déjà montré par plusieurs auteurs (Foster, W.W. & Simpson, T.H., 1961). Si c'était effectivement le cas, alors les écarts de vitesse de dépôt correspondraient aux écarts de concentration dans la fumée.

Cette observation est confirmée par les pressions de vapeur saturante : le syringol possède une pression de vapeur saturante basse, comparée à celle du guaiacol. Sa faible volatilité serait donc bien l'explication de son dépôt moins rapide : lors du fumage il est moins abondant dans la phase gazeuse de la fumée.

Cependant, l'exemple de l'isoeugénol prouve bien que ces phénomènes ne sont pas aussi simples. Alors qu'il est moins abondant que le syringol dans la fumée, et encore moins volatil que lui, il se dépose dans les matrices presque deux fois plus rapidement. Il est donc évident que ce n'est pas uniquement l'étape de relargage des composés à l'état gazeux qui est déterminante, mais également celle de leur adsorption sur le produit.

Notre échelle d'étude n'est pas adaptée à l'élucidation de ces phénomènes complexe. Ceci nécessiterait la prise en compte d'équilibres dynamiques entre des phases physiquement et chimiquement très différentes : particules de goudrons de fumées liquides, phase gazeuse de la fumée, phase aqueuse des matrices et phase grasse des matrices. Extrapoler les phénomènes mis en jeu à partir de nos informations serait au mieux hasardeux. Néanmoins, il reste intéressant de constater que les composés qui se déposent le plus rapidement semblent être plutôt les composés abondants dans la fumée, volatiles (pression de vapeur saturante élevée) et hydrophobes (LogP élevé). Ceci indiquerait que la fraction lipidique des matrices est potentiellement déterminante pour le passage des composés phénoliques vers celles-ci.

XIII.1.1.2. Présence d'huile dans les produits

L'ajout d'huile dans la formulation des matrices a eu un effet significatif pour la plupart des composés phénoliques (niveau de significativité supérieur à 5% pour l'o-crésol et le syringol) : les quantités de composés phénoliques déposés sont plus élevées dans les matrices contenant de l'huile. Par ailleurs, les tests de comparaison multiple montrent qu'il n'y a pas d'effet de la quantité d'huile ajoutée : quelle que soit l'huile considérée, les quantités de phénols déposées pendant le fumage sont les mêmes avec un ajout de 5 et 10 g pour 45 g de pulpe de poisson.

Du point de vue technologique, ce résultat est important puisqu'il montre que le processus de fumage n'est pas le même pour un produit semi-gras et pour un produit maigre. Sur les durées de fumage que nous avons étudiées, ceci peut se traduire par une adsorption en composés phénoliques plus rapide. Par exemple pour le guaïacol : l'augmentation de la concentration moyenne par ajout d'huile de saumon correspond à l'augmentation de concentration moyenne due à un temps de fumage de 28 minutes environ. Il peut donc se révéler utile d'adapter le process industriel de fumage au produit traité, au moins pour des temps de fumage faibles.

Ces résultats concernant la phase grasse du produit sont en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont identifié un plus grand dépôt de composés phénoliques dans des produits plus gras (Rusz, J. & Miler, K.B.M., 1977). Cependant, nos observations ne concordent pas avec l'explication alors apportée par ces auteurs : selon eux, la phase grasse augmenterait le dépôt des composés phénoliques en augmentant le dépôt des particules de fumée à la surface du produit. Or, de même que pour ce qui a été vu avec le temps de fumage, les écarts de comportement des différents composés phénoliques ne semblent pas pouvoir être reliés à leurs abondances respectives dans la fumée. Ceci montre bien qu'ils ne passent pas uniquement dans la matrice alimentaire conjointement (en étant piégés dans les particules de fumées), mais individuellement, certainement *via* la phase gazeuse. L'exemple le plus parlant reste ici aussi celui du syringol qui est majoritaire dans la fumée utilisée, mais qui n'a pas été capté en plus grande proportion dans des matrices contenant de l'huile. Bien que le lien ne soit pas parfaitement établi, les propriétés individuelles de volatilité et d'hydrophobie semblent être déterminantes. Elles justifient notamment le fait que le syringol (dont le logP le plus faible de tous) ne réagisse pas à l'ajout d'huile dans les produits.

Il est par ailleurs important de constater que les différentes huiles testées (arachide, chimère et saumon) n'ont pas engendré les mêmes augmentations de dépôt en composés phénoliques. Bien que les effets considérés individuellement varient d'un analyte à l'autre (Tableau 55), il est possible de classer globalement les huiles selon une « capacité de piégeage des composés phénoliques » croissante : saumon > arachide > chimère.

En partant de la composition des huiles utilisées, il est difficile de relier clairement cette différence d'influence des huiles à leurs teneurs respectives en acides gras. Il est cependant envisageable que les acides gras polyinsaturés aient une importance particulière puisque les huiles de saumon et d'arachide qui piègent le mieux les composés étudiés contiennent plus d'acides gras polyinsaturés. Ces deux huiles se distinguent par ailleurs entre elles sur leurs teneurs respectives en AGPI ω 3 (saumon>arachide) et AGPI ω 6 (arachide>saumon) et par la

longueur de chaîne de leurs AGPI. En effet, l'huile de saumon contient des proportions d'AGPI C20-C22 plus élevées que l'huile d'arachide qui est surtout riche en C18.

Les insaturations présentes sur les AG diminuant leur point de fusion, il est donc envisageable que la fluidité relative des huiles utilisées joue un rôle dans les phénomènes de captation des composés phénoliques. C'est en partie ce qui expliquerait que pour ces résultats l'huile de chimère ait la capacité de piégeage la plus réduite : elle est l'huile qui contient la plus grande proportion d'AGS et AGMI.

Bien qu'il ne soit pas nettement relié à la composition des constituants utilisés, ce résultat reste néanmoins important. Il indique que plusieurs produits « gras » ou « semi-gras » peuvent induire des processus de fumage différents selon la qualité de leur matière grasse. Des informations de ce type pourraient aussi à terme permettre d'adapter l'étape de fumage au produit considéré.

XIII.1.1.3. Ajout d'eau à la formulation des matrices

Les résultats d'analyse de la variance montrent que l'eau ajoutée lors de la formulation des matrices n'a pas eu d'effet qualitatif ou quantitatif sur le dépôt des composés phénoliques lors du fumage (Tableau 55, p.213). Quelle que soit la quantité d'eau ajoutée aux matrices (0, 20 et 40 g pour 45 g de pulpe de poisson), les quantités de composés phénoliques déposées lors du fumage sont identiques.

Ce résultat ne supporte donc pas directement les observations antérieures mettant en avant le rôle de l'eau du produit. Il est cependant important de dire que même si ces résultats divergent, ils ne sont pas nécessairement contradictoires. En considérant la composition globale de nos matrices, les teneurs en eau réelles obtenues (de 65 à 84%, calculées en prenant en compte l'eau apportée par la pulpe de poisson) ne représentent peut-être pas une gamme assez étendue pour pouvoir engendrer des différences de piégeage. Il n'était cependant pas techniquement possible d'étendre notre gamme d'étude (principalement en raison des problèmes de stabilité des matrices au cours de l'expérience). Mais il reste tout de même envisageable que de plus importantes variations de teneur en eau dans le produit puissent modifier le dépôt des composés phénoliques.

De manière générale, les résultats concernant la présence d'huiles et d'eau dans les matrices permettent de remettre en perspective les conclusions d'études antérieures. Pour certains travaux relatifs au processus de fumage, c'est l'eau qui a été utilisée comme milieu

modèle pour piéger les composés de fumage (Foster, W.W. & Simpson, T.H., 1961 ; Foster, W.W. et al., 1961). Les résultats obtenus seraient donc potentiellement à relativiser puisque nos résultats semblent indiquer que la modélisation du fumage en milieux aqueux soit imprécise, étant donné qu'elle ne prend pas en compte le rôle ici évident d'une part lipidique dans le produit.

Lors des premiers temps du fumage, l'enrichissement en composés phénoliques est linéaire. La composition de la matrice influence le processus d'enrichissement en composés phénoliques lors du fumage industriel : les produits contenant de l'huile captent mieux les composés phénoliques. Les huiles de saumon semblent avoir un meilleur effet de captation. Les teneurs en eau testées n'ont pas influencé significativement le dépôt des composés phénoliques.

XIII.2. HAP déposés au cours du fumage

XIII.2.1. Contamination initiale des échantillons et teneur dans les matrices

Le dosage des HAP dans les différents constituants des matrices a montré une contamination initiale non négligeable, en particulier de l'huile de saumon (Tableau 57).

Tableau 57 : Contamination initiale en HAP des constituants des matrices modèle

	Pulpe de poisson	Huile d'arachide	Huile de chimère	Huile de saumon
Phénanthrène	N.Q.	N.Q.	N.Q.	10,98
Anthracène	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1,36
Fluoranthène	0,49	N.Q.	N.Q.	6,85
Pyrène	4,71	N.Q.	0,49	3,42
Benz[a]anthracène	N.Q.	0,03	0,02	2,53
Cyclopenta[c;d]pyrène	N.Q.	0,03	0,08	0,05
Chrysène	0,04	0,08	0,05	3,34
Benzo[k]fluoranthène	N.Q.	N.Q.	0,03	1,16
Benzo[j]fluoranthène	N.Q.	N.Q.	0,04	1,17
Benzo[a]pyrène	0,02	N.Q.	0,09	1,85
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	N.Q.	0,01	0,07	1,50
Dibenz[a,h]anthracène	N.Q.	N.Q.	0,02	0,41
Benzo[g,h,i]perylène	0,01	N.Q.	0,38	1,29
Dibenzo[a,e]pyrène	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,38
Dibenzo[a,i]pyrène	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,30

- Les teneurs sont exprimées en µg/g de constituant

- N.Q. concentration est inférieure à la limite de quantification

Tableau 58 : Quantités de HAP déposés dans les matrices au cours du fumage

Point exp.	Durée de fumage (min)	Huile ajoutée	Quantité d'huile (mL)	Quantité d'eau (mL)	Phénanthrène	Fluoranthène	Pyrène	Benz[a]anthracène	Chrysène	Benzo[b]fluoranthène	Benzo[k]fluoranthène	Benzo[j]fluoranthène	Benzo[a]pyrène	Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	TEQ
M01	30	C	5	0	53,62	52,36	236,98	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,52
M02	30	C	10	0	105,65	38,58	288,23	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,39
M03	30	0	0	10	7,69	4,44	27,22	N.Q.	0,30	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,52	0,33	0,60
M04	30	0	0	20	36,26	4,81	41,58	N.Q.	0,43	0,23	0,48	0,31	1,06	0,79	1,30
M05	30	B	5	20	50,43	30,40	120,66	2,09	2,98	1,34	1,02	0,92	1,98	1,04	2,95
M06	30	B	10	10	94,86	50,29	277,11	0,97	1,60	0,19	N.Q.	N.Q.	1,32	0,77	2,03
M07	30	B	10	0	74,69	29,54	117,82	N.Q.	1,13	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,90	N.Q.	1,21
M08	30	0	0	20	21,19	3,18	5,84	N.Q.	0,29	N.Q.	0,26	N.Q.	0,47	0,20	0,55
M09	30	0	0	0	N.Q.	1,77	6,60	N.Q.	0,26	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,55	0,32	0,60
M10	30	A	5	10	87,73	17,15	105,60	N.Q.	1,35	N.Q.	0,39	0,29	0,84	N.Q.	1,09
M11	30	A	10	20	30,59	19,39	75,15	N.Q.	1,03	0,31	0,85	0,77	1,01	N.Q.	1,41
M12	30	0	0	0	35,33	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,06	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,85	N.Q.	0,85
M13a	60	C	5	10	N.Q.	4,35	43,36	0,96	N.Q.	0,56	N.Q.	1,07	1,35	N.Q.	1,65
M13b	60	C	5	10	1,52	6,00	53,37	0,84	2,90	0,18	0,36	0,69	1,56	0,65	1,92
M13c	60	C	5	10	6,61	1,04	22,44	N.Q.	1,26	N.Q.	0,93	0,19	2,47	0,46	2,65
M14	60	C	10	20	N.Q.	N.Q.	29,23	0,74	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1,37	1,67	0,13	1,90
M15	60	0	0	0	70,77	14,51	32,82	N.Q.	2,74	0,71	N.Q.	N.Q.	0,83	N.Q.	1,08
M16	60	B	5	0	53,40	20,90	20,43	N.Q.	1,29	N.Q.	N.Q.	0,51	N.Q.	N.Q.	0,27
M17	60	B	10	0	31,91	16,17	71,31	1,54	1,27	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1,22	N.Q.	1,54
M18	60	0	0	10	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,29	N.Q.	N.Q.	0,28	0,51	0,88	0,63
M19	60	0	0	20	3,36	N.Q.	N.Q.	1,50	0,93	0,70	0,73	0,80	1,52	0,87	1,98
M20	60	A	5	20	N.Q.	4,05	30,44	1,39	2,78	0,50	0,53	0,54	0,88	N.Q.	1,24
M21	60	A	10	10	32,91	22,29	80,74	2,05	2,98	0,38	0,90	0,99	1,04	0,86	1,81
M22	60	0	0	0	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,00
M23	120	C	5	20	N.Q.	N.Q.	22,76	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,00
M24	120	C	10	10	N.Q.	N.Q.	39,91	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,00
M25	120	C	10	0	N.Q.	N.Q.	41,04	1,90	N.Q.	N.Q.	0,33	0,27	1,10	N.Q.	1,35
M26	120	0	0	20	3,46	N.Q.	N.Q.	1,08	1,69	0,26	0,57	0,35	1,05	0,57	1,35
M27	120	0	0	0	22,39	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,61	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,70	N.Q.	0,71
M28	120	B	5	10	8,62	11,18	31,50	N.Q.	1,94	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1,37	N.Q.	1,50
M29	120	B	5	0	N.Q.	11,49	60,05	1,33	3,46	1,86	1,30	1,20	2,31	1,78	3,21
M30	120	B	10	20	8,66	20,26	92,45	N.Q.	2,40	N.Q.	N.Q.	0,86	1,55	N.Q.	1,87
M31	120	0	0	10	16,56	N.Q.	N.Q.	0,65	0,44	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1,01	N.Q.	1,08
M32	120	0	0	0	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,46	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,59	N.Q.	0,60
M33	120	A	5	0	48,23	15,09	127,17	0,97	1,98	N.Q.	N.Q.	N.Q.	1,05	N.Q.	1,32
M34	120	A	10	0	80,51	29,27	191,32	1,64	4,97	0,50	0,46	0,36	1,24	0,70	1,95
M35	120	0	0	10	47,28	3,24	16,03	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,67	N.Q.	0,70
M36	120	0	0	20	20,24	N.Q.	10,54	N.Q.	N.Q.	N.Q.	0,38	N.Q.	0,61	0,49	0,69

- Les concentrations sont exprimées en µg d'analytes déposés sur la matrice
- Les valeurs sont corrigées pour éliminer la contribution de la contamination initiale des huiles et de la pulpe
- N.Q. composé dont la concentration est inférieure à sa limite de quantification
- Les analytes qui n'ont été quantifiés dans aucun échantillon ne sont pas présentés
- Huiles utilisées : A - Chimère ; B - Arachide ; C - Saumon

Afin de ne pas biaiser les résultats de nos analyses, les données brutes de quantification de HAP dans les matrices ont été corrigées en retranchant aux teneurs en HAP obtenues la part imputable à la pulpe et à l'huile utilisées pour fabriquer chaque matrice. Ce sont ces résultats qui sont présentés dans le Tableau 58 (p.219).

De même que pour les composés phénoliques, les comparaisons avec la fumée expérimentale (Tableau 59) ne seront pas présentées spécifiquement car elles n'apportent pas une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu : il ne semble pas y avoir de lien direct entre la composition de la fumée en HAP et le dépôt de ceux-ci sur les matrices fumées.

Tableau 59 : Composition en HAP de la fumée utilisée

	$\mu\text{g/g}$ de fumée	% sur total
Fluoranthène	8,87	43,96
Pyrène	5,79	28,67
Benz[a]anthracène	0,46	2,29
Cyclopenta[c;d]pyrène	0,95	4,70
Chrysène	0,85	4,22
Benzo[b/j/k]fluoranthène	0,69	3,40
Benzo[a]pyrène	1,45	7,20
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	0,38	1,91
Benzo[g,h,i]perylène	0,74	3,64
TEQ	0,14	-

XIII.2.2. Effets technologiques et de formulation du produit

Avant de procéder aux analyses statistiques, il est important de remarquer que le phénanthrène qui n'avait pas été émis en évidence dans la fumée expérimentale est retrouvé comme étant un HAP majoritaire dans les matrices fumées. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'il est le plus volatil de tous les HAP. Il est donc possible que lors du piégeage des fumées, une portion importante du phénanthrène soit passé à l'état gazeux et n'ait pas été retenue par le piège électrostatique. La proportion restante dans les particules de fumée serait alors trop faible pour la quantification chromatographique.

Dans ce cas là, le fait qu'il soit retrouvé dans les matrices fumées indiquerait encore des mécanismes de fumage « d'adsorption » : un passage préférentiel de la phase gazeuse vers le produit.

Les effets des paramètres expérimentaux sur les quantités de HAP déposés lors du fumage sont dans l'ensemble peu marqués.

Tableau 60 : Résultats d'analyse de la variance et test de comparaison multiple LSD réalisés sur les teneurs en composés phénoliques dans les matrices fumées

	Durée de fumage (min)			Huile utilisée				Eau		
	ANOVA Niveau de significativité	30	60	120	ANOVA Niveau de significativité	Aucune	Chimère	Arachide	Saumon	ANOVA Niveau de significativité
Phénanthrène	0,001	49,84	16,71	18,28	0,021	18,97	46,66	40,32	18,60	0,412
Fluoranthène	< 0,0001	20,99	7,44	6,47	< 0,0001	2,13	17,87	23,78	11,37	0,847
Pyrène	< 0,0001	108,57	32,01	45,20	< 0,0001	9,37	101,74	98,92	86,37	0,594
Benz[a] anthracène	0,026	0,26	0,75	0,54	0,077	0,22	1,01	0,74	0,49	0,531
Chrysène	0,394				0,002	0,57	2,52	2,01	0,46	0,849
Benzo[b] fluoranthène	0,655				0,789					0,902
Benzo[k] fluoranthène	0,621				0,761					0,949
Benzo[j] fluoranthène	0,461				0,207					0,618
Benzo[a]pyrène	0,155				0,047	0,73	1,01	1,33	0,91	0,662
Indéno [1,2,3-c,d]pyrène	0,727				0,316					0,218
TEQ	0,324				0,012	0,85	1,47	1,82	1,15	0,783

- Les niveaux de significativité témoignant d'un effet significatif au risque 5% est signalée en gras
- Les tests LSD ne sont réalisés que si l'effet associé est significatif
- Les valeurs reportées pour les niveaux du test LSD sont les moyennes par modalité de facteur (en µg déposés)
- Les moyennes sur une même ligne ne sont pas significativement différentes au risque 5%
- Les moyennes pour les différents types d'huiles sont calculées sur les matrices contenant 5 et 10 mL, ces deux niveaux n'étant jamais significativement différents au risque 5%

XIII.2.2.1. Durée de fumage

Les variations induites par l'augmentation du temps de fumage sont difficilement interprétables : les teneurs en phénanthrène, fluoranthène et pyrène diminuent fortement entre 30 et 60 minutes de fumage. Etant donné la forte affinité des HAP pour les lipides et leur volatilité limitée, il semble peu probable que cet effet résulte d'un relargage de HAP qui

avaient été déposés entre 0 et 30 minutes. D'autant moins que les conditions à l'intérieur de l'enceinte de fumage sont contrôlées en permanence. Cette diminution n'est donc pas imputable à un changement de partition entre la phase gazeuse et la matrice liée à une modification de l'environnement (en terme par exemple de température ou d'hygrométrie).

Il a été vérifié que cet effet significatif n'était pas un artefact lié à la correction des données de quantification en prenant en compte les contaminations initiales des matrices. Pour cela, des analyses de variance et les tests de comparaison multiples identiques ont été réalisés sur les données de quantification brutes. Celles-ci conduisant aux mêmes résultats (avec des niveaux moyens de HAP plus élevés), nous pouvons en conclure qu'ils ne peuvent donc pas avoir été induits par le calcul de correction des teneurs en HAP.

Il est possible que ces diminutions des teneurs en HAP soient liées à la température des matrices. En effet, les matrices introduites dans le fumoir sont à 4 °C, et vont donc se réchauffer progressivement au cours du fumage, jusqu'à atteindre la température de l'enceinte (32 °C). Le fait que la surface de la matrice soit plus froide en début de fumage entraînerait une condensation d'une fraction du phénanthrène, du fluoranthène et du pyrène présents dans la phase gazeuse de la fumée. Puis, à mesure que la température du produit augmente, l'équilibre de partition solide/gaz se déplace vers le gaz et une partie des HAP présents initialement est libérée par évaporation/désorption.

Cette hypothèse n'est cependant pas soutenue par des données bibliographiques. En effet, la plupart des cinétiques de fumage réalisées par les auteurs sont faites sur des temps de fumage beaucoup plus long pour lesquels le produit est considéré comme étant en équilibre thermique avec l'enceinte de fumage.

Le comportement différent du benz[a]anthracène (dont la quantité déposée sur les matrices augmente au cours des 60 premières minutes de fumage) n'est pas contradictoire avec les résultats précédents. Celui-ci étant moins volatil que le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène, il n'est pas aberrant de constater qu'il se comporte différemment : il se répartira moins dans la phase gazeuse, et proportionnellement plus dans la phase particulaire. Ainsi, si l'on impute les variations des HAP plus légers à des phénomènes de sorption se produisant entre la phase gazeuse et la matrice, les variations de benz[a]anthracène sont plutôt dues à des dépôts particuliers. Plus la durée de fumage est longue, plus la quantité cumulée de particules déposée à la surface des matrices est grande, plus la quantité de benz[a]anthracène est importante dans le produit.

Il est alors surprenant de ne pas constater de variation des autres HAP plus lourds, dont le passage vers le produit dépendrait du même processus de dépôt particulaire. Par exemple, le benz[a]pyrène qui est trois fois plus abondant dans la fumée expérimentale devrait se déposer trois fois plus vite. Or, l'analyse statistique ne montre pas d'évolution significative de la teneur en benzo[a]pyrène au cours des 120 premières minutes de fumage.

Plus largement, il est surprenant de ne pas identifier de lien apparent entre les teneurs de la fumée en HAP et les dépôts de ceux-ci. De nombreux auteurs (Rusz, J. & Miler, K.B.M., 1977 ; Sirami, J., 1981) ont décrit le dépôt des HAP comme un dépôt particulaire, il serait logique de retrouver dans les produits des ratios de concentrations de HAP correspondant à ceux de la fumée. Il est possible que cette incohérence apparente des résultats soit en partie imputable aux faibles quantités de HAP rencontrées dans cette étude. En effet, plus les quantités en analytes sont réduites, et plus il est difficile d'observer des variations significativement représentatives des phénomènes sous-jacents impliqués.

XIII.2.2.2. Présence d'huile dans les produits

L'effet de l'ajout des différentes huiles est également moins marqué pour les HAP que pour les composés phénoliques. Il reste néanmoins plus déterminant et mieux interprétable que l'effet de la durée de fumage : la présence d'huile dans les produits a globalement mené à des plus fortes teneurs en HAP. Ceci indique donc que des produits gras et semi-gras seront plus contaminés en HAP que des produits maigres à l'issue d'une opération de fumage comparable.

Ceci est par exemple notable pour le pyrène dont la concentration dans les produits contenant de l'huile est pratiquement dix fois supérieure à celle retrouvée dans les produits maigres. Par ailleurs, conformément à ce qui a été mis en évidence pour les composés phénoliques, quelle que soit la quantité d'huile ajoutée, les quantités de HAP déposées pendant le fumage sont les mêmes avec des ajouts de 5 et 10 g pour 45 g de pulpe de poisson.

Du point de vue industriel, cela confirme l'importance d'adapter le procédé de fumage à la composition du produit traité que nous avons envisagée grâce aux résultats concernant les composés phénoliques. Si la réduction du temps de fumage d'un produit gras peut se révéler intéressante du point de vue aromatique (aromatization comparable sur une durée de traitement inférieure) elle peut également être déterminante pour la qualité sanitaire finale du produit. Ceci est d'autant plus vrai que les TEQ calculés à partir des teneurs en HAP des

produits modèles ont également été significativement augmentés par la présence d'huile dans les produits.

Par ailleurs, le fait que les différents HAP étudiés n'évoluent pas tous dans les mêmes proportions avec l'apport en huile dans les produits indique ici aussi que leur passage vers la matrice ne se fait pas exclusivement avec le dépôt des particules. Ce résultat n'est pas surprenant pour les congénères les plus légers qui sont éventuellement susceptibles de passer à l'état gazeux dans les conditions de l'expérience. Nous pouvons cependant remarquer que parmi les HAP considérés comme « lourds », le benzo[a]pyrène, est également plus présent dans les produits contenant de l'huile.

Il faut également souligner que les différentes huiles testées ne montrent pas la même « capacité de piégeage des HAP » : arachide > chimère > saumon. De même que pour les composés phénoliques, il ne semble pas y avoir de lien évident entre les différences de teneurs en HAP constatées et les compositions des huiles en acides gras. Même si nous pouvons constater que les huiles qui piègent le moins de HAP sont celles qui contiennent moins d'acides gras à longue chaîne, cette différence ne semble pas si déterminante que cela. En effet, les différences de composition de ce point de vue sont plus faibles entre l'huile de saumon et de chimère alors qu'en terme de piégeage, les écarts sont plus réduits entre l'huile d'arachide et de chimère.

Le fait que l'huile qui piège le moins efficacement les HAP soit également celle qui retient le mieux les composés phénoliques (huile de saumon) pourrait se révéler intéressant du point de vue du choix du produit à fumer. En effet, les teneurs en acides gras du muscle de poisson dépendent en partie de facteurs environnementaux (comme l'alimentation) et physiologiques (comme l'âge ou le sexe) (Geri, G. et al., 1995 ; Martin, J.F. et al., 1995 ; Moreira, A.B. et al., 2001). Une meilleure compréhension du rôle de la composition de la matière grasse lors du fumage pourrait donc être à la base de recommandations permettant d'améliorer la qualité du produit fumé (teneurs plus élevées en composés phénoliques et plus réduites en HAP) par une sélection appropriée du produit frais.

XIII.2.2.3. Ajout d'eau à la formulation des matrices

Au risque de se tromper de 5%, l'eau ajoutée lors de la formulation des matrices n'a pas eu d'effet qualitatif ou quantitatif sur le dépôt HAP (Tableau 60). Quelle que soit la quantité

d'eau ajoutée aux matrices (0, 20 et 40 g pour 45 g de pulpe de poisson), les quantités de HAP déposées lors du fumage sont statistiquement identiques.

Bien que les HAP soient plutôt hydrophobes, cette absence d'effet est tout de même à considérer avec circonspection. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la gamme de teneur en eau globale couverte par notre plan d'expérience reste modérément étendue (de 65 à 84%). L'eau étant toujours le composé majoritaire des matrices, il est envisageable que des essais réalisés avec des matrices présentant par exemple de très faibles teneurs en eau ne concordent pas avec les nôtres.

Bien que les résultats soient moins marqués que pour les composés phénoliques, la composition de la matrice alimentaire influence effectivement le processus de dépôt des HAP lors du fumage. Les produits contenant des huiles (plus particulièrement, une huile d'arachide ou de chimère) ont mieux capté la plupart des analytes étudiés.

XIII.3. Conclusions

Les expériences réalisées ont permis d'établir sans ambiguïté que des différences de composition de matrices alimentaires induisent des modifications du processus de fumage, considéré sous l'angle de l'enrichissement en composés de la fumée.

Dans les gammes de composition étudiées, c'est principalement la part lipidique des matrices formulées qui a joué un rôle important. Sa présence dans les produits a significativement augmenté le piégeage des composés étudiés. En terme de rétention des analytes, ce résultat se comprend bien puisque tous les composés étudiés sont relativement lipophiles ($\text{LogP} > 0$). Les différences constatées entre les trois huiles n'ont pas été complètement comprises grâce à leurs compositions respectives, soulignant ici aussi la complexité du processus de fumage : les différentes familles chimiques ne réagissant pas de la même façon aux variations de composition des produits testés.

Il est possible qu'une l'absence de certains résultats pourtant attendus (notamment l'augmentation des teneurs en HAP au cours du fumage) soient imputables à la durée d'exposition globalement réduite. Cependant, il était important de nous placer sur des cinétiques courtes, pour pouvoir mieux considérer les phénomènes d'interaction initiaux entre la fumée et le produit. Il est possible que notre échelle de temps ne soit pas adaptée à l'analyse simultanée de nos deux familles chimiques cibles, l'évolution des HAP se déroulant sur des temps plus longs.

XIV. Mise au point d'une technique d'évaluation des interactions gaz/solide

XIV.1. Nécessité d'une nouvelle approche scientifique

La méthode la plus connue et employée pour distinguer le dépôt gravimétrique des particules de fumée et l'adsorption directe de sa phase gazeuse lors du fumage est celle employée dans l'expérience fondatrice de Foster et Simpson (Foster, W.W. & Simpson, T.H., 1961).

L'utilisation de la précipitation électrostatique pour obtenir une fumée purement « gazeuse » possède cependant quelques inconvénients qui peuvent être considérés comme les limitations de cette méthodologie. D'une part, il n'est pas possible de s'assurer que l'épuration électrostatique est efficace à 100% sans étudier instrumentalement la granulométrie de la fumée « gazeuse » obtenue (par diffraction laser par exemple). D'autre part, les dispositifs expérimentaux mis en place étant dynamiques, l'apparition de particules de fumées après épuration (par nucléation de la phase gazeuse) reste envisageable.

Qui plus est, l'utilisation de fumées produites par pyrolyse impose à l'expérimentateur des contraintes en terme de composition de celles-ci. Bien qu'il soit possible d'influencer la composition des fumées produites par un choix judicieux de conditions de production, obtenir une fumée dont la composition est prédéterminée reste impossible à l'heure actuelle.

Afin de s'affranchir de ces considérations pour l'étude des phénomènes de sorptions se déroulant pendant le processus de fumage, une nouvelle méthodologie a été mise en place. Plutôt que de générer une fumée et d'en éliminer la phase particulaire avant d'y exposer les échantillons, nous avons choisi de produire artificiellement une phase gazeuse contenant les mêmes composés que ceux présents dans la phase gazeuse de la fumée pour y exposer des échantillons.

XIV.2. Mise en place et validation de la méthode

La mise en place et la validation de notre méthodologie est présentée ci-après de manière volontairement linéaire, afin de faciliter la compréhension de la démarche, et la justification des choix qui ont été effectués.

Cette description ne rend cependant pas compte de la réalité du cheminement suivi et de l'ensemble des essais réalisés. Comme dans tout développement méthodologique, de

nombreux paramètres sont susceptibles d'interagir, et il n'est pas toujours possible de tous les prendre en compte au premier abord. Par ailleurs, certains éléments méthodologiques déterminés lors des derniers stades de la mise au point peuvent exiger de modifier des choix précédents.

La plupart des essais ont été réalisés sur un nombre réduit de composés phénoliques (phénol, guaiacol, 4-vinylguaiacol et 4-propylguaiacol), mais l'ensemble de la méthode définitive a été ensuite validée pour chacun des 14 composés phénoliques intégrés à l'étude.

XIV.2.1. Choix d'une méthode d'analyse

L'estimation des phénomènes de sorption peut être envisagée sous deux angles différents (Figure 82). Comme pour le fumage réel, il est concevable de doser les composés volatils captés par l'échantillon lors de son exposition à l'espace de tête enrichi. Cependant, contrairement à la fumée, les espaces de tête enrichis ne possèdent pas le « réservoir » de composés volatil qu'est la phase particulaire de la fumée. De ce fait, les quantités adsorbées par les échantillons sont limitées par la quantité initialement présente dans l'espace de tête. Comme par ailleurs, les expérimentations à échelle réduite ont été privilégiées, les quantités de composés adsorbées et la taille des échantillons sont extrêmement limitées. Les méthodes d'extraction à partir de l'échantillon comme la SDE sont donc *a priori* mal adaptées à notre objectif.

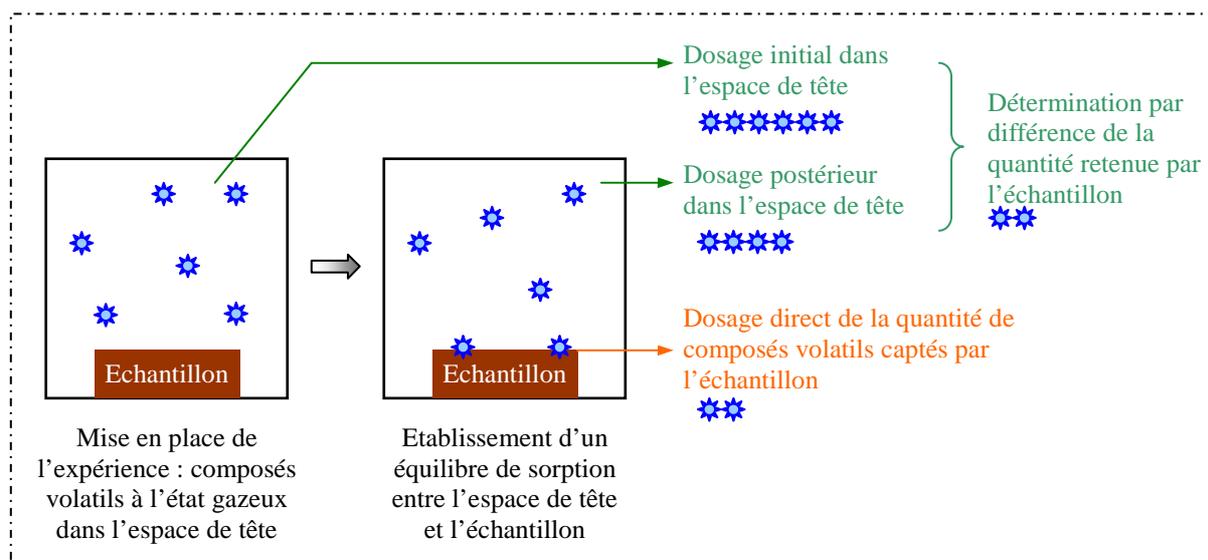


Figure 82 : Estimation directe et indirecte des phénomènes de sorption

Nous avons donc choisi d'analyser les phénomènes de sorption à travers la composition de l'espace de tête : en dosant directement les composés volatils à l'état gazeux dans l'espace de tête avant et après exposition d'un échantillon, il est possible de déterminer la proportion qui a été captée par celui-ci.

La technique de choix pour ce type d'analyse est l'échantillonnage direct de l'espace de tête (DHS). En effet, celle-ci permet de connaître la composition de l'espace de tête à un instant précis, ce qui permettrait dans notre cas de pouvoir envisager l'étude de cinétiques d'adsorption précises. Par ailleurs, elle est quantitative et n'induit pas de biais en n'appauvrissant pas significativement l'espace de tête lors de l'échantillonnage.

Il n'a cependant pas été possible d'utiliser cette technique, en raison de sa trop faible sensibilité : celle-ci n'a pas permis l'analyse fiable de toutes la gamme de concentration des espaces de tête générés. En particulier, après exposition d'échantillons, les composés volatils ne sont plus détectables dans l'espace de tête (Figure 83).

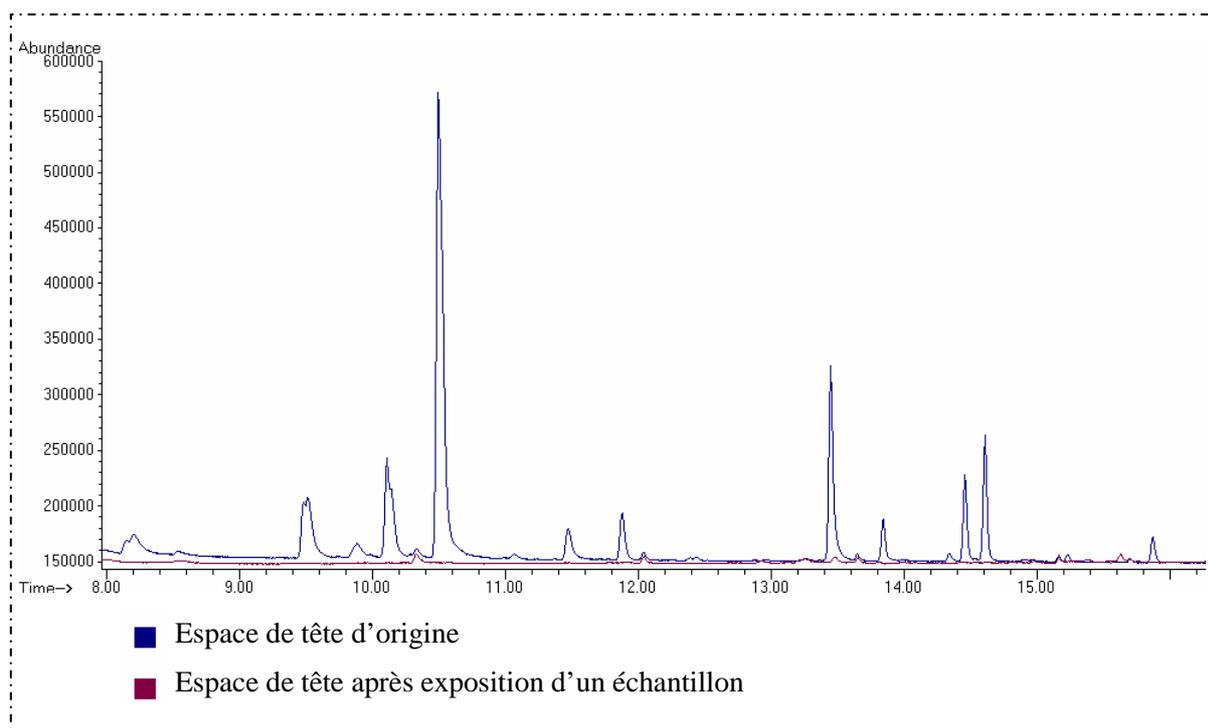


Figure 83 : Comparaison des chromatogrammes obtenus par échantillonnage direct d'espaces de tête enrichis avant et après exposition d'un échantillon

Les espaces de tête enrichis ont donc été analysés après micro extraction en phase solide. Ceci induit nécessairement un biais dans l'analyse qui doit être pris en considération. Au cours du temps d'extraction, la fibre piège les composés à l'état gazeux, réduisant leur

concentration dans l'espace de tête. Il est donc possible qu'il y ait un relargage de composés volatils piégés par l'échantillon, si cet appauvrissement inverse l'équilibre de sorption solide/gaz pré-établi. C'est pour cela que le temps d'extraction utilisé doit être le plus court possible, afin de représenter au mieux l'état de l'espace de tête au moment de l'introduction de la fibre.

L'analyse des phénomènes de sorption est réalisée indirectement par étude de la diminution de concentration des analytes dans l'air environnant le produit.

La concentration des composés dans l'air à l'état gazeux est estimée par HS-SPME.

XIV.2.2. Choix du matériel utilisé

XIV.2.2.1. Génération de l'espace de tête enrichi

Il est envisageable d'utiliser des seringues à gaz pour utiliser des espaces de tête préalablement enrichis en composés volatils, par exemple par simple évaporation de standards purs (Figure 84). Cependant, cette méthode est techniquement limitée car elle peut induire des pertes liées au transfert de phases gazeuses (condensation sur les parois des seringues, espace mort de seringue à gaz, etc.) et nécessiter l'utilisation de récipients sous vide partiel (pour éviter les surpressions excessives).

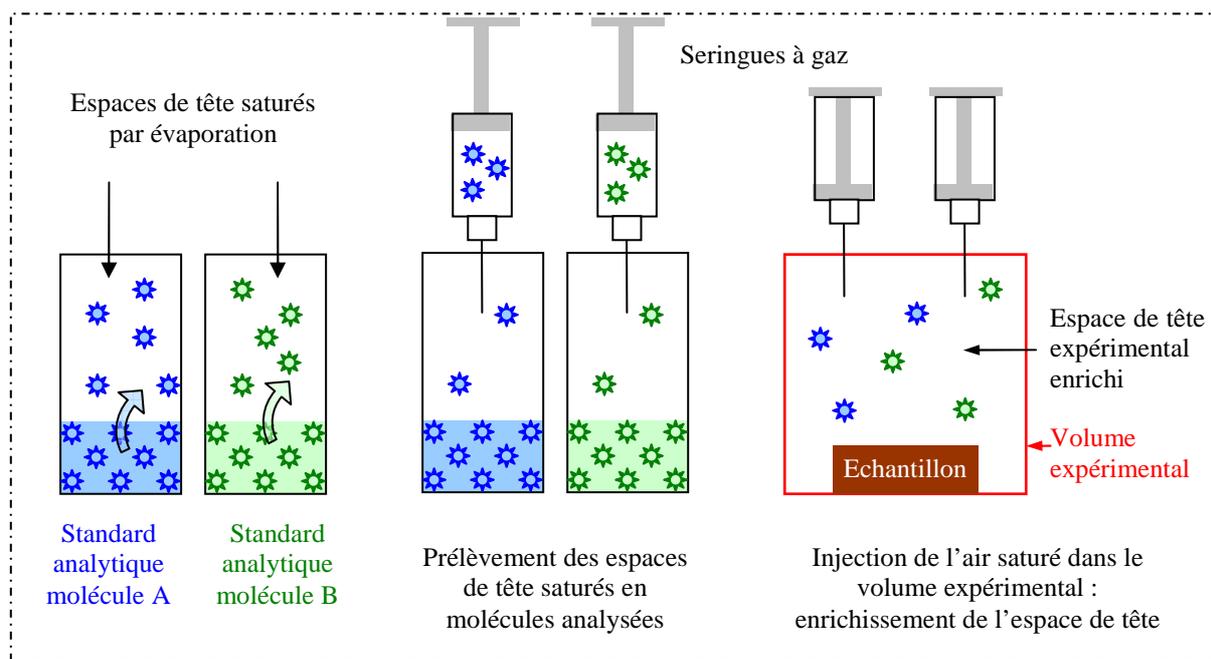


Figure 84 : Enrichissement de l'espace de tête expérimental par prélèvement d'espaces de têtes saturés

Il a donc été décidé de procéder à l'enrichissement de l'espace de tête après que le volume expérimental ait été hermétiquement clos. Pour cela, une solution contenant les molécules volatiles à analyser est introduites dans le volume expérimental et celui-ci est immédiatement fermé hermétiquement. C'est ensuite l'évaporation de la solution qui entraîne l'enrichissement de l'espace de tête en composés volatils (Figure 85).

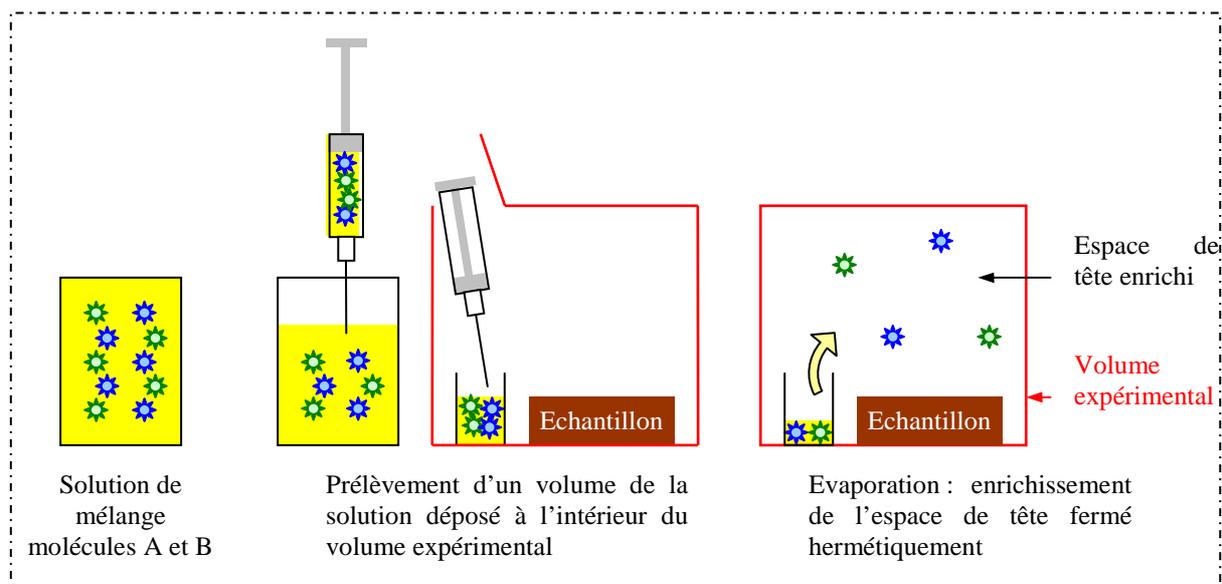


Figure 85 : Enrichissement de l'espace de tête du volume expérimental par évaporation d'une solution de mélange

Afin de ne pas avoir dans le volume expérimental de « réservoir » comparable à la phase particulière de la fumée, le volume de solution introduit doit être le plus réduit possible, afin que la totalité puisse s'évaporer (si le volume de solution est trop élevé, l'évaporation s'équilibre lorsque la pression partielle saturante est atteinte dans le volume expérimental).

Par ailleurs, le volume expérimental doit être réduit au maximum. D'une part, un volume réduit permet d'obtenir des concentrations plus élevées dans l'espace de tête à partir des mêmes volumes de solutions et de standards analytiques. D'autre part, un volume réduit permet d'obtenir des conditions internes le plus uniformes, principalement en terme de température de l'espace de tête.

Les expériences ont donc réalisées directement dans des vials de SPME de 20 mL. Ceci permet par ailleurs d'utiliser le four d'incubation du passeur d'échantillon pour thermostatier les échantillons à la température souhaitée.

Les expériences ont été réalisées en générant des espaces de tête enrichis à l'intérieur de vials expérimentaux par évaporation de solutions concentrées en composés volatils

XIV.2.2.2. Exposition des échantillons

Etant donné qu'il n'est pas possible de déterminer a priori la capacité d'adsorption des matrices à tester, il doit être possible d'ajuster la surface d'échantillon exposée à l'espace de tête. C'est dans ce but que deux dispositifs ont été mis au point.

Un dispositif d'accrochage en acier inoxydable (Figure 86-A) permet de maximiser la surface d'échantillon en contact avec l'espace de tête. Il s'agit alors de placer un échantillon cylindrique verticalement au centre du vial. En fonction de la hauteur de l'échantillon utilisé, sa surface exposée à l'espace de tête peut atteindre les 24 cm².

Dans le cas où la surface exposée doit être plus réduite, l'échantillon peut être disposé dans une coupelle en verre cylindrique (9,6 mm de diamètre, 6 mm de profondeur) placée au fond du vial (Figure 86-B). La surface exposée à l'espace de tête est alors beaucoup plus réduite et normalisée à 0,73 cm².

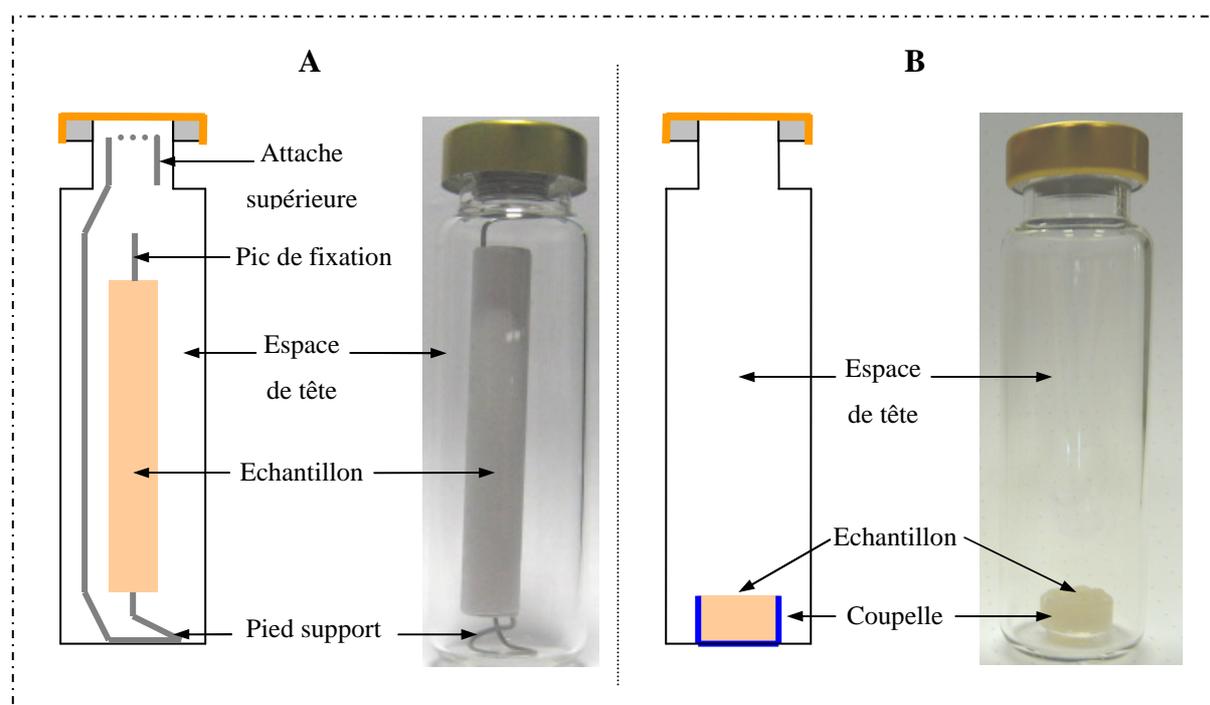


Figure 86 : Dispositifs disponibles pour exposer les échantillons à l'espace de tête enrichi

Afin de prendre en compte la diminution de volume de l'espace de tête que provoque la mise en place d'échantillons volumineux, des pièces de matériaux inertes (PTFE ou verre) calibrées peuvent être utilisées pour être disposées à la place de l'échantillon. Il est ainsi possible de générer des espaces de tête « de référence » (sans échantillon) dans les conditions parfaitement identiques à celles des espaces de tête « expérimentaux » (exposés à un échantillon).

Les résultats présentés pour cette étude ont été réalisés uniquement en utilisant le système de coupelles de verre. En effet, les essais préliminaires ont montré que la grande surface exposée par l'autre dispositif entraîne un piégeage excessif des composés volatils gazeux. Quelle que soit la concentration de l'espace de tête testée, il n'a pas été possible de détecter de composés phénoliques dans l'espace de tête après exposition de l'échantillon. Il n'est alors pas possible de comparer la capacité d'adsorption des échantillons sur la base de la fraction laissée libre à l'issue de l'expérience.

Par ailleurs, l'utilisation des coupelles permet de mettre en œuvre d'échantillons liquides dans des conditions comparables à celles d'échantillons solides, ce qui nous a permis de comparer la capacité d'adsorption d'huiles à celle de matrices solides.

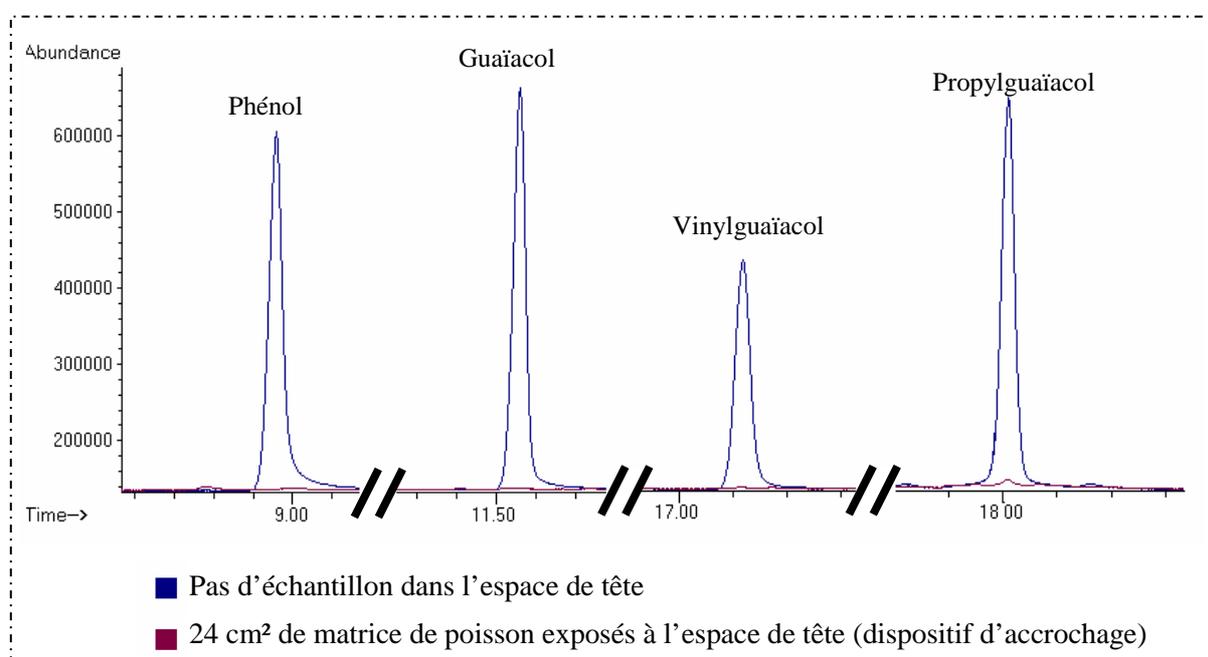


Figure 87 : Comparaison des chromatogrammes obtenus par SPME d'espaces de tête enrichis avec et sans exposition d'échantillon de 24 cm²

XIV.2.3. Conditions de génération des espaces de tête

XIV.2.3.1. Température

La température à laquelle les expériences sont conduites doit permettre de se rapprocher au mieux des conditions de fumage réelles. Elle est cependant limitée par la gamme de températures effectivement atteignable techniquement avec l'appareillage utilisé. Ainsi, les expériences ont toutes été réalisées à 35 °C, température d'incubation minimale du passeur d'échantillon.

XIV.2.3.2. Solution d'enrichissement

L'eau et le méthanol ont été testés comme solvant de la solution d'enrichissement. A des concentrations de composés phénoliques et des volumes utilisés identiques, le méthanol et l'eau permettent d'obtenir les mêmes résultats. Ceci indique que les phénomènes de vaporisation sont globalement les mêmes dans les deux cas. Le méthanol a donc été préféré, car les composés phénoliques étudiés y sont plus solubles, ce qui permet d'avoir une solution d'enrichissement plus concentrée. Ceci permet de minimiser d'autant les volumes de solution utilisés et donc les variations de pression dans l'espace de tête enrichi.

Pour vérifier que ce résultat n'est pas faussé par une éventuelle saturation de la fibre par le méthanol vaporisé dans l'espace de tête, le même essai a été réalisé avec des ajouts de méthanol dans le vial : les pics chromatographiques des différents composés phénoliques extraits de l'espace de tête restent constant quelle que soit la concentration de méthanol dans l'espace de tête.

Afin de pouvoir faire varier la concentration de l'espace de tête enrichi, il est possible d'envisager deux approches lors de l'ajout de la solution d'enrichissement dans le vial : différents volumes de la même solution d'enrichissement ou un volume unique de solutions de concentrations différentes.

Il a été choisi d'utiliser plusieurs solutions de concentrations différentes avec un volume constant. D'une part, ceci permet d'obtenir des conditions identiques dans toutes les expériences (en particulier pour ce qui est de l'augmentation de pression dans le vial et de la quantité de méthanol gazeux présent dans l'espace de tête). D'autre part, la comparaison de gammes d'enrichissements réalisés en « volume constant » et « concentration constante » montre qu'utiliser des volumes croissants d'une même solution de composés phénoliques ne permet pas d'obtenir un enrichissement linéaire de l'espace de tête.

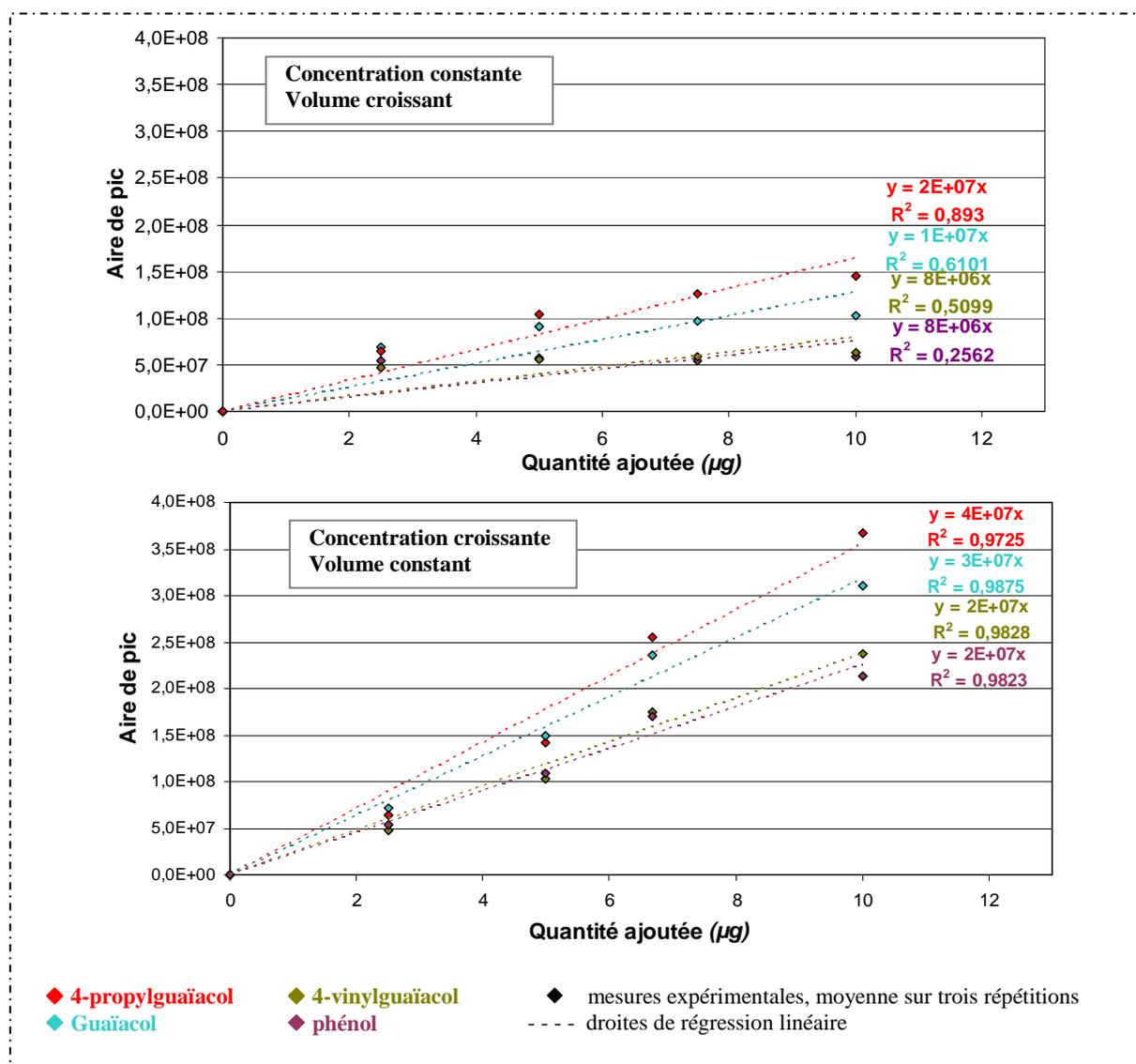


Figure 88 : Comparaison des gammes d'enrichissement avec des solutions de concentration et volume variables

Le volume utilisé a été fixé à 5 µL. Il correspond au volume minimal pouvant être redéposé directement dans le vial sans difficulté pratique. Des volumes plus faibles peuvent en effet conduire à des phénomènes d'adhérence de goutte à l'embout de la pipette utilisée. Le volume effectivement transféré dans le vial est alors parfois inférieur au volume prélevé, ce qui se traduit par une chute de la répétabilité.

Plusieurs essais ont été réalisés en déposant la solution d'enrichissement à différentes hauteurs à l'intérieur du vial expérimental et en utilisant différents supports : plastique, aluminium anodisé, verre et PTFE. Il en ressort que la localisation du dépôt n'a aucune

influence sur l'intensité de la réponse chromatographique obtenue : quel que soit le point de vaporisation de la solution, il en résulte un espace de tête homogène. Par contre, le matériau du support de dépôt a une grande influence sur l'espace de tête généré (Figure 89). Ceci peut s'expliquer par des différences d'effusivité thermique des supports (qui résultent en des phénomènes d'évaporation différents selon le support de dépôt de la solution) ou plus probablement, par l'adsorption d'une partie des molécules volatiles de la solution à la surface des supports les moins inertes.

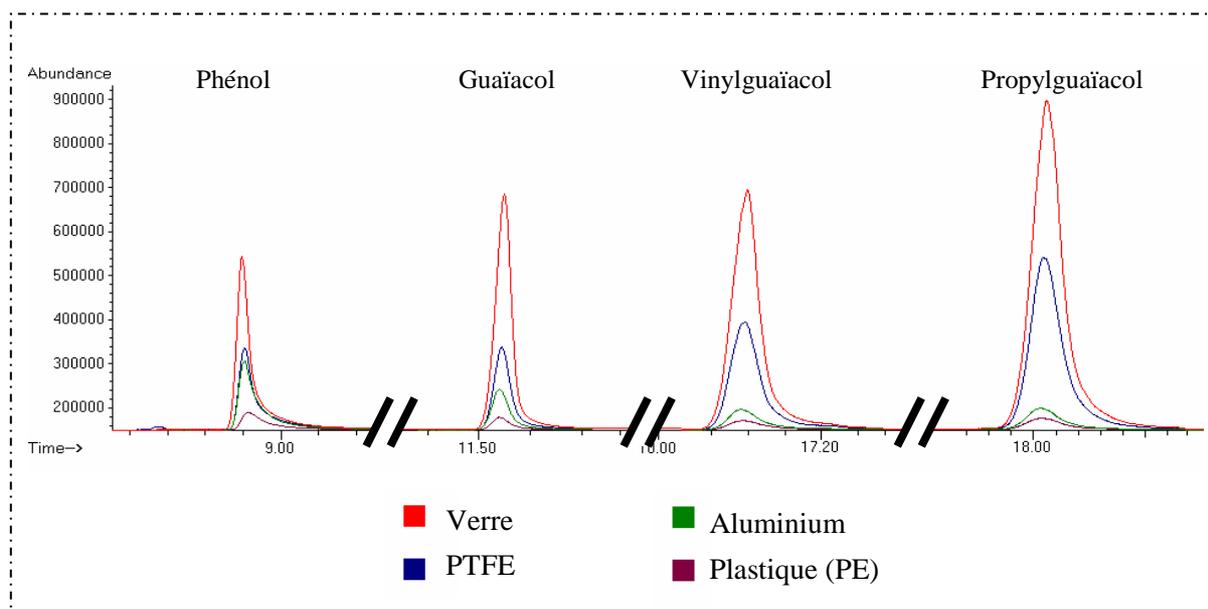


Figure 89 : Réponse chromatographique obtenue par HS-SPME/GC-FID en fonction du matériau de dépôt de la solution de composés phénoliques

Le dépôt sur le verre permettant de maximiser la concentration des molécules volatiles dans l'espace de tête, il a été choisi de déposer directement la solution d'enrichissement sur la paroi interne du vial expérimental.

XIV.2.3.3. Temps d'équilibrage de l'espace de tête

Estimer le temps exact nécessaire à l'établissement de l'équilibre à l'intérieur du vial expérimental n'a pas été possible à cause de l'utilisation de la SPME. En effet, si la vaporisation des composés de la solution n'est pas terminée au moment où l'extraction comment, elle peut se poursuivre pendant toute la durée de l'extraction. L'échelle d'étude de cette cinétique associée à la vaporisation de la solution d'enrichissement est donc limitée par la durée minimale d'extraction.

Différents essais (temps d'équilibre et temps d'extraction variable) nous ont cependant permis de déterminer que l'équilibre est atteint en moins de deux minutes après l'introduction de la solution dans le vial.

XIV.2.3.4. Conditions d'extraction SPME

En accord avec la bibliographie, ce sont des fibres en polyacrylate qui ont été utilisées, celles-ci étant décrite comme étant la plus appropriée à l'étude des composés phénoliques (Sérot, T. & Lafficher C., 2003 ; Guillén, M.D. et al., 2006).

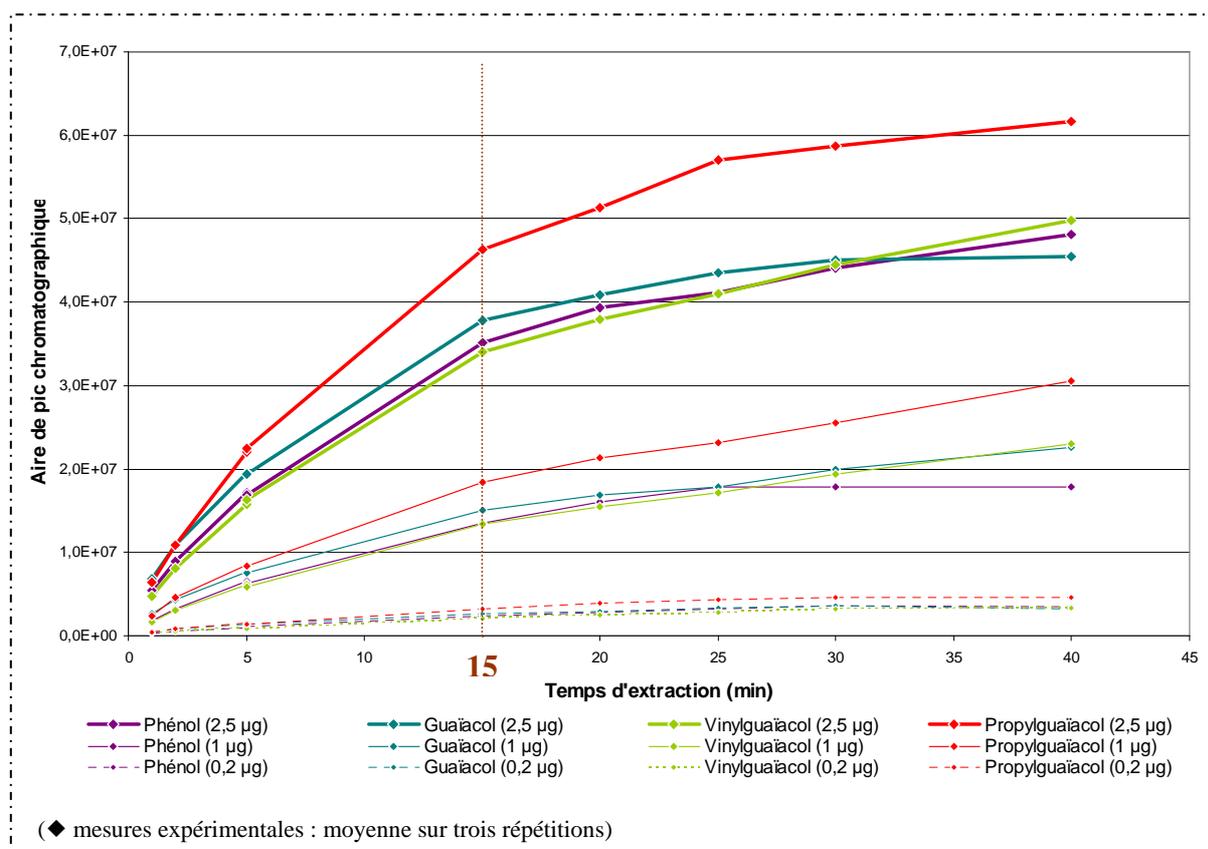


Figure 90 : Effet du temps d'extraction sur la réponse chromatographique d'espaces de tête enrichis avec différentes masses de quatre composés phénoliques

A partir d'essais réalisés avec différents temps d'extraction sur des espaces de têtes à plusieurs concentrations (Figure 90), le temps d'extraction a été fixé à 15 minutes. Quelle que soit la concentration de l'espace de tête, au-delà de cette durée, le gain de signal chromatographique devient plus faible. Il ne justifie alors pas de prolonger l'extraction au risque de perturber d'avantage l'équilibre de sorption échantillon/espace de tête. Par ailleurs, de temps d'extraction plus courts restituent moins bien les écarts de concentrations pouvant

exister entre différents espaces de tête et ne permettent pas toujours l'analyse des espaces de tête les plus dilués.

Des essais réalisés après exposition de divers échantillons aux espaces de têtes enrichis ont montré par ailleurs que quel que soit le temps d'extraction, les aires de pics chromatographiques « après adsorption » sont toujours largement inférieures aux aires « de référence ». Ceci montre bien que l'appauvrissement de l'espace de tête lors de la phase de HS-SPME ne génère pas un relargage massif depuis la surface de l'échantillon (ce qui signifierait que l'équilibre de sorption échantillon/espace de tête a été significativement déplacé vers l'espace de tête).

XIV.2.3.5. Calibration linéaire

Par ailleurs, afin de pouvoir assurer que la réponse chromatographique obtenue représente bien une concentration de composés phénoliques dans l'espace de tête, des essais ont été réalisés sur une large gamme de concentration (de 0,002 à 10 µg introduits dans le vial expérimental). Le début de la zone de saturation se trouve au delà de 2,5 µg pour l'ensemble des composés étudiés.

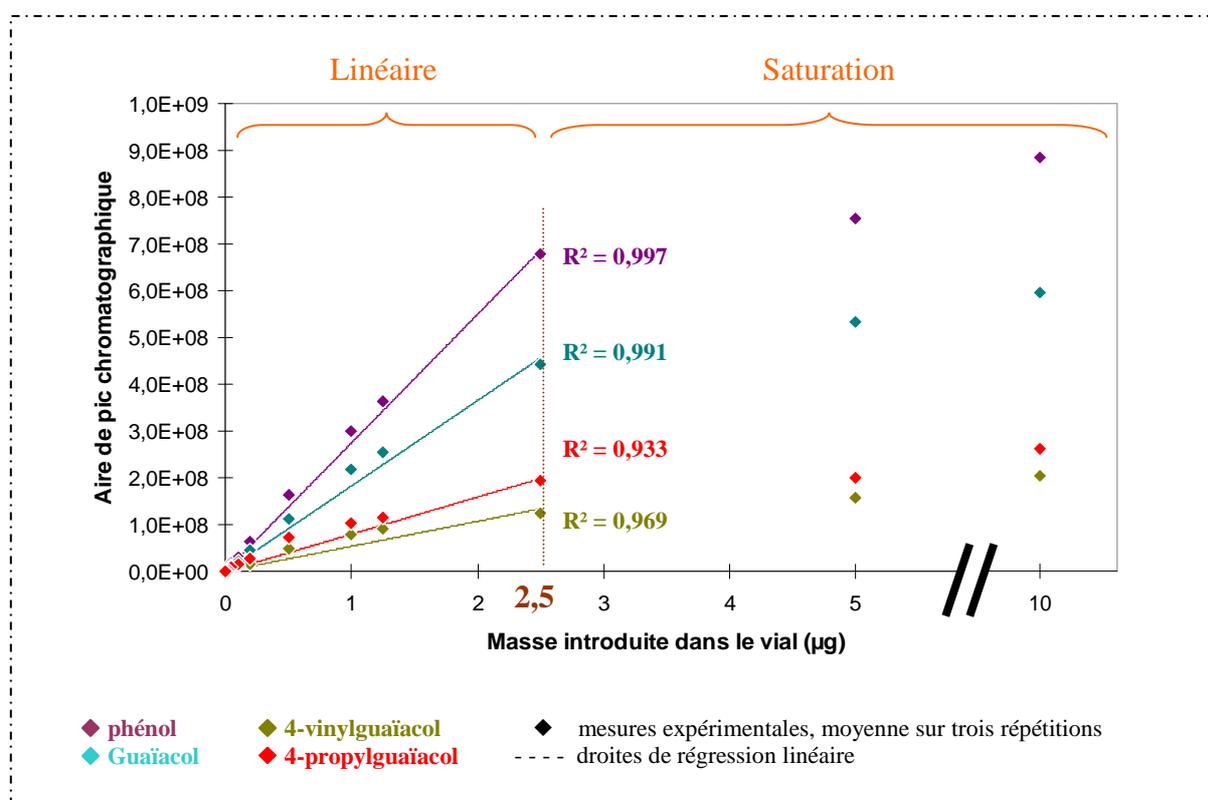


Figure 91 : Identification du domaine de réponse linéaire

L'ensemble des expérimentations a donc été réalisé en utilisant une solution d'enrichissement à 0,5 g/L dont les 5 μ L introduit dans le vial correspondent à 2,5 μ g de chacun des composés phénoliques. Ceci permet de garantir que l'ensemble des réponses chromatographiques observées appartient au domaine linéaire.

Afin de garantir la fiabilité des analyses ultérieures, l'ensemble des fibres utilisées pour ce type d'études a été testé pour vérifier leur répétabilité et leur linéarité de réponse dans le domaine d'étude.

La répétabilité est évaluée en calculant le coefficient de variation des aires de pic de chaque composé phénolique obtenues sur 5 répétitions à trois concentrations d'espace de tête différentes (0,2 ; 1 et 2,5 μ g introduits dans le vial). Les fibres donnant au moins un coefficient de variation (pour un analyte, pour une concentration d'espace de tête donnée) supérieur à 10% n'ont pas été utilisées.

La linéarité de réponse est testée en réalisant en triplicat l'extraction des 9 points de la gamme linéaire (0,002 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 1,25 et 2,5 μ g introduits dans le vial). Les fibres donnant au moins un coefficient de corrélation linéaire (pour un analyte, pour l'ensemble de la gamme) inférieur à 95% n'ont pas été utilisées.

La méthode d'analyse mise en place est utilisable pour l'estimation des phénomènes de sorption se déroulant entre un espace de tête statique dans la gamme de fonctionnement déterminée. Elle répond dans l'ensemble aux exigences préétablies :

- *sensibilité du signal à la concentration des composés à l'état gazeux ;*
- *sensibilité du signal à la surface d'échantillon exposée ;*
- *linéarité de réponse du signal ;*
- *répétabilité de la mesure ;*
- *reproductibilité de la mesure.*

XIV.3. Conclusions

L'ensemble de cette mise au point nous a permis d'aboutir à une méthode d'étude grâce à laquelle il est possible d'évaluer l'intensité des phénomènes d'adsorption des composés volatils présents à l'état gazeux dans l'espace de tête d'un échantillon.

Celle-ci est applicable à une grande variété d'échantillons liquides ou solides. Elle n'a été validée ici que pour un ensemble de composés phénoliques, mais reste parfaitement

envisageable pour une large gamme de composés volatils susceptibles d'être évaporés significativement à température et pression ambiante.

XV. Influence de la composition d'une matrice alimentaire sur la sorption de composés phénoliques à l'état gazeux

XV.1. Adsorption

Les résultats d'analyses statistiques concernant l'étude de l'adsorption des composés phénoliques par des matrices modèles de composition variable sont présentés dans le Tableau 61. Les expériences ont été réalisées dans des espaces de tête où ont été introduit 2500 ng de chacun des analytes étudiés, soit 37500 ng de composés phénoliques.

Parmi les composés dont les phénomènes de sorptions ont été comparables quelque soit la matrice testée (niveau de significativité de l'analyse de la variance supérieure à 0,05), il y a deux cas à distinguer.

- ♦ Pour le phénol et le p-crésol aucun effet significatif de la teneur en eau, en huile, ou en gélatine n'a pu être identifié car pour l'ensemble des expériences ces trois composés ont été presque totalement piégés (en moyenne 95% des 2500 ng équivalents introduits dans le vial). Les variations de quantités restantes dans les vials sont donc particulièrement faibles. Il faut donc considérer l'absence d'effet comme une très forte affinité pour l'ensemble des produits testés.

- ♦ Le 3-éthylphénol, par contre, n'est pas piégé dans d'aussi grandes proportions par les matrices (en moyenne 76% des 2500 ng équivalents introduits dans le vial). Les variations de sa concentration dans l'espace de tête n'ont statistiquement pas été influencées par la formulation des matrices. Il semblerait cependant que cette absence de résultat significatif soit plutôt imputable à une plus faible répétabilité de l'analyse pour ce composé. En effet, le coefficient de variation calculé pour les 3 répétitions de chaque point expérimental est en moyenne de 10,1% pour le 3-éthylphénol alors qu'il ne dépasse pas 6% pour les autres analytes. Il en résulte nécessairement une augmentation des niveaux de significativité des analyses de la variance associées à cet analyte.

Pour tous les autres analytes (o-crésol, guaiacol, 2,6-diméthylphénol, 4-méthylguaiacol, 4-éthylguaiacol, thymol, 4-vinylguaiacol, eugénol et 4-propylguaiacol), l'ajout d'une d'huile

à la formulation de la matrice a entraîné un meilleur piégeage. En première approximation, ce résultat confirme ce qui avait été obtenu lors d'un fumage réel, où les produits gras avaient subi un enrichissement en composés phénoliques plus importants.

Tableau 61 : Résultats d'analyse de la variance et de test de comparaison multiple LSD réalisés sur les quantités de composés phénoliques adsorbés par les matrices

	ANOVA Niveau de significativité	Huile				ANOVA Niveau de significativité	Gélatine ANOVA Niveau de significativité
		Aucune	Chimère	Arachide	Saumon		
Phénol	0,240					0,582	0,404
o-crésol	< 0,0001	2270	2353	2354	2337	0,797	0,865
p-crésol	0,136					0,867	0,719
Guaiacol	< 0,0001	2307	2361	2361	2359	0,165	0,684
2,6-diméthylphénol	< 0,0001	1819	2291	2283 2283	2265	0,688	0,579
3-éthylphénol	0,127					0,683	0,598
4-méthylguaiacol	< 0,0001	2218	2329	2325	2300	0,981	0,954
4-éthylguaiacol	0,0004	1909	2153	2098 2098	2025	0,877	0,796
Thymol	0,0002	893	1520	1280 1280	1196	0,435	0,536
4-vinylguaiacol	0,039	1266	1598	1342 1342	1160	0,259	0,274
Syringol	*					*	*
Eugénol	0,008	936	1382	1138 1138	1019	0,191	0,302
4-propylguaiacol	< 0,0001	705	1340	1092	996	0,237	0,335
(Z+E)isoeugénol	*					*	*
Somme	0,001	20947	24059	22932 22932	22151 22151	0,408	0,436

- Les niveaux de significativité témoignant d'un effet significatif au risque 5% est signalée en gras
- Les tests LSD ne sont réalisés que si l'effet associé est significatif
- Les valeurs reportées pour les niveaux du test LSD sont les moyennes par modalité de facteur (en ng adsorbés)
- Les moyennes sur une même ligne ne sont pas significativement différentes au risque 5%
- * : effets non-testés à cause d'une absence de données (composés phénoliques non-adsorbés à la surface des matrices)

L'ensemble de ces résultats peut être appréhendé sous deux angles : le « piégeage moyen » (capacité de l'ensemble des matrices testées à retenir chaque composé) et le « piégeage lié à l'huile » (augmentation du piégeage par les matrices contenant de l'huile, comparativement aux matrices maigres). En effet, il semblerait que ces deux aspects des observations réalisées ne soient pas liés aux mêmes propriétés des molécules comment le suggèrent les tendances illustrées à la Figure 92.

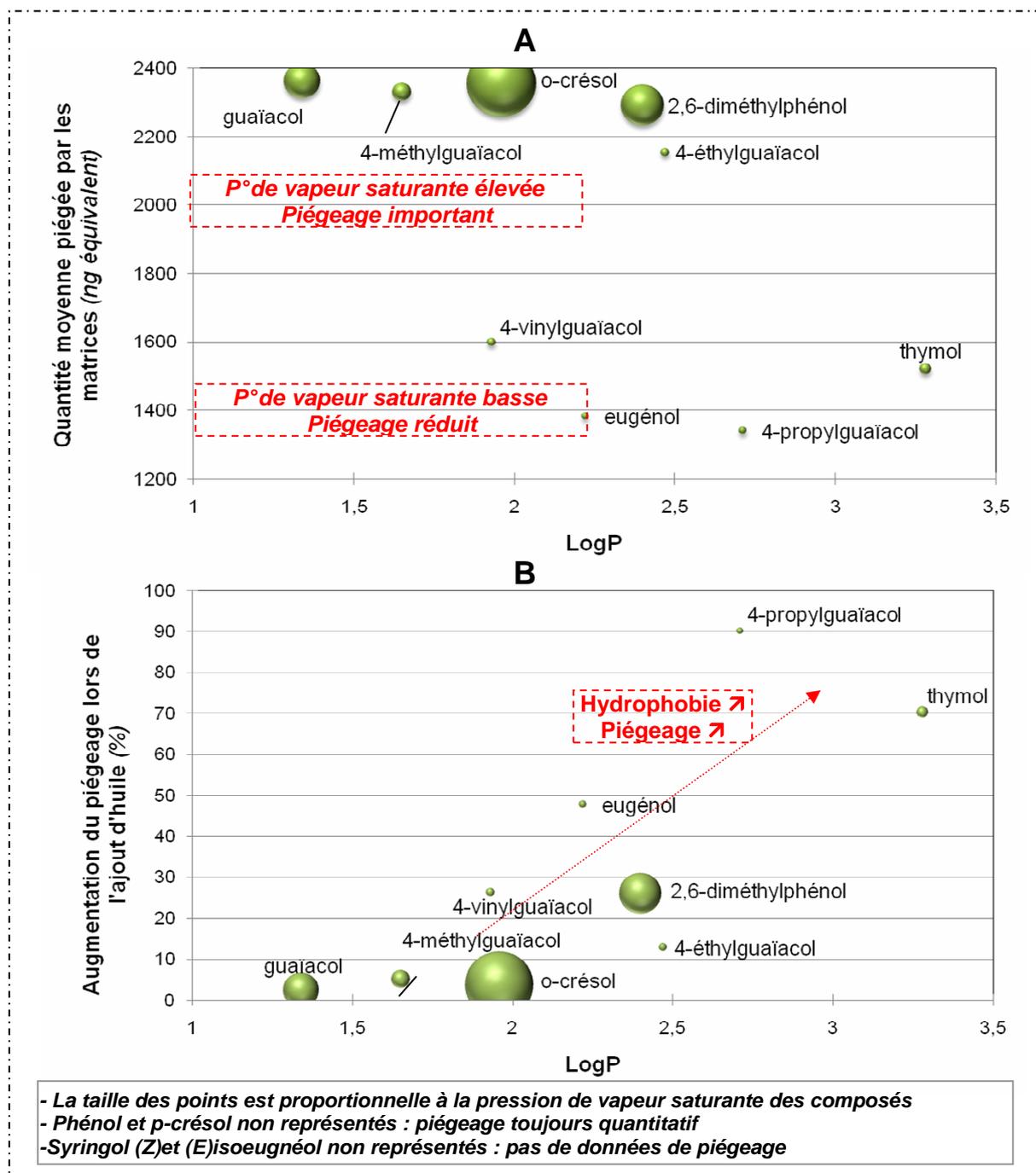


Figure 92 : Relations entre les propriétés physico-chimiques des composés phénoliques et leur piégeage par les matrices de composition variable

Il ressort que les composés qui sont globalement le plus piégés par les matrices testées sont ceux qui présentent des pressions de vapeur saturante élevées (Figure 92-A). C'est une tendance qui est confirmée par les observations faites pour le syringol et les isomères d'isoeugénol (détaillées ultérieurement) : les molécules les moins volatiles ne sont pas du tout retenues à la surface des matrices. Par ailleurs (Figure 92-B) l'augmentation du piégeage induite par l'ajout d'huile dans les matrices est plus prononcée pour les composés plus lipophiles (LogP élevé).

Bien qu'il s'agisse que de tendances, celles-ci restent cohérentes avec les phénomènes étudiés. Elles nous indiquent bien l'importance des deux étapes nécessaires à la mise en place des phénomènes de sorption au niveau de la surface du produit : passage vers la phase gazeuse et solubilisation dans une fraction de la matrice.

Nous constatons également ici que les différentes huiles n'ont pas toutes eu le même effet vis-à-vis des composés phénoliques. Bien que la capacité de rétention induite par chaque huile dépende individuellement du composé phénolique considéré il ressort dans l'ensemble que les capacités de rétention de chaque huile ne sont pas équivalentes

chimère > arachide > saumon.

Ce résultat nous interpelle particulièrement puisqu'il est exactement à l'opposé de ce qui avait été obtenu en termes de capacité de piégeage des composés phénoliques au cours du fumage des matrices modèles (voir XIII.1.1.2, p.215). La différence entre les phénomènes réellement mis en jeu (complexes transferts dynamiques lors du fumage et simple équilibre de sorption dans le cas présent) est probablement déterminante pour expliquer cette contradiction. En effet, comparativement aux piégeages moyens observés dans les deux cas, les effets de chaque huile se révèlent plus importants lors du fumage réel, spécialement pour les composés les plus légers. Ceci peut indiquer que les effets mesurés lors de l'exposition à l'espace de tête statique ont été limités par les conditions environnantes. La disponibilité limitée des analytes dans l'espace de tête est probablement un des paramètres les plus déterminants. En particulier, l'espace de tête statique s'oppose à la phase gazeuse de la fumée dont la concentration en composés volatils est en permanence entretenue par les particules de goudrons liquides qui jouent le rôle de réservoir (Girard, J.P., 1988).

Quelle qu'en soit la réelle raison sous-jacente à cette contradiction, celle-ci rend d'autant moins évidente l'identification du rôle précis de la composition des huiles utilisées.

Enfin, le cas du syringol et celui des isomères d'isoeugénol sont particulièrement remarquables. En effet, ce sont les seules molécules testées dont l'exposition à des matrices - toutes formulations confondues - n'a pas réduit la quantité dans les espaces de tête expérimentaux.

Cette absence d'interaction avec la matrice pourrait être liée à des phénomènes de changement d'état. Le syringol et les isomères d'isoeugénol sont en effet les analytes qui ont la plus faible volatilité (leurs pressions de vapeur saturantes sont inférieures de 2 à 10 fois à celles des autres analytes, Tableau 56). Etant moins susceptibles de passer à l'état gazeux, ils seraient donc moins concentrés dans l'espace de tête, diminuant d'autant leur possibilité d'accès à la matrice. Cependant, si la moins bonne volatilité de ces composés expliquait à elle seule la différence de comportement vis-à-vis des matrices alimentaires, celle-ci devrait également être observable au niveau de l'analyse de l'espace de tête de référence. Les gammes de calibration linéaires ne semblent pourtant pas indiquer que ces analytes soient significativement moins présents dans l'espace de tête à l'issue de l'étape d'enrichissement avec la solution de composés phénoliques.

Pendant l'étape de fumage (voir XIII.1.1.2, p.215), le fait que le syringol ne soit pas plus abondant dans les matrices contenant des huiles avait été attribué à sa lipophilie plus réduite, comparée à celle des autres composés phénoliques. Cette conclusion est pourtant insuffisante pour expliquer qu'il ne semble pas interagir du tout avec les matrices placées dans les espaces de tête modèles. En effet, d'autres composés phénoliques étudiés ont été significativement piégés par des matrices ne contenant pas de lipides (par exemple, en moyenne 2270 ng d'o-crésol sont piégés par les matrices maigres). Ces composés ont donc été capables d'interagir avec la phase aqueuse des produits alors qu'ils sont moins hydrophiles que le syringol. Cette différence de comportement qui ne recoupe pas les données d'hydrophobie souligne le fait que le passage vers le produit de composés présents à l'état gazeux n'est pas en une simple solubilisation dépendant de leur affinité avec les différentes fractions disponibles.

Plus que cette absence d'adsorption du syringol et des isomères d'isoeugénol, c'est donc principalement la contradiction apparente entre les résultats obtenus pour l'isoeugénol (Z+E) lors d'un fumage réel (voir XIII.1.1.1, p.214) qui présente un intérêt particulier. Si cette expérience montre que ces composés ont des difficultés à passer vers le produit à partir de la phase gazeuse, alors il remet en perspective les résultats obtenus lors de l'expérience de

fumage réel. La différence de comportement rencontrée entre les deux expérimentations souligne la complexité des phénomènes se produisant réellement lors du fumage. C'est probablement l'utilisation d'un milieu statique et modèle à la place d'un environnement complexe et dynamique qui justifie ces écarts. Même si les interactions fumée-produit se font largement à l'interface gaz-solide, ces phénomènes de sorption ne suffisent pas résumer le processus de fumage.

Par ailleurs, les autres paramètres testés n'ont pas eu d'effets statistiquement significatifs sur la rétention des composés phénoliques à l'état gazeux.

D'une part, nous constatons que les ajouts d'eau réalisés lors de la fabrication des matrices n'ont pas modifié l'adsorption des composés phénoliques présents dans l'espace de tête enrichi. C'est une constatation que nous pouvons rapprocher de ce qui a été obtenu dans le cadre d'un fumage réel où les teneurs en eau testées n'avaient pas permis de modifier le dépôt des composés phénoliques pendant le fumage (voir XIII.1.1.3, p.217). Etant donné que la plupart des composés phénoliques ont été piégés même par des matrices ne contenant pas d'huile, l'absence d'effet de l'ajout d'eau pourrait s'expliquer par le fait que dans tous les produits, l'eau est présente en excès vis-à-vis de l'importance des phénomènes de sorptions mis en jeu.

D'autre part, la présence de gélatine dans les matrices n'a pas entraîné de modification dans leur capacité à piéger les composés phénoliques gazeux. Etant donnée la faible teneur en gélatine des matrices, en particulier en regard du reste de la fraction protéique, ce résultat n'est pas surprenant. C'est tout de même un résultat important puisque nous pouvons en conclure que l'emploi de cet adjuvant ne perturbe pas la sorption des composés phénoliques à l'état gazeux.

Rétrospectivement, ce résultat est déterminant pour ce qui a été mis en évidence dans des conditions réelles de fumage (voir XIII, p.211). En effet, nous pouvons à présent raisonnablement supposer que l'inclusion de gélatine aux matrices qui ont été fumées n'a pas influencé les phénomènes de sorption mis en jeu dans l'enceinte de fumage. Le piégeage des composés volatils traduit par des phénomènes à l'interface solide/gaz alors mis évidence pendant le fumage réel ont donc été à juste titre imputé aux constituants du poisson. Si la gélatine présente lors de cette expérience a pu adsorber des composés à l'état gazeux, cela ne pouvait être que de manière marginale.

Certains des analytes testés n'ont pas semblé interagir avec les différentes matrices alimentaires testées, il s'agit des composés les moins volatils : syringol, (Z)isoeugénol et (E)isoeugénol.

La composition d'un produit influence significativement sa capacité à piéger la plupart des composés volatils testés présents à son contact à l'état gazeux. En particulier, la présence d'une phase lipidique augmente le piégeage des composés phénoliques.

Les caractéristiques de volatilité et de lipophilie des analytes semblent être des facteurs déterminants pour les phénomènes de sorption étudiés.

XV.2. Relargage

Après avoir été en contact avec les espaces de tête enrichis, les matrices testées précédemment ont été transférées dans des vials neufs pour pouvoir déterminer l'importance du relargage des composés adsorbés en surface. Les résultats obtenus sont traités à l'aide des gammes de calibration linéaire réalisées dans les mêmes conditions d'extraction.

Les quantités de composés phénoliques relarguées ne peuvent pas être interprétés parfaitement sans prendre en considération la charge initiale des matrices. En effet, nous avons vu précédemment que les matrices n'avaient pas piégé les mêmes quantités de chaque composé phénolique à la fin de l'expérience. La quantité relarguée doit donc être considérée en regard de la quantité piégée par les matrices lors de la phase d'adsorption des composés phénoliques. Pour cela, les résultats ont été exprimés en pourcents de composés phénoliques relargués, calculés par rapport aux quantités de composés phénoliques piégés par les matrices lors de la phase d'adsorption de l'expérimentation. Les analyses statistiques de ces résultats sont regroupées dans le Tableau 62.

Le premier résultat à souligner est que les proportions de composés phénoliques libérées par les produits sont dans l'ensemble plutôt faibles. En moyenne, sur l'ensemble des expériences, 1,5% de chaque composé adsorbé par les matrices a été libéré dans l'espace de tête. A titre d'exemple, le maximum de relargage est celui du 4-propylguaïacol à partir des matrices ne contenant pas d'huile : 9,21% en moyenne.

Tableau 62 : Résultats d'analyse de la variance et test de comparaison multiple LSD réalisés sur les quantités de composés phénoliques relargués par les matrices

	Huile				Eau		Gélatine			
	ANOVA Niveau de significativité	Aucune	LSD		ANOVA Niveau de significativité	LSD		ANOVA Niveau de significativité	LSD	
			Chimère	Arachide	Saumon	0	20		0	1
Phénol	0,001	1,04	0,86	0,87	0,91	< 0,0001	0,79	1,03	0,419	
o-crésol	< 0,0001	2,01	1,01	1,07	0,99	< 0,0001	1,08	1,64	0,247	
p-crésol	< 0,0001	1,33	0,81	0,85	0,82	< 0,0001	0,81	1,04	0,404	
Guaïacol	< 0,0001	1,94	1,21	1,27	1,20	< 0,0001	1,23	1,51	0,086	
2,6-diméthylphénol	< 0,0001	5,01	1,19	1,33	1,16	< 0,0001	1,85	2,19	0,113	
3-éthylphénol	< 0,0001	1,55	0,68	0,76	0,70	< 0,0001	0,77	1,00	0,896	
4-méthylguaïacol	< 0,0001	1,93	0,83	0,88	0,77	< 0,0001	0,94	1,17	0,076	
4-éthylguaïacol	< 0,0001	2,55	0,70	0,82	0,65	< 0,0001	1,01	1,21	0,071	
Thymol	< 0,0001	6,12	0,77	0,82	0,65	0,011	1,84	2,22	0,518	
4-vinylguaïacol	< 0,0001	3,33	1,92	1,50	1,61	0,001	1,45	2,21	0,463	
Syringol	*					*			*	
Eugénol	< 0,0001	6,80	1,33	1,77	1,56	0,002	2,18	3,15	0,487	
4-propylguaïacol	< 0,0001	9,21	1,09	1,54	1,24	0,008	2,48	3,50	0,350	
(Z+E)isoeugénol	*					*			*	
Somme	< 0,0001	2,86	0,99	1,13	0,99	< 0,0001	1,27	1,57	0,327	

- Les niveaux de significativité témoignant d'un effet significatif au risque 5% est signalée en gras
- Les tests LSD ne sont réalisés que si l'effet associé est significatif
- Les valeurs reportées pour les niveaux du test LSD sont les moyennes par modalité de facteur (**en % relargués**)
- Les moyennes sur une même ligne ne sont pas significativement différentes au risque 5%
- * : effets non-testés par manque de données (composés phénoliques absents des matrices en début d'expérience)

Cette capacité des matrices à retenir les composés adsorbés peut résulter de plusieurs phénomènes se déroulant au sein du produit que cette seule expérimentation ne permet pas de distinguer. Il est ainsi possible qu'une partie des composés phénoliques créent des liaisons chimiques avec certains constituants de l'échantillon. S'agissant de composés phénoliques, leur piégeage sous forme de phénoplastes réticulés est envisageable à partir d'aldéhydes

éventuellement présents dans les échantillons (présents originellement dans les filets de poisson ou néoformés par l'oxydation des huiles utilisées, Girard, J.P., 1988). Dans ce cas là, la simple augmentation de température (passage de 35 °C lors de l'adsorption à 50 °C pour l'étude du relargage) ne peut pas entraîner une libération de ces composés.

Par ailleurs, il est connu que les composés de fumée ne restent pas exclusivement en surface et peuvent diffuser vers le cœur du produit une fois solubilisés. C'est une migration de composés qui est d'autant plus envisageable dans nos matrices que celles-ci ne possèdent pas la macrostructure des filets de poisson réels (notamment, les myoseptes qui délimitent les métamères). La fraction des composés volatils s'étant déplacée vers l'intérieur de la matrice expérimentale n'est donc plus disponible pour être libérée vers l'espace de tête.

Enfin, la rétention des composés phénoliques par les constituants de la matrice peut résulter d'interactions faibles (liaisons hydrogènes, interactions de Van der Waals, interactions hydrophobes, etc.). Celles-ci peuvent limiter le passage depuis le produit vers l'espace de tête, notamment en engendrant des phénomènes de solubilisation.

Les matrices contenant une part lipidique libèrent globalement moins de composés phénoliques que les matrices maigres, sans qu'il soit possible d'identifier de différence entre les trois huiles testées. Considérant les résultats précédents, ceci pouvait être attendu : les composés étudiés sont piégés plus largement par des matrices contenant des lipides, à cause de leur plus grande affinité pour la phase grasse que pour l'eau. Ils sont donc également d'autant moins libérés par des matrices pour lesquelles ils ont le plus d'affinité.

Par contre, étant donné que les trois huiles ont toujours donné lieu à des comportements sensiblement différents des échantillons auxquels elles étaient incorporées, il peut sembler surprenant qu'aucune différence ne soit mise en évidence ici. Il est cependant possible que les quantités relarguées soient trop faibles pour pouvoir identifier des différences significatives. Dans le cas contraire, cette homogénéité d'effet des huiles sur le relargage montrerait que la qualité de l'huile est principalement déterminante pour le piégeage des composés par adsorption. La désorption se déroulant ultérieurement ne prendrait pas en compte les mêmes paramètres de composition. Ce sont malheureusement des hypothèses que cette expérience seule ne permet pas de départager.

Le fait que tous les composés soient relargués en plus grandes quantités par des matrices contenant plus d'eau peut être lié à leur relative hydrophobie : les composés phénoliques

étudiés ont globalement moins d'affinité pour les matrices contenant une plus grande proportion d'eau.

Si la différence de relargage est interprétée par une différence d'affinité globale pour la matrice en fonction de son ratio phase grasse / phase aqueuse, alors c'est également elle qui explique que l'effet de l'ajout d'huile soit plus marqué que l'effet de l'ajout d'eau. La pulpe de poisson utilisée comme base pour la fabrication des matrices modèles contient beaucoup d'eau (81%) alors qu'elle ne contient pratiquement pas d'huile (1%). Ainsi, le ratio phase grasse / phase aqueuse varie beaucoup plus lors de l'ajout de 10 g d'huile que par l'ajout de 20 g d'eau. Ce serait donc ce qui expliquerait que l'augmentation du relargage par ajout d'eau est plus faible que la diminution de relargage par ajout d'huile.

Il est néanmoins possible d'envisager l'effet de l'ajout d'eau d'une autre façon : un effet de structure facilitant la migration des composés phénoliques. Plus la part en eau de la matrice expérimentale est importante, plus les composés phénoliques qui y sont solubilisés sont mobiles dans le produit. Le relargage de la fraction ayant diffusé vers le cœur de l'échantillon serait alors rendu plus efficace, car celle-ci aurait plus facilement accès à la surface du produit.

Il est difficile à notre échelle d'étude de conclure de manière définitive quant à la nature des phénomènes sous-jacents qui induisent ces différences de comportements. Il ne semble pas exister de relation aussi bien marquée que celles soulignées pour les phénomènes d'adsorption entre les caractéristiques des composés phénoliques étudiés et les résultats de relargage obtenus.

En prenant en considération les teneurs initiales de chaque échantillon en composés phénoliques, il est possible de dire que les matrices contenant de l'huile sont moins susceptibles de libérer les composés piégés par sorption.

Par ailleurs, les matrices plus riches en eau libèrent de plus grandes quantités de composés phénoliques dans leur espace de tête.

XV.1. Conclusions

Il est à présent clair que la composition des matrices alimentaires peut influencer les phénomènes de sorptions se déroulant à l'interface avec l'air environnant (qu'il s'agisse d'absorption ou de désorption). Bien que les liens existant entre les résultats individuels et les

propriétés physico-chimiques de composés étudiés n'aient pas été prouvées clairement, des tendances fortes sont apparues, révélant des corrélations également visualisables par analyse en composantes principales (Figure 93).

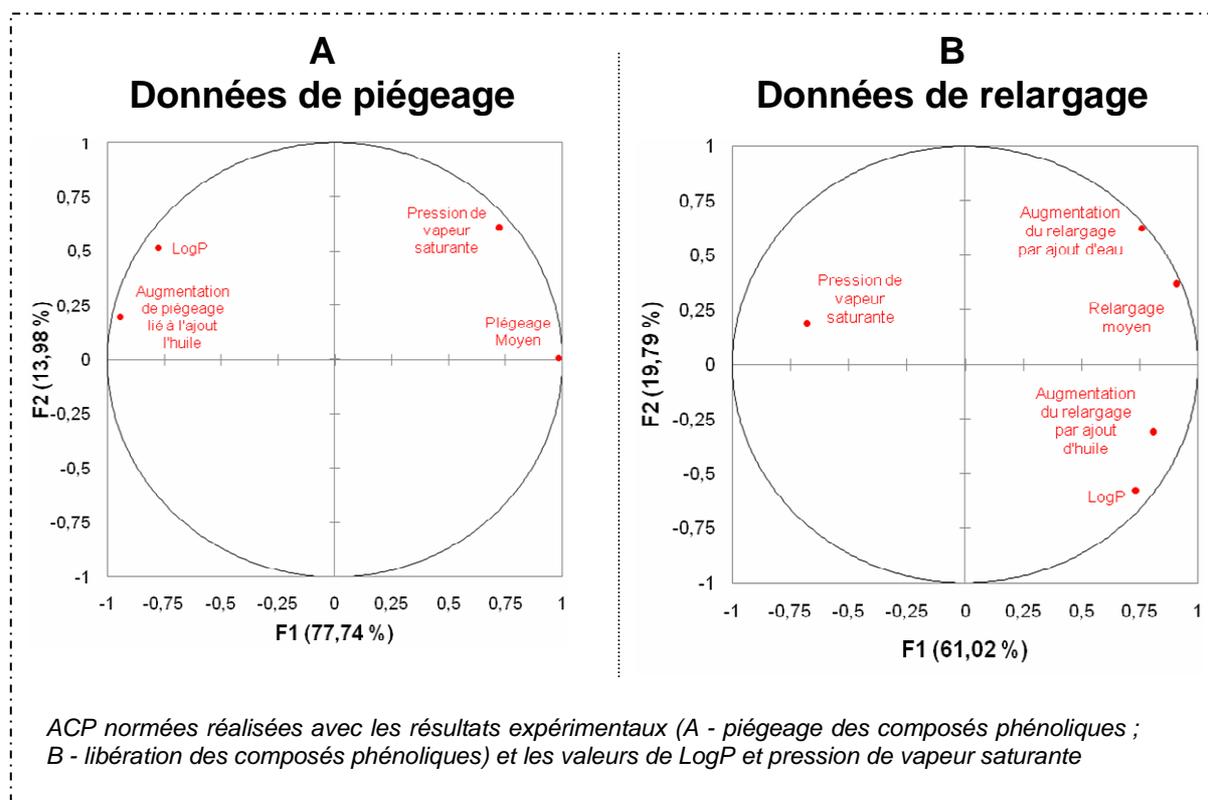


Figure 93 : Cercles des corrélations des ACP réalisées sur les données de piégeage et de relargage des composés phénoliques par les matrices modèles

S'agissant de composés volatils participant à l'odeur et à l'arôme des produits, de telles différences de comportement lors de la libération dans l'espace de tête peuvent être déterminantes. En effet, la fraction volatile relarguée par le produit constitue son odeur et celle qui est relarguée en bouche, son arôme. Des matrices alimentaires ayant tendance à moins capter de composés odorants pendant le fumage et/ou les libérer a posteriori développeront donc des espaces de tête moins riches, résultant en des différences d'intensité d'odeur (ou d'arôme). Mais c'est en particulier en termes de typicité d'arôme que de tels phénomènes pourraient se révéler déterminants : en retenant plus particulièrement certains types de composés, une matrice pourra influencer le rapport des différents constituants de son arôme, et en changer les caractéristiques perçues par un consommateur.

Cependant, ces résultats doivent être considérés avec les limites imposées par la méthode d'analyse, en particulier par l'absence de macrostructure organisée dans nos matrices. Nos échantillons ne permettent en effet pas de prendre en considération les phénomènes de

migrations de composés volatils tels qu'ils peuvent avoir lieu à l'intérieur d'un filet de poisson à l'organisation multi-échelle très structurée.

XVI. Adsorption des composés phénoliques par les constituants de la chair de poisson

XVI.1. Fractions liquides

XVI.1.1. Huiles en mélange dans l'héxadécane

Des essais ont été réalisés pour tester l'adsorption des composés phénoliques à l'état gazeux par 100 μL de mélanges C16/huiles avec des proportions en huiles croissantes. Ces expériences qui avaient pour but de mettre en évidence des phénomènes d'interaction acide gras-composés phénoliques indépendantes des phénomènes de solubilisation n'ont cependant pas pu être interprétées.

En effet, même si des tendances semblent se dégager pour certains composés phénoliques (augmentation du piégeage avec l'augmentation de la proportion d'huile dans le mélange, en particulier pour les composés de masse moléculaire les plus faibles), la variabilité des mesures réalisées est trop importante. Il ne nous a pas été possible sur de telles séries de mesures de réaliser des analyses statistiques ou des régressions de données (Figure 94). Pour des proportions d'huiles allant de 1 à 20%, la variabilité de l'expérience pourrait être attribuée à une imprécision lors du prélèvement de l'huile mais les mêmes écarts de mesure sont constatés sur toute la gamme d'étude.

Il est possible que ce soit la présence de l'héxadécane dans le vial expérimental qui perturbe la SPME réalisée dans l'espace de tête, même si cet alcane peu volatil ne semble pas être très abondant dans les espaces de tête en regard de sa très forte quantité dans le vial expérimental (Figure 95).

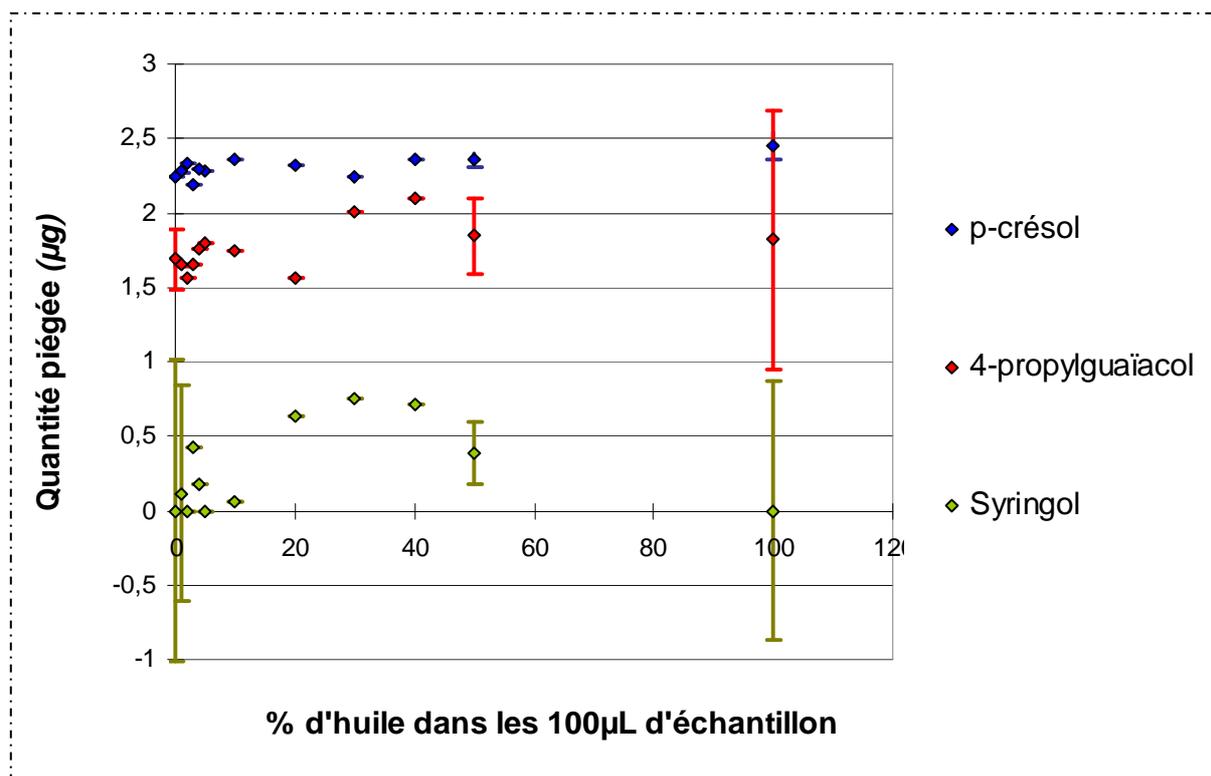


Figure 94 : Piégeage de trois composés phénoliques par des mélanges Huile d'arachide/C16 (mesures expérimentales et écarts-types sur les points répétés)

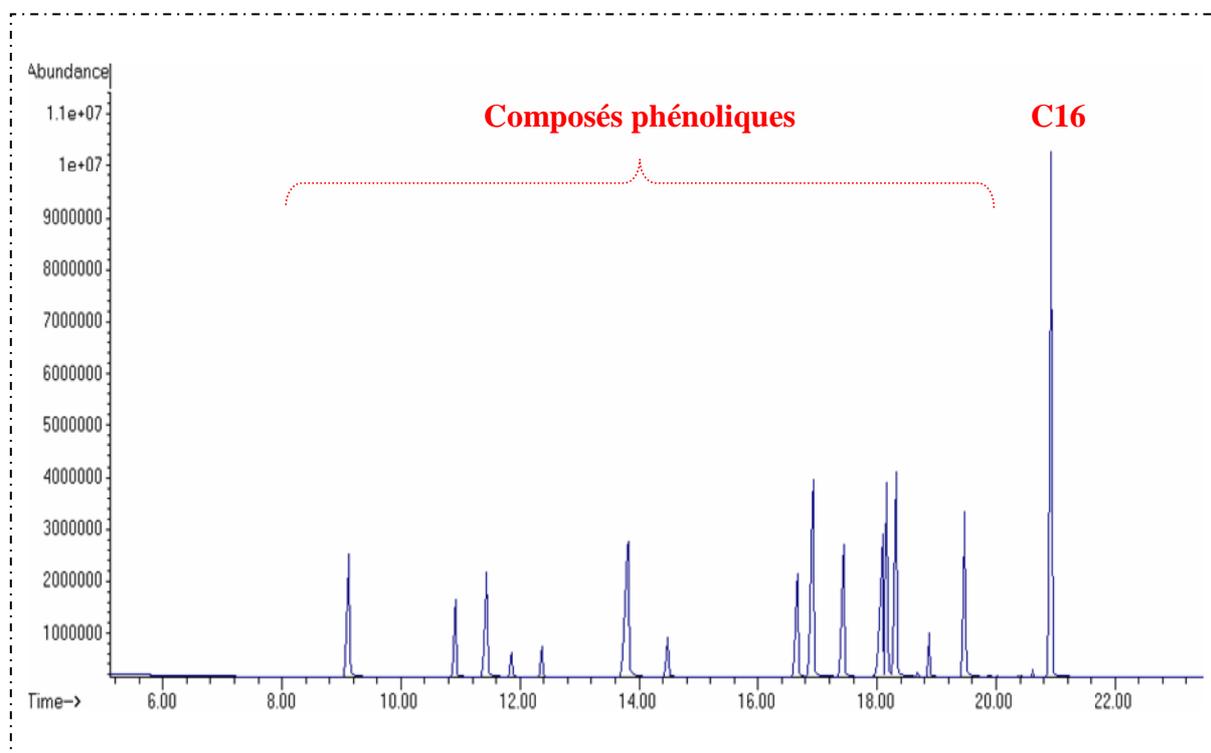


Figure 95 : Chromatogramme obtenu par HS-SPME / GC-FID sur un espace de tête enrichi contenant 100 µL de C16

La raison de variabilité des mesures expérimentales n'ayant pas pu être déterminée précisément. Même si la tendance qui semble se dégager n'a donc pas pu être confirmée ou infirmée (l'augmentation du % d'huile augmenterait le piégeage), elle pourrait constituer une piste pour des investigations ultérieures.

XVI.1.2. Huiles et eau pures

XVI.1.2.1. Huiles

La Figure 96 présente des exemples de résultats qui ont été obtenus en terme de quantités de composés phénoliques gazeux piégés par des huiles pures placées dans l'espace de tête.

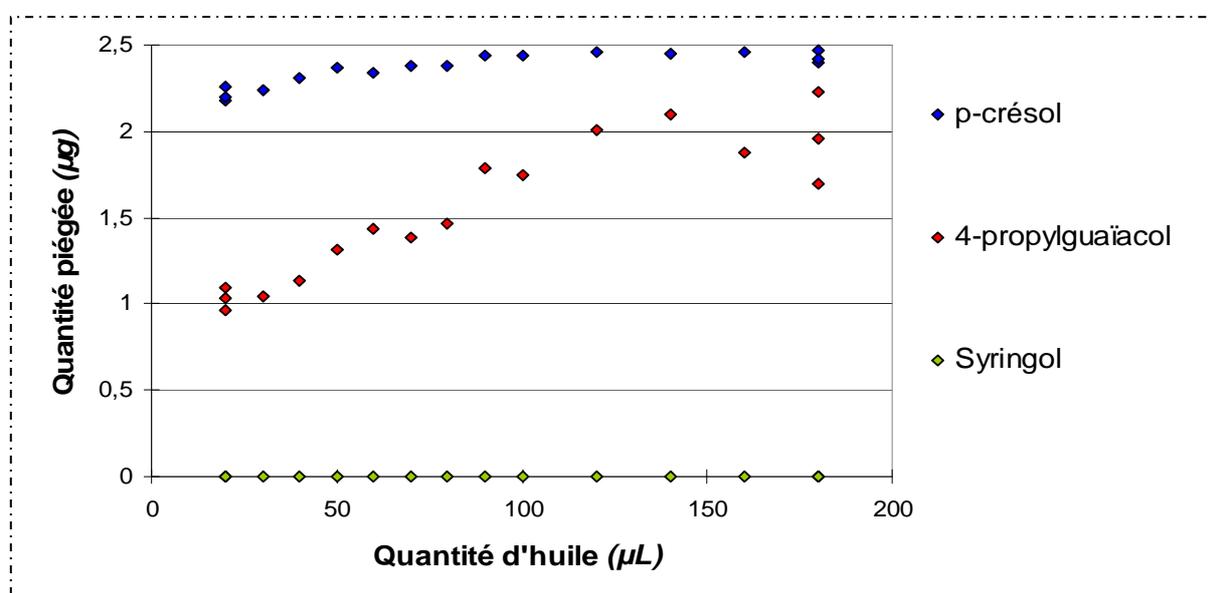


Figure 96 : Piégeage de trois composés phénoliques gazeux par des quantités croissantes d'huile de saumon (valeurs expérimentales)

♦ Le syringol et les isomères d'isoeugénol ne sont pas du tout captés par les huiles liquides. C'est un résultat qui est parfaitement en accord avec ce qui avait été constaté précédemment avec les matrices modèles. Bien qu'il ne permette pas de préciser si cette absence de rétention est due à une trop faible affinité pour la phase lipidique ou à une trop faible volatilité, ce résultat reste une confirmation des observations antérieures.

♦ Les autres composés phénoliques de l'espace de tête interagissent avec les échantillons d'huile étudiés : les quantités croissantes d'huiles entraînent une plus grande rétention des

analytes. Cependant, les quantités piégées diffèrent d'un analyte à l'autre : certains composés phénoliques sont presque totalement captés par tous les volumes d'huile testés (de 20 à 180 μL , comme l'o-crésol) alors que pour d'autres (comme le 4-propylguaïacol) la quantité d'analyte piégée varie beaucoup en fonction du volume d'échantillon utilisé (Figure 96).

Il est important de souligner que l'intensité du piégeage par sorption ne semble pas dépendre de la surface de l'interface huile/air. En effet, lors de la préparation des échantillons, il a pu être constaté que la surface d'huile exposée n'est pas toujours identique. Pour des volumes inférieurs à 60 μL , l'huile placée dans la coupelle s'organise sous forme de goulettes et la surface de contact huile/air augmente avec le volume d'échantillon. A partir de 60 μL , l'huile recouvre toute la surface de la coupelle en formant un ménisque sur les rebords de celle-ci, la surface est identique quel que soit le volume d'huile. Une inflexion de la courbe de piégeage ou l'établissement d'un palier à partir de 60 μL aurait indiqué que l'intensité du piégeage par sorption était limitante pour les phénomènes étudiés, il ne semble pas que cela soit effectivement le cas.

Hormis le syringol, le (Z)isoeugénol et le (E)isoeugénol, les composés phénoliques testés sont piégés de manière croissante par des volumes croissants d'huiles.

XVI.1.2.2. Eau

Les résultats obtenus pour les essais réalisés avec de l'eau sont globalement comparables à ceux obtenus pour les huiles : le piégeage des composés augmente avec le volume d'échantillon exposé à l'espace de tête (Figure 97).

La principale différence avec les résultats obtenus pour les huiles concerne le syringol et les isomères d'isoeugénol : ces composés sont effectivement piégés par des échantillons d'eau, alors qu'ils n'ont pas été piégés par des échantillons d'huiles.

Ce résultat est particulièrement important car il soulève quelques interrogations. Il montre sans ambiguïté que ces composés phénoliques sont effectivement capables d'interagir avec certains échantillons *via* l'espace de tête. L'absence de piégeage par les matrices modèles qui a été mise en évidence précédemment (voir XV.1, p.239) relèverait donc bien d'un manque d'affinité des ces molécules pour les produits testés, mais pas d'un problème de volatilité. Or, il peut être surprenant de mettre en parallèle une capacité à être piégé par de l'eau et une absence d'affinité pour des matrices contenant au moins 65% d'eau.

Il est possible que cette différence s'explique par une faible disponibilité de l'eau présente dans les produits pour interagir avec les composés phénoliques ou les solubiliser. En effet, de par l'abondance de protéines dans les matrices qui ont été utilisées, une grande partie de l'eau peut être liée -plus ou moins intimement- avec les protéines myofibrillaires (Sainclivier, M., 1985a). Ces deux résultats ne sont donc pas directement opposables puisque nous ne connaissons pas la fraction de l'eau réellement disponible dans les matrices modèles testées précédemment.

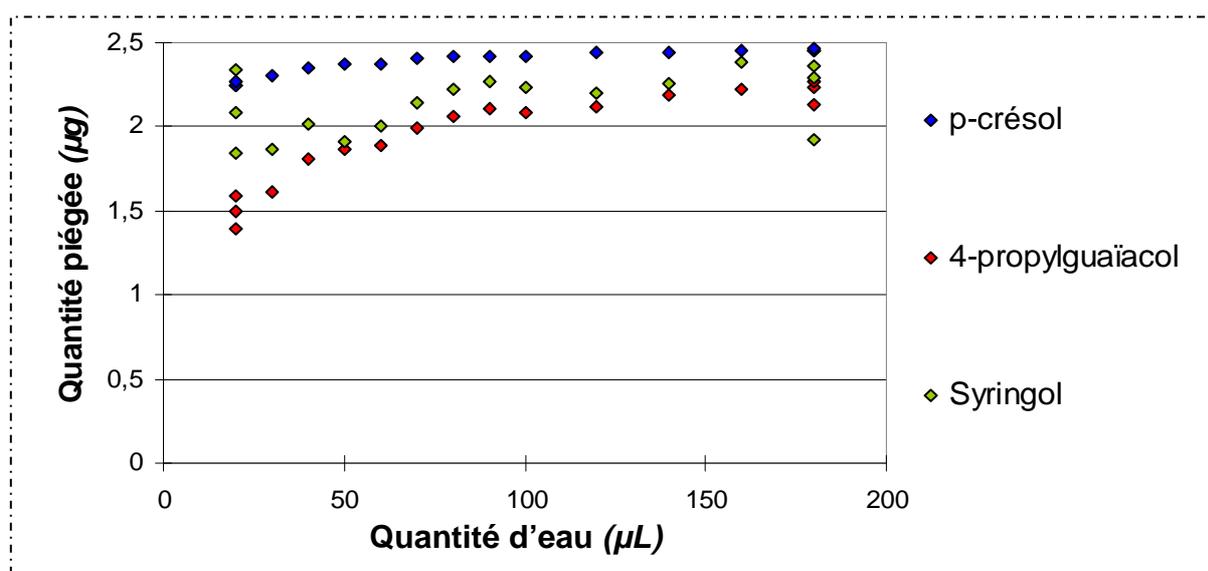


Figure 97 : Piégeage de trois composés phénoliques gazeux par des quantités croissantes d'eau (valeurs expérimentales)

Exception faite de ces trois composés, le comportement des molécules face à un volume croissant d'échantillon liquide est globalement le même : un piégeage croissant qui tend à se stabiliser à une valeur maximale plus ou moins proche des 2,5 µg équivalents d'origine, selon le composé.

L'ensemble des composés phénoliques testés est piégé de manière croissante par des volumes croissants d'eau.

XVI.1.2.3. Régression des courbes de piégeage

Afin de tenter de comparer plus aisément le comportement des différentes molécules face aux différents échantillons liquides, nous avons procédé par régression des données. Les

résultats de piégeages ont été traités pour tout composé phénolique i et tout échantillon liquide j comme des séries de données du type « $Y = f(X)$ » :

$$\text{« piégeage analyte}_i = f(\text{volume d'échantillon}_j) \text{ »}$$

Dans un premier temps, nous avons tenté d'identifier un modèle mathématique permettant de décrire globalement les phénomènes de piégeage de composés phénoliques observés. C'est-à-dire : un modèle mathématique qui puisse être ajusté aux valeurs expérimentales de chaque série de données par le choix de coefficients appropriés. Pour cela, un ensemble de modèles mathématiques a été testé (Tableau 63) sur l'ensemble des couples analyte-échantillon.

Tableau 63 : Modèles mathématiques de régression testés

#	Modèle	Equation du modèle
1	$Y^2 = f(X^2)$	$Y = \sqrt{a + b \cdot X^2}$
2	$Y^2 = f(X)$	$Y = \sqrt{a + b \cdot X}$
3	$Y^2 = f(\ln X)$	$Y = \sqrt{a + b \cdot \ln(X)}$
4	$Y^2 = f(1/X)$	$Y = \sqrt{a + b/X}$
5	$Y^2 = f(\sqrt{X})$	$Y = \sqrt{a + b \cdot \sqrt{X}}$
6	$Y = f(X^2)$	$Y = a + b \cdot X^2$
7	$Y = f(\ln X)$	$Y = a + b \cdot \ln(X)$
8	$Y = f(1/X)$	$Y = a + b/X$
9	$Y = f(\sqrt{X})$	$Y = a + b \cdot \sqrt{X}$
10	$Y = f(X)$	$Y = a + b \cdot X$
11	$Y = f(X^n)$	$Y = a \cdot X^b$
12	$\ln Y = f(X^2)$	$Y = e^{(a + b \cdot X^2)}$
13	$\ln Y = f(\sqrt{X})$	$Y = e^{(a + b \cdot \sqrt{X})}$
14	$\ln Y = f(X)$	$Y = e^{(a + b \cdot X)}$
15	$\ln Y = f(1/X)$	$Y = e^{(a + b/X)}$
16	$1/Y = f(\ln X)$	$Y = 1/(a + b \cdot \ln(X))$
17	$1/Y = f(\sqrt{X})$	$Y = 1/(a + b \cdot \sqrt{X})$
18	$1/Y = f(X)$	$Y = 1/(a + b \cdot X)$
19	$1/Y = f(1/X)$	$Y = 1/(a + b/X)$
20	$1/Y = f(X)$	$Y = 1/(a + b \cdot X)$
21	$\sqrt{Y} = f(X^2)$	$Y = (a + b \cdot X^2)^2$
22	$\sqrt{Y} = f(\ln X)$	$Y = (a + b \cdot \ln(X))^2$
23	$\sqrt{Y} = f(1/X)$	$Y = (a + b/X)^2$
24	$\sqrt{Y} = f(X)$	$Y = (a + b \cdot X)^2$
25	$\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$	$Y = (a + b \cdot \sqrt{X})^2$

Ces modèles ont d'abord été comparés entre eux en termes d'ajustement à l'ensemble des données, par calcul des coefficients de corrélation ajusté et par réalisation d'un test de manque d'ajustement grâce aux mesures répétées :

- ♦ tout modèle présentant un coefficient de corrélation ajusté inférieur à 75% pour au moins un couple analyte-échantillon n'a pas été conservé ;

♦ tout modèle présentant un manque d'ajustement significatif (au risque de se tromper de 5%) pour au moins un couple analyte-échantillon n'a pas été conservé.

Parmi les modèles restants (#7 ; #11 ; #15 ; #20 ; #22) qui sont dans l'ensemble ajustables à toutes les séries de données, c'est le modèle logarithmique (#7) qui a été conservé :

$$Y = a + b \cdot \ln(X)$$

D'une part, il s'agit d'un des modèles présentant les coefficients de corrélation ajustés les plus élevés (en moyenne 84,4%). D'autre part, il présente l'avantage d'être formellement plus simple, les valeurs de ses paramètres **a** (constante) et **b** (pente) sont donc plus facilement interprétables. C'est en particulier vrai par comparaison aux modèles #11 ($Y = a \cdot X^b$) et #22 ($Y = (a + b \cdot \ln(X))^2$) qui sont les seuls à présenter des coefficients de corrélation globalement aussi élevés (respectivement 84,3% et 84,4% en moyenne).

Il faut souligner que pour des raisons techniques, notre domaine expérimental ne comporte pas de mesure être 0 μL (référence sans échantillon) et 20 μL . Les valeurs calculées par les modèles sur cette gamme de volumes d'échantillons relèvent donc de l'extrapolation pure et ne peuvent pas être validées expérimentalement. Ceci ne pose pas de réel problème pour notre démarche car nous n'utilisons pas les modèles mathématiques à des fins de prévision. Simplement, même si les données calculées sont disponibles pour n'importe quelle valeur de volume d'échantillon, les conclusions issues de la comparaison des différents modèles ne seront applicables que dans le domaine expérimental réel : entre 20 et 180 μL .

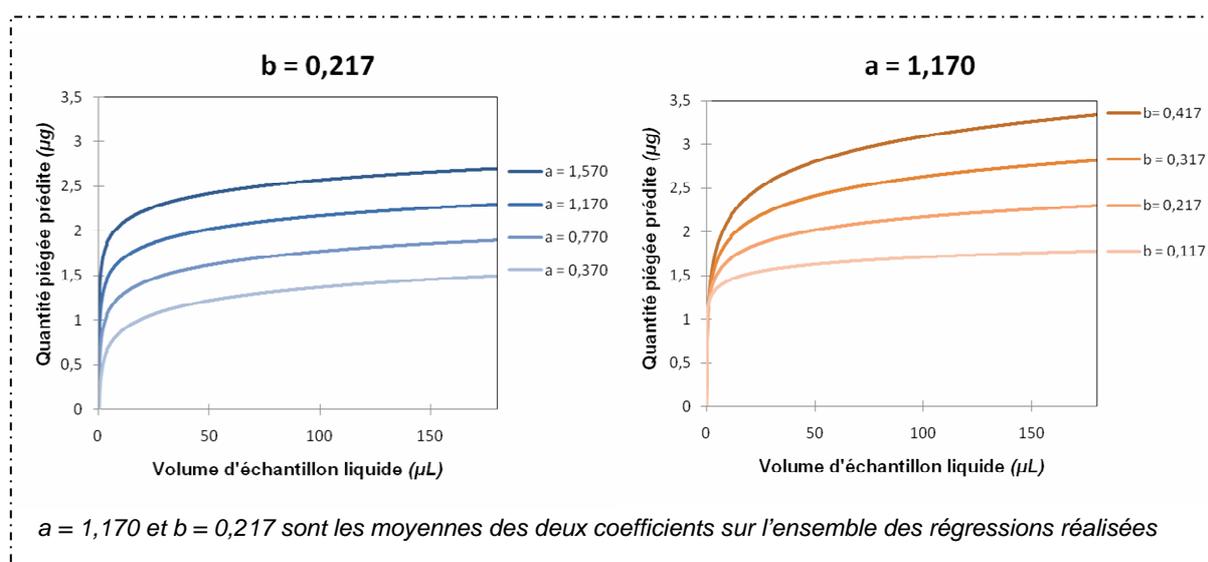


Figure 98 : Influence des valeurs des paramètres du modèle de régression

La Figure 98 illustre la traduction des deux coefficients du modèle :

♦ La constante (**a**) est un paramètre de position, elle définit la « hauteur » de la courbe, mais pas l'amplitude de ses variations. Il est à noter qu'une constante négative est possible, elle indique alors que le piégeage du composé considéré n'est effectif qu'à partir d'un certain volume d'échantillon. Une valeur de constante **a** basse témoigne donc d'un piégeage globalement plutôt limité.

♦ La pente (**b**) définit l'amplitude des variations de piégeage. Avec des valeurs de pente décroissantes, le piégeage varie moins et se stabilise plus rapidement à un palier. La valeur de piégeage maximale correspondante est en même temps d'autant plus réduite que la pente est faible. Une valeur de pente **b** basse témoigne donc à la fois d'un piégeage limité, mais également d'une « saturation » plus facilement atteinte.

Les valeurs des deux coefficients calculées pour l'ensemble des couples analyte-échantillon sont regroupées dans le Tableau 64.

Tableau 64 : Paramètres de régression logarithmique ($Y = a + b \cdot \ln X$) des données de piégeage de composés phénoliques par des échantillons liquides

Composé phénolique	Echantillon							
	Eau		Chimère		Arachide		Saumon	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Phénol	2,174	0,061	2,291	0,038	2,349	0,028	2,313	0,035
o-crésol	1,877	0,114	2,286	0,040	2,348	0,028	2,327	0,032
p-crésol	1,994	0,092	1,776	0,130	1,911	0,111	1,891	0,111
Guaïacol	2,077	0,078	2,302	0,037	2,350	0,028	2,310	0,036
2,6-diméthylphénol	1,332	0,210	2,386	0,021	2,419	0,015	2,409	0,017
3-éthylphénol	1,613	0,158	0,592	0,286	0,486	0,348	0,527	0,330
4-méthylguaïacol	1,941	0,102	1,993	0,093	2,106	0,075	2,079	0,078
4-éthylguaïacol	1,516	0,176	1,104	0,238	1,195	0,241	1,229	0,227
Thymol	0,180	0,387	0,258	0,307	-0,072	0,429	-0,033	0,407
4-vinylguaïacol	1,408	0,193	0,373	0,279	-0,095	0,426	-0,256	0,438
Syringol	1,664	0,111	*	*	*	*	*	*
Eugénol	0,918	0,275	-0,342	0,349	-0,651	0,478	-0,733	0,485
4-propylguaïacol	0,508	0,338	-0,153	0,357	-0,617	0,515	-0,484	0,478
(Z+E)isoeugénol	-2,897	0,975	*	*	*	*	*	*
Somme	21,618	2,337	22,406	1,649	20,493	2,292	20,537	2,223

* : pas de modèle, aucun phénomène de piégeage détecté

Une analyse rapide des coefficients obtenus nous permet d'établir une relation linéaire forte entre les valeurs de constante (**a**) et de pente (**b**) sur l'ensemble des données comme le montre la Figure 99.

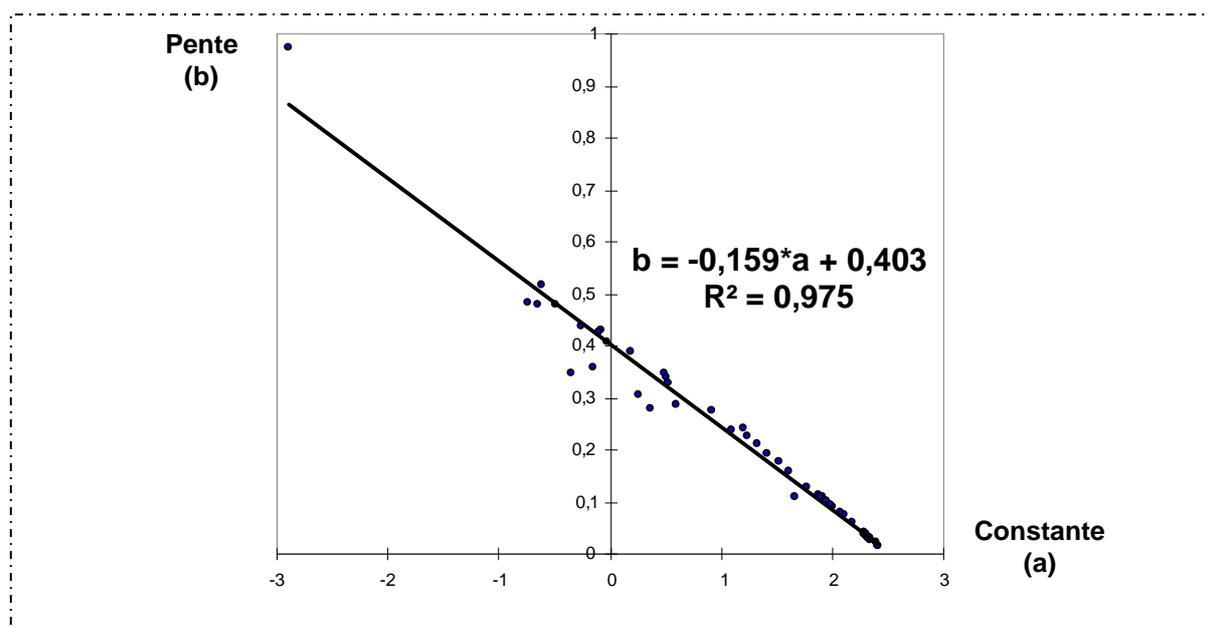


Figure 99 : Relation linéaire entre la pente et la constante des modèles de régression

Les couples analyte-échantillon ayant des modèles dont la valeur de la pente (**b**) est élevée présentent donc toujours une valeur de constante (**a**) faible. Cette corrélation s'explique par le fait qu'aucune courbe expérimentale ne présente de palier à des faibles niveaux de piégeage. Lorsqu'il y a présence d'un palier de piégeage, il est proche de $2,5 \mu\text{g}$ et témoigne en fait d'un piégeage quantitatif de l'analyte présent dans l'espace de tête. Afin de pouvoir ajuster le modèle à une courbe expérimentale présentant un palier élevé atteint rapidement, il est nécessaire de « compenser » une valeur de pente faible (palier atteint rapidement, mais à un niveau de piégeage réduit) par une valeur de constante élevée (niveau de piégeage global élevé).

Grâce à cette forte corrélation, nous pouvons considérer qu'un seul des deux coefficients permet de définir le comportement de l'analyte vis-à-vis de l'échantillon considéré. Nous avons choisi d'utiliser la constante (**a**) car elle varie dans le même sens que le piégeage des composés phénoliques : plus la constante du modèle de régression (**a**) est élevée, plus le composé phénolique étudié à l'état gazeux possède d'affinité pour l'échantillon liquide considéré (Figure 100). D'après notre modèle mathématique, la valeur de (**a**) représente la quantité de composé phénolique piégée par $1 \mu\text{L}$ d'échantillon liquide. Cependant, ce volume d'échantillon ne faisant pas partie de notre domaine expérimental, les valeurs de (**a**) ne seront interprétées qu'en tant qu'indicateurs d'affinité relative.

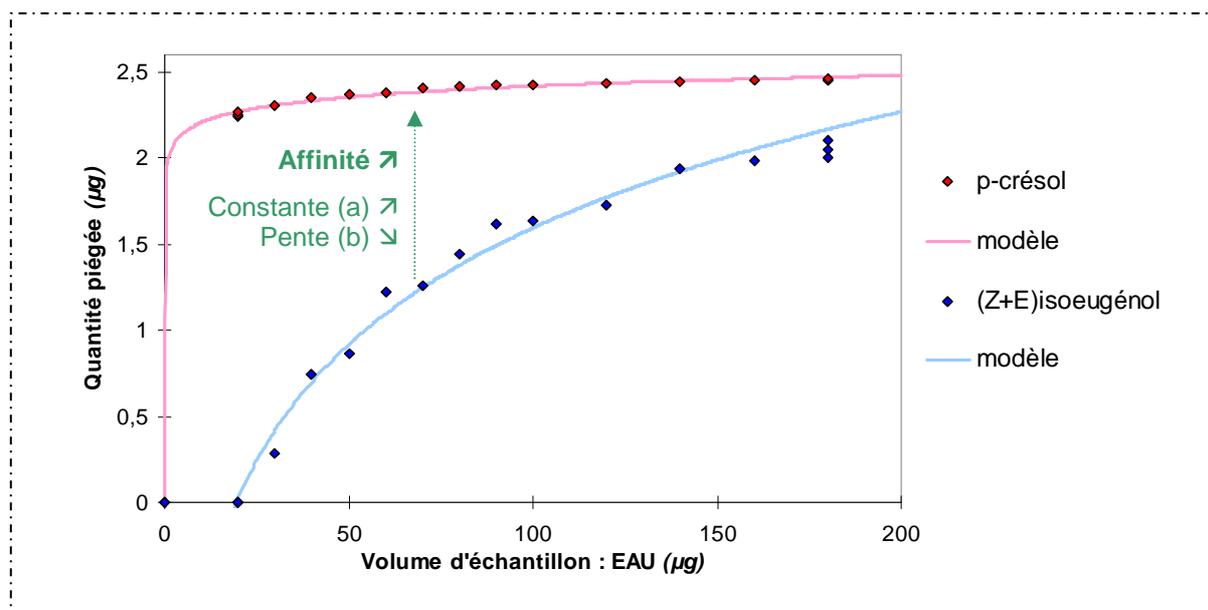


Figure 100 : Comparaison de deux composés phénoliques ayant des comportements différents vis-à-vis d'échantillons d'eau (données expérimentales et calculées)

L'ensemble des données de piégeages des composés phénoliques par des échantillons liquides est décrit efficacement à l'aide d'un modèle de régression logarithmique :

$$\text{piégeage analyte}_i = a + b * (\text{volume d'échantillon}_j)$$

La valeur de la constante du modèle ajusté pour un couple analyte-échantillon peut-être utilisée comme un indicateur positif de l'affinité de l'analyte pour l'échantillon.

XVI.1.2.4. Affinité des composés phénoliques pour l'eau et les huiles

Les résultats précédents nous permettent à présent de comparer le comportement des différents composés vis-à-vis des différents échantillons liquides sur la base d'un critère unique : la constante (**a**) du modèle de régression logarithmique. L'ensemble des résultats obtenus est présenté à la Figure 101. C'est une observation qui est cohérente avec les constatations réalisées en utilisant les matrices modèles lors de la mesure du piégeage et du relargage des composés phénoliques à l'état gazeux. Les différences de sorption induites par les trois types huiles étaient relativement faibles pour le piégeage et n'étaient pas significatives pour le relargage.

Les plus forts écarts de valeurs de la constante (**a**) sont constatés globalement entre l'eau et les trois huiles, témoignant bien de différences de comportement vis-à-vis de la phase

grasse et de la phase aqueuse. Nous pouvons globalement distinguer plusieurs types de composés phénoliques étudiés, en termes de piégeage par ces deux types d'échantillons :

- ♦ les composés qui sont largement piégés par tous les types d'échantillons testés (phénol, o-crésol, p-crésol, guaiacol, 4-méthylguaiacol, 4-éthylguaiacol et thymol) ;
- ♦ les composés qui présentent une meilleure affinité pour la phase aqueuse (3-éthylphénol, 4-vinylguaiacol, syringol, eugénol, 4-propylguaiacol et (Z+E)isoeugénol) ;
- ♦ le 2,6-diméthylphénol, qui semble être le seul analyte à être clairement mieux piégé par les huiles que par l'eau.

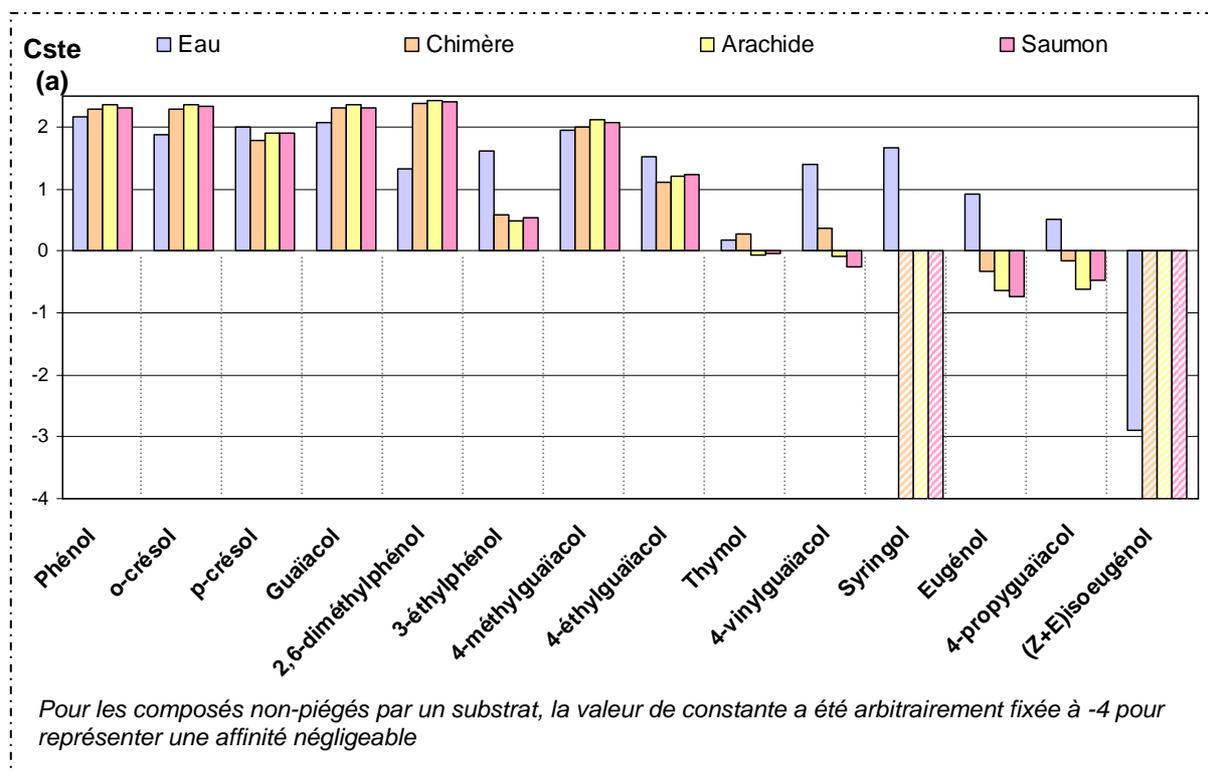


Figure 101 : Affinité des composés phénoliques pour des substrats liquides exprimée par la constante du modèle de régression logarithmique

Il est cependant difficile de relier ces différences de comportements à certaines des caractéristiques physico-chimiques des composés phénoliques étudiés (notamment l'hydrophobie et la volatilité). Nous pouvons en effet penser qu'il y a une tendance globale des composés les plus volatils à être plus retenus à par les échantillons liquides testés (Figure 102-B), comme cela avait également été mis en évidence avec des matrices modèles (voir XV.1, p.239). En revanche, il ne semble pas y avoir de relation entre les différences de piégeage des composés et leur hydrophobie relative (Figure 102-A), alors que les mêmes

expériences réalisées avec des matrices modèles avaient révélé une tendance des composés plus lipophiles (LogP élevés) à être plus retenus par la phase lipidique.

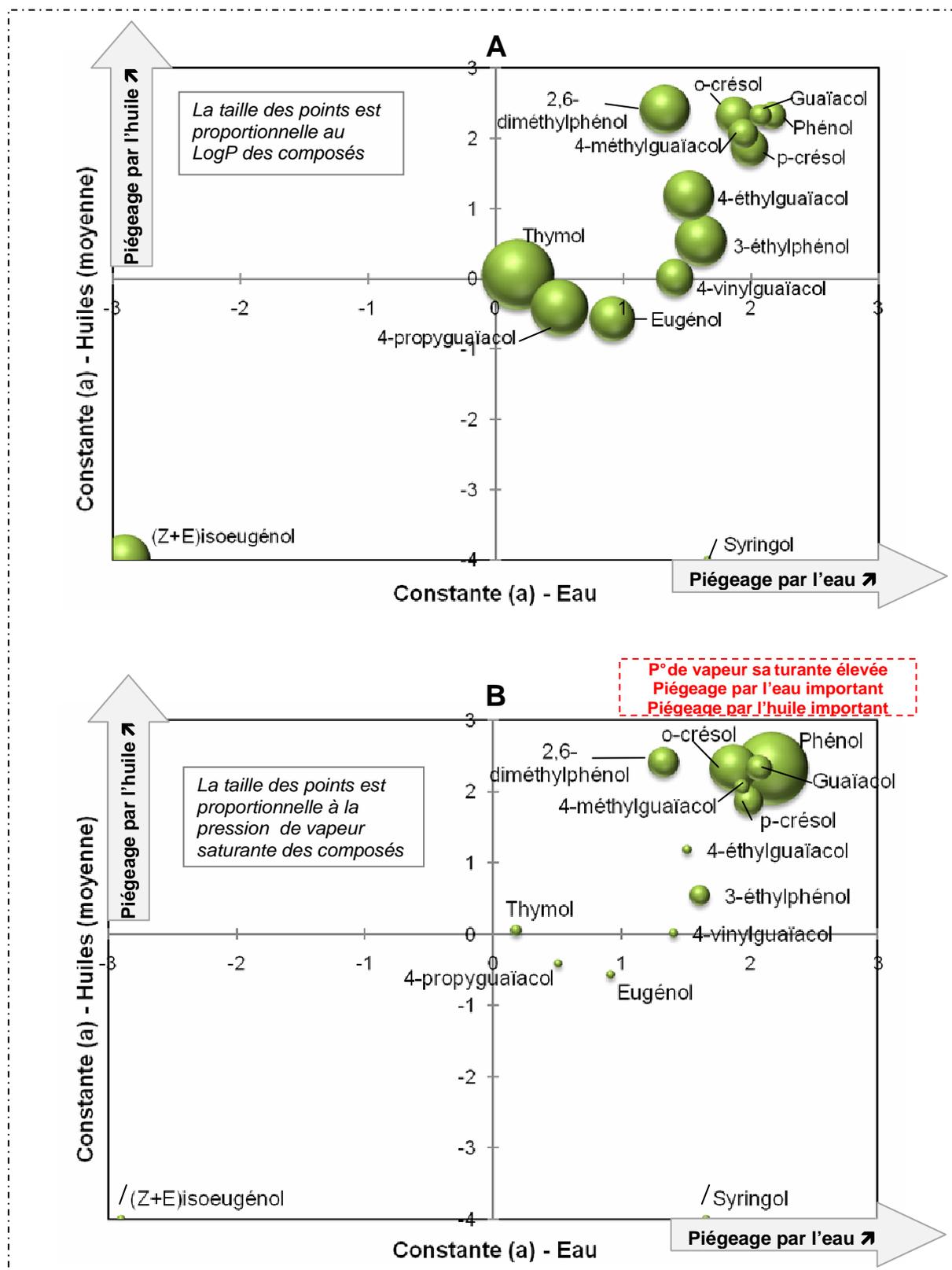


Figure 102 : Relations entre les propriétés physico-chimiques des composés phénoliques et leur piégeage par la phase aqueuse et lipidique

Il existe dans l'ensemble peut de différences d'affinité pour les trois huiles testées. Les composés phénoliques se distinguent principalement en termes de différence de piégeage par la phase aqueuse et la phase lipidique.

La volatilité des composés semble prédominante pour le piégeage par les deux types phases, mais les écarts de comportement face à l'eau et à l'huile ne semblent pas explicables par des différences d'hydrophobie.

XVI.2. Protéines sarcoplasmiques

Dans un premier temps, la capacité des protéines sarcoplasmiques lyophilisées et réhydratées à adsorber les composés phénoliques à l'état gazeux a été vérifiée lors d'une série d'essais préliminaires. Après quoi, le piégeage de ces composés par des mélanges protéines sarcoplasmique/eau a été étudié par un plan d'expérience

L'analyse des espaces de tête obtenus pour chaque point du plan expérimental permet d'estimer des surfaces de réponses sur le domaine expérimental. Un exemple est présenté Figure 103 : le piégeage du 4-méthylguaïacol.

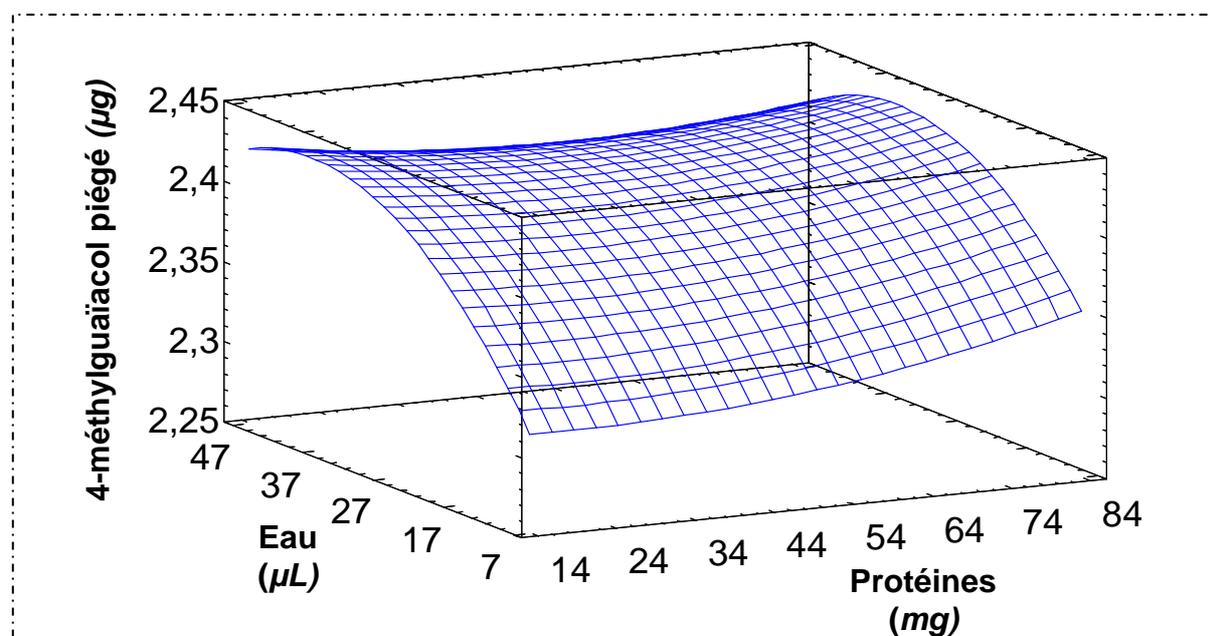


Figure 103 : Surface de réponse estimée - piégeage du 4-méthylguaïacol gazeux par des mélanges eau/protéines sarcoplasmiques

Ces surfaces de réponses et les modèles associés sont difficilement exploitables directement, en particulier car ils ne rendent pas compte de la significativité des variations. Les résultats obtenus sont donc analysés par ANOVA, afin de pouvoir déterminer quelles évolutions de piégeage sont significativement liées aux caractéristiques du mélange testé. Le Tableau 65 présente l'ensemble des résultats statistiques associés.

Tableau 65 : Résultats d'analyse statistique des données du plan d'expérience de mélange eau/protéines sarcoplasmiques

	Niveau de piégeage moyen (μg)	Protéines	Eau	Protéines ² + bloc	Protéines* Eau	Eau ² + bloc	Bloc
		P-value <i>Effet*</i>	P-value	P-value <i>Effet*</i>	P-value	P-value	P-value
Phénol	2,457	0,003 +0,040*	0,073	0,010 -0,039*	0,356	0,293	0,184
o-crésol	2,429	< 0,0001 +0,092*	0,138	0,000 -0,077*	0,428	0,077	0,780
p-crésol	2,429	0,009 +0,059*	0,096	0,009 -0,070*	0,465	0,329	0,261
Guaiacol	2,428	0,001 +0,056*	0,067	0,011 -0,044*	0,058	0,159	0,164
2,6-diméthylphénol	2,363	0,001 +0,213*	0,254	0,000 -0,157*	0,221	0,059	0,547
3-éthylphénol	2,318	0,170	0,091	0,232	0,456	0,961	0,609
4-méthylguaiacol	2,414	< 0,0001 +0,084*	0,084	0,002 -0,079*	0,321	0,233	0,325
4-éthylguaiacol	2,358	0,001 +0,156*	0,220	0,003 -0,163*	0,639	0,446	0,789
Thymol	2,191	0,018 +0,386*	0,280	0,057	0,886	0,915	0,340
4-vinylguaiacol	2,199	0,330	0,154	0,427	0,537	0,715	0,630
Syringol	1,704	0,981	0,543	0,724	0,777	0,106	0,829
Eugénol	2,139	0,203	0,279	0,368	0,660	0,648	0,807
4-propylguaiacol	2,141	0,031 +0,327*	0,365	0,089	0,803	0,968	0,799
(Z+E)isoeugénol	1,414	0,415	0,695	0,907	0,677	0,345	0,713
Somme	30,711	0,122	0,328	0,362	0,747	0,510	0,856

- Les niveaux de significativité témoignant d'un effet significatif au risque 5% est signalée en gras
- Les valeurs d'effets ne sont données que pour les facteurs ayant un effet significatif (*)

Ces résultats nous permettent en premier lieu de vérifier qu'il n'existe pas dans notre expérience d'effet de bloc. De par la conception du plan d'expériences utilisé, il n'est pas possible d'étudier l'effet quadratique de la quantité d'eau (« eau² ») et de protéines (« protéines² ») individuellement, ceux-ci sont confondus avec l'effet de bloc. Etant donné qu'il n'existe pas d'effet de bloc significatif, nous pouvons considérer que nous avons bien pu évaluer et tester les effets quadratiques des deux paramètres.

L'analyse du plan d'expérience montre qu'une quantité croissante de protéines a augmenté le piégeage des composés phénoliques indépendamment de la quantité d'eau ajoutée (effet « protéine » significatifs, mais pas d'effet « protéines*eau » significatifs). Ceci peut indiquer d'une part que l'aptitude à capter les composés phénoliques des protéines sarcoplasmiques est la même quelle que soit leur état d'hydratation. Si cela n'était pas le cas, le piégeage n'aurait pas été influencé par la quantité de protéines présentes mais par la quantité de protéines effectivement réhydratée. Ainsi, hormis les deux exceptions déjà citées (syringol et (Z+E)isoeugénol, voir ci-après), tous les composés phénoliques ont été au moins partiellement captés par les protéines, même lorsqu'elles n'ont pas été du tout réhydratées.

C'est un aspect des résultats qui est déterminant car il nous montre que le piégeage des composés étudiés est bien réalisé par les protéines, même si nous n'identifions pas de différence statistiquement significative selon les quantités de protéines utilisées.

D'autre part, ces résultats indiquent indirectement la capacité des composés phénoliques à diffuser à travers la phase aqueuse, jusqu'aux protéines où ils seront retenues. En effet, l'augmentation du piégeage causée par l'augmentation de la quantité de protéines est la même quel que soit la quantité d'eau présente. C'est ce que montre la Figure 104 à travers l'exemple du 4-méthylguaïacol. Nous pouvons en conclure que dans ces conditions l'interaction protéines/composés phénoliques (hors syringol et (Z+E)isoeugénol) est réalisée en présence et en l'absence d'eau selon des cinétiques et des intensités comparables : l'eau n'a pas d'effet « barrière ».

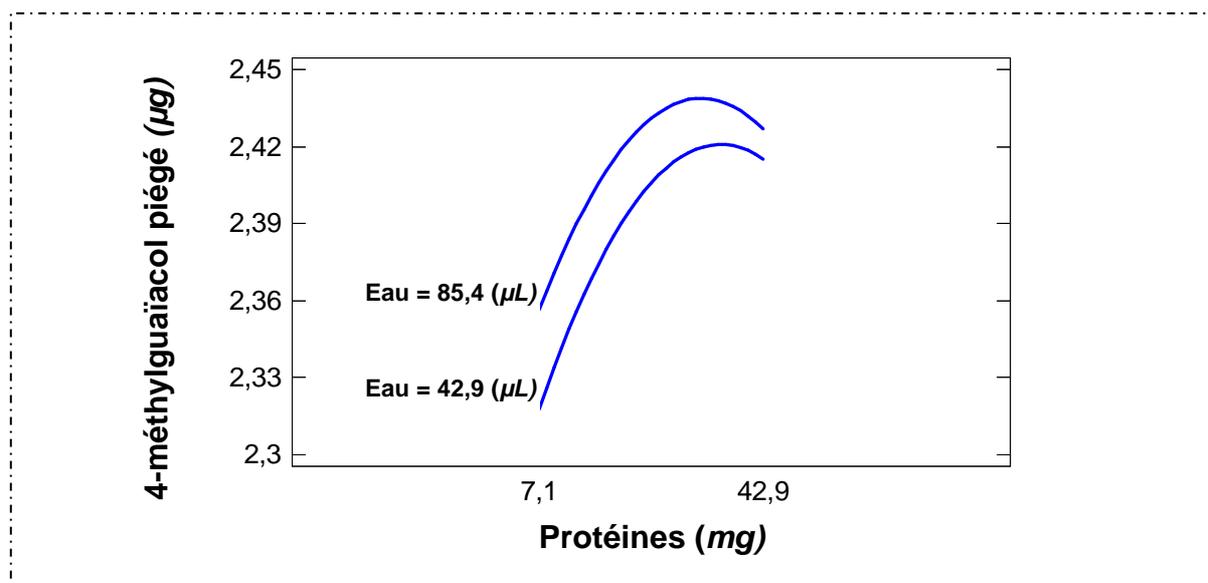


Figure 104 : Graphique de l'interaction protéines*eau pour le 4-méthylguaïacol

Nous avons par ailleurs pu noter que certains composés phénoliques n'ont pas été adsorbés par les échantillons qui ne contiennent que des protéines sèches (P15 et P16) : le syringol et l'isoeugénol (Z+E). Qui plus est, le piégeage de ces composés est plus faible dans les échantillons P03 et P04, c'est à dire ceux qui possèdent le ratio eau/protéines le plus faible (0,34). Ceci pourrait indiquer que l'adsorption de ces molécules par les protéines sarcoplasmiques nécessite une présence d'eau. Dans ce cas il n'est cependant pas possible de préciser si l'action de l'eau se fait au niveau de l'analyte (par exemple : nécessité de solubilisation du composés phénolique) ou du substrat (par exemple : nécessité d'hydrater les protéines pour qu'elles puissent avoir une conformation spatiale adéquate). Il aurait également pu être envisagé que ces composés n'aient pas du tout interagi avec les protéines, même une fois réhydratées. Le faible niveau de piégeage pour ces quatre points expérimentaux (P15, P16, P03 et P04) serait simplement dû à la faible quantité d'eau présente. Cette hypothèse n'est cependant pas soutenue par les résultats statistiques puisque la quantité croissante d'eau n'a pas engendré de piégeage croissant, comme cela a déjà été mis en évidence avec des volumes d'eau pure comparables (voir XVI.1.2.2, p.253).

Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il pourrait fournir une autre d'explication qu'un manque de volatilité ou de lipophilie à l'absence de piégeage du syringol et des isomères d'isoeugénol par des matrices modèles (voir XV.1, p.239). En effet, les matrices modèles ont été fabriquées à partir de pulpe de poisson, c'est-à-dire des protéines myofibrillaires insolubles. Ainsi, même si les matrices utilisées étaient très riches en eau, le syringol et les isomères d'isoeugénol ne pouvaient peut-être pas interagir avec ces protéines

non-solubilisées. Bien que cette hypothèse de solubilisation du substrat et de l'analyte n'explique pas totalement l'absence d'interaction syringol/matrice et iso Eugenol/matrice, elle permet de comprendre l'importance d'une démarche prenant en compte les composants de la chair de poisson en mélange et à l'état pur.

Dans l'ensemble, les niveaux de piégeage moyens ne semblent pas être directement liés aux caractéristiques des composés étudiés. La pression de vapeur saturante pourrait sembler être liée par une loi logarithmique (Figure 105). Cependant, en dépit de l'allure de la courbe, la régression logarithmique ne révèle pas une telle relation ($R^2 = 0,55\%$).

Un grand nombre d'analytes étant piégés presque intégralement sur l'ensemble du plan d'expérience, il est possible que l'interprétation de ces résultats soit limitée par notre gamme d'étude. En effet, il est envisageable que sur une gamme de piégeage plus étendue (ici limitée à 2,5 µg par la quantité introduite dans l'espace de tête), des écarts plus importants puissent être mis en évidence au sein des composés phénoliques étudiés.

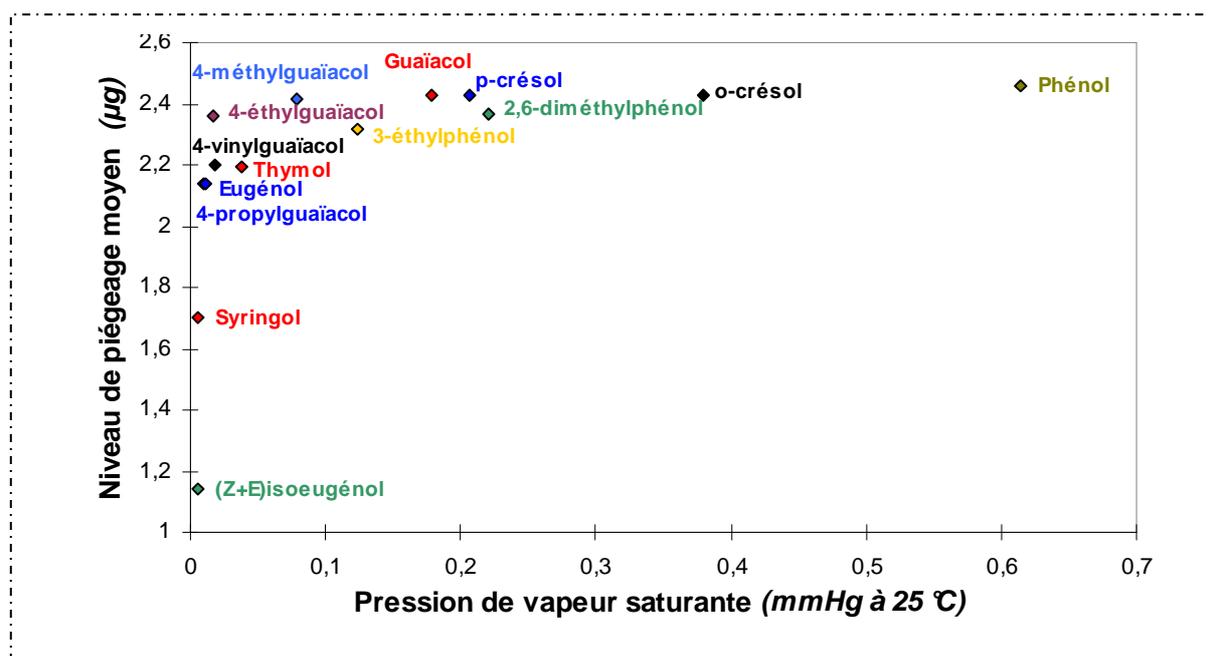


Figure 105 : Relation entre la pression de vapeur saturante des analytes et leur piégeage moyen par adsorption

Enfin, bien que significatifs, les effets (linéaires et quadratiques) de la quantité de protéines présente dans le vial expérimental sur le piégeage des composés phénoliques doivent être relativisés. En effet, les variations statistiquement significatives représentent une part très marginale du piégeage global qui excède 85% pour les composés concernés (Figure

106). C'est bien ce qui se retrouve sur les surfaces de réponse (Figure 103) dont les pentes sont faibles et les inflexions peu marquées.

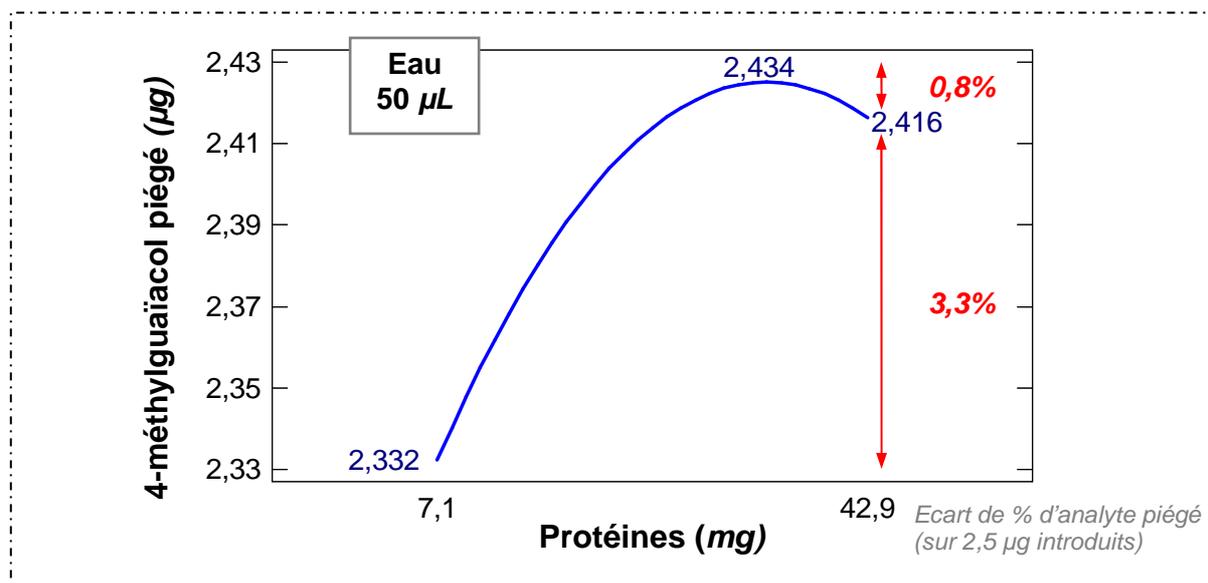


Figure 106 : Piégeage du 4-méthylguaïacol par des quantités croissantes de protéines sarcoplasmiques en présence de 50 µL d'eau

La faible amplitude de ces variations peut être due à la quantité limitée de composés phénoliques dans le vial expérimental. Les composés concernés étant très largement piégés par les faibles quantités de protéines sarcoplasmiques, la fraction libre restante dans l'espace de tête n'est pas suffisante pour permettre la détection de variations de piégeage de forte amplitude lorsque la quantité de protéines augmente.

Toutefois, il reste également envisageable que ces variations ne sont pas limitées par la quantité d'analyte présente dans le vial, elles représenteraient alors le comportement réel des composés concernés face à des quantités croissantes de protéines. Dans ce cas là, il serait possible que de telles modifications de l'adsorption des composés phénoliques ne soient pas déterminantes ou majoritaires lors du fumage d'un produit riche en protéines comme un filet de poisson.

Quoi qu'il en soit de la justification de la faiblesse de ces variations, leur existence nous prouvent néanmoins bien l'existence d'interactions entre les composés phénoliques volatils et une fraction protéique du poisson que cette expérimentation seule ne permet pas d'élucider complètement.

Le syringol et les isomères d'isoeugénol ne semblent pas présenter une aussi grande capacité à interagir avec la fraction sarcoplasmique des protéines de poisson en présence d'eau que les autres composés phénoliques étudiés.

Cependant, l'ensemble des autres molécules testées ont été piégés en très large partie par les échantillons testés et ont permis de mettre clairement en évidence l'existence de rétention de ces composés volatils au niveau des protéines.

XVI.3. Conclusions

Cette série d'expériences a permis de mettre en évidence un certain nombre d'éléments potentiellement déterminants dans le cadre du fumage d'aliments. Avant tout, il a pu être montré sans ambiguïté que les composés phénoliques volatils à l'état gazeux peuvent dans l'ensemble être captés par sorption par l'ensemble des fractions du filet de poisson.

Les composés phénoliques qui se démarquent le plus des tendances générales sont le syringol, le (Z)isoeugénol et le (E)isoeugénol. Ceux-ci ne sont en effet pas piégés par les huiles et ne semblent pas non plus pouvoir interagir avec les protéines solubles.

Bien qu'il semble se dégager certaines tendances parmi les résultats obtenus (en particulier des liens entre l'adsorption des composés phénoliques et leurs propriétés de volatilité), celles-ci n'ont pas pu être clairement démontrées. Il est possible que la confirmation -ou l'infirmité- de celles-ci puisse venir d'un élargissement de la gamme d'étude, afin de disposer de données qui ne seraient pas limitées par la quantité initiale de composés phénoliques.

Cependant, en prenant en compte les limitations inhérentes à la méthode d'étude choisie, il a été possible d'analyser indirectement des phénomènes d'interactions entre composés volatils et substrats liquides et solides. La finesse des écarts mesurés lors de certaines expériences peut laisser des doutes quant à l'application de ces résultats dans le cadre d'un fumage réel. En revanche, elle montre la pertinence de l'étude des phénomènes de sorptions à travers l'analyse de l'espace de tête telle qu'elle a été réalisée.

XVII. Conclusions - Seconde partie

L'ensemble des travaux visant à la compréhension du dépôt et de l'adsorption des composés de la fumée au cours du fumage a permis de produire une variété de résultats à visée technologique et théorique.

Les expérimentations réalisées à l'aide de matrices modèles ont montré l'intérêt d'une telle approche pour l'élucidation partielle du processus de fumage. Les échantillons mis en oeuvre ont permis de souligner clairement l'importance de la composition du produit à fumer tout en s'affranchissant de la structure organisée du filet de poisson. Lors des expériences réalisées en conditions de fumage réel, nous avons pu constater que c'est en particulier la présence d'une phase lipidique qui peut accélérer l'enrichissement du produit en composés phénoliques et hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Par ailleurs, le développement d'une méthodologie pertinente et facilement mise en oeuvre a rendu possible l'étude spécifique des phénomènes de sorption des composés phénoliques pouvant se dérouler pendant le fumage. Les essais réalisés avec des matrices modèles ont permis de confirmer l'importance de la présence d'une phase grasse lors de la captation des composés phénoliques à l'état gazeux. Qui plus est, ils ont également permis de mettre en évidence des phénomènes de relargage de composés volatils différents selon la composition du produit. L'ensemble de ces observations inciteraient donc à mettre la connaissance de la composition des produits à fumer au centre des préoccupations des industriels, puisque celle-ci peut avoir des effets tant technologiques (lors du process de fabrication) qu'organoleptiques (au niveau du produit fini).

Enfin, les travaux réalisés en milieu modèle statique ont permis de mieux comprendre le rôle spécifique de chaque composant de la chair de poisson dans ces phénomènes de sorption. La plupart des composés phénoliques volatils étudiés à l'état gazeux se sont révélés capables d'être piégés et d'interagir avec n'importe quelle fraction du filet de poisson (lipides, protéines, eau). Cependant, certains analytes comme syringol, le (Z)isoeugénol et le (E)isoeugénol ne semblent pas systématiquement interagir avec les lipides et les protéines solubles sarcoplasmiques. Ceux-ci mettent en avant la probable complexité de l'ensemble des phénomènes de sorptions se déroulant au cours du fumage pour les milliers de composés de natures différentes présents dans la fumée. Bien que la portée de ces résultats soit restreinte par la simplification du milieu d'étude, ceux-ci ouvrent des perspectives d'études pour tendre à une meilleure connaissance de la physicochimie du fumage.

Synthèse et Perspectives

L'objectif de ces travaux était d'apporter de nouveaux éléments de compréhension et de maîtrise du procédé industriel de fumage, en particulier lors des étapes de production de la fumée et d'exposition du produit. La fumée étant un milieu d'une extrême complexité chimique, son analyse exhaustive n'était pas envisageable au cours des différentes étapes de ces travaux. Nous avons donc ciblé les deux classes chimiques prépondérantes de la fumée qui permettent d'appréhender les aspects positifs et négatifs du fumage : les composés phénoliques volatils d'une part et les hydrocarbures aromatiques polycycliques d'autre part. Les études réalisées sur ces familles de composés ont porté sur :

- ♦ le fonctionnement d'un générateur industriel de fumée alimentaire,
- ♦ l'enrichissement en composés de fumée d'aliments modèles soumis à un fumage,
- ♦ le piégeage par sorption de composés phénoliques par des matrices modèles.

L'échelle et les outils d'étude ont dû être adaptés spécifiquement afin de répondre à chacune des problématiques, ce qui a imposé le développement et la mise en place d'un certain nombre des éléments utilisés. Afin d'analyser directement la composition de la fumée, nous avons été amenés à mettre en place un pilote complexe à taille industrielle comprenant un piège à fumée construit pour les besoins de notre étude. Nous avons également fabriqué des matrices modèles à base de constituants de poisson dont la composition variable permet de reproduire globalement celle d'une large gamme de filets de poisson. Du point de vue analytique, bien que l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle totale ait été envisagée, son apport ne s'est pas révélé déterminant pour l'étude de nos composés cibles. Enfin, une méthode d'analyse de l'espace de tête a été développée pour permettre de mesurer facilement les phénomènes de sorption se déroulant à l'interface de l'air et d'un produit.

La production de fumée à partir d'un générateur à friction est principalement dépendante de deux paramètres technologiques : les temps d'appui de la bûche sur le rotor, et l'essence de bois utilisée. Les résultats obtenus montrent cependant l'intérêt d'autres éléments moins souvent envisagés, comme l'apport d'air comprimé directement au niveau de la zone de pyrolyse, pour pouvoir diminuer la contamination en HAP. L'utilisation du pilote expérimental a également permis de souligner la complexité du fonctionnement de ce type de générateurs de fumée. Contrairement aux générateurs plus traditionnels pour lesquels le bois (sous forme particules) sera surtout déterminant de par sa composition chimique ; nous avons

pu mettre en avant le rôle potentiel de ses caractéristiques physiques lorsqu'il est utilisé sous forme de bûches.

Un effort dans l'instrumentation de générateurs de fumée à friction serait très probablement le moyen le plus direct d'aboutir à une plus grande maîtrise de leur fonctionnement. Il est en effet nécessaire de pouvoir parvenir à une meilleure connaissance des conditions de fonctionnement, et tout particulièrement en termes de température de pyrolyse subie par le bois. L'utilisation de bûches reconstituées à partir de copeaux serait également une approche intéressante. Il serait en effet possible de distinguer l'influence de la composition d'un bois de celle de sa dureté en comparant les fumées obtenues à partir de matériaux chimiquement proches mais physiquement différents.

Le fumage de matrices modèles en conditions industrielles a permis de montrer clairement que la composition du produit peut être un paramètre déterminant du procédé de fumage. Etant donné que la présence d'une phase lipidique augmente de manière significative le dépôt des composés de la fumée, nous pouvons envisager par exemple que des poissons gras comme le saumon subiront un fumage plus intensif que des églefins traités dans des conditions identiques. Le fait que les matrices modèles utilisées soient déstructurées ne limite que partiellement la portée de ces résultats qui sont potentiellement transposables à des produits alimentaires réels à base de mélanges mixés (type saucisses) qui ne possèdent pas non plus de macrostructure organisée

Une prolongation de ces travaux pourrait évidemment être le suivi de la cinétique de fumage sur des durées plus longues. Celles-ci pourraient d'une part être à même d'apporter des informations plus détaillées concernant les hydrocarbures aromatiques polycycliques et d'autre part d'apprécier de plus fortes charges en composés phénoliques. Cependant, de telles investigations ne semblent *a priori* spécifiquement pertinentes pour le fumage de poisson que si les matrices employées permettent de prendre en considération la structuration du filet. En effet, à mesure que le fumage se déroule, les phénomènes d'enrichissement de surface sont progressivement limités par les phénomènes de diffusion au cœur du produit. Il est probable qu'à mesure que ceux-ci deviennent déterminants, la structuration du produit devienne un point critique du processus global de fumage.

La mise en évidence des phénomènes de sorption impliquant les composés phénoliques à l'interface du produit a avant tout permis de confirmer l'existence des phénomènes de transfert de composés aromatiques à partir de la phase gazeuse de la fumée. Par ailleurs, les

résultats obtenus ont permis en partie de confirmer et d'expliquer les observations réalisées en conditions de fumage réel. Bien que la méthodologie employée ne soit pas quantitative, elle a permis de mettre en évidence des différences de comportement des composés étudiés, en particulier en termes d'affinité avec les fractions aqueuse et lipidique du filet de poisson.

Ces résultats pourraient être complétés par l'étude d'une plus grande variété de composés volatils de la fumée. En effet, la prise en compte des molécules de classes chimiques variées aux propriétés physico-chimiques très différentes serait peut-être le moyen d'établir des liens plus marqués entre phénomènes de sorption et nature des composés impliqués. En particulier, comme il a été montré qu'une partie des HAP les plus légers était probablement soumise à des phénomènes de sorption comparables pendant le fumage, leur étude par la même méthode serait envisageable. Elle nécessiterait cependant des aménagements adéquats, pour pouvoir prendre en considération les spécificités de l'analyse de ces molécules (que ce soit au niveau de l'extraction, de la séparation ou de l'analyse par spectrométrie de masse).

Finalement, il ressort de ces travaux que la compréhension et la maîtrise de l'ensemble du de fumage passe par l'étude conjointe de procédés industriels réels et de mécanismes physico-chimiques en milieu modèle. Bien que des zones d'ombres persistent à l'heure actuelle sur bien des aspects du fumage, la poursuite de ces travaux devrait permettre de continuer l'amélioration des produits de fumaison. En particulier, la mise en place de nouvelles réglementations et la pression des consommateurs pourraient imposer aux acteurs de la filière d'élucider plus précisément les phénomènes sous-jacents mis en jeu.

Références bibliographiques

Adahchour, M., Beens, J., Brinkman, U.A.Th. (2008). Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. chromatogr. A*, 1186(1-2), 67-108.

AFNOR. (1996). Poisson transformé, Filets de hareng fumé. NF V 45-067. Association Française de Normalisation, Paris.

AFSSA. (2003). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'avis sur l'évaluation des risques présentés par le benzo[a]pyrène (B(a)P) et par d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), présents dans diverses denrées ou dans certaines huiles végétales, ainsi que sur les niveaux de concentration en HAP dans les denrées au-delà desquels des problèmes de santé risquent de se poser. Saisine n°2000-SA-0005.

Aguinaga, N., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M. (2007). Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 596(2), 285-290.

Aguinaga, N., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M. (2008a). A headspace solid-phase microextraction procedure coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391(3), 753-758.

Aguinaga, N., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M. (2008b). Evaluation of solid-phase microextraction conditions for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic species using gas chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391(4), 1419-1424.

Alais, C., Linden, G., Miclo, L. (2005). *Biochimie Alimentaire*. Dunod Ed., Paris, France.

Alén, R., Oesch, P., Kuoppala, E. (1995). Py-GC/AED studies on the thermochemical behavior of softwood. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 35, 259-265.

Alén, R., Kuoppala, E., Oesch, P. (1996). Formation of the main degradation compound groups from wood and its components during pyrolysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 36, 137-148.

Ali, Md.Y. & Cole, R.B. (1998). SFE Plus C18 Lipid Cleanup Method for Selective Extraction and GC/MS Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Biological Tissues. *Anal. Chem.*, 70(15), 3242-3248.

Ali, Md.Y. & Cole, R.B. (2001). SFE-plus-C18 lipid cleanup and selective extraction method for GC/MS quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat. *J. Agric. Food Chem.*, 49(9), 4192-4198.

Ali, Md.Y. & Cole, R.B. (2002). One-step SFE-plus-C18 selective extraction of low-polarity compounds, with lipid removal, from smoked fish and bovine milk. *Anal. Bioanal. Chem.*, 374(5), 923-931.

Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Aragón-Piña, A., Tran, T.C., Morrison, P., Marriott, P.J. (2008). Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons based on

comprehensive two-dimensional gas chromatography–isotope dilution mass spectrometry. *J. chromatogr. A*, 1201, 161-168.

Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P. (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*, 49, 704-712.

Andreoli, R., Manini, P., Bergamaschi, E., Mutti, A., Franchini, I., Niessen, W.M.A. (1999). Determination of naphthalene metabolites in human urine by liquid chromatography – mass spectrometry with electrospray ionization. *J. chromatogr. A*, 847, 9-17.

ANSES. (2010). Consommation des poissons, mollusques et crustacés : Aspects nutritionnels et sanitaires pour l'Homme.

Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H. (2005). Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *J. Chromatogr. A*, 1073(1-2), 323-330.

Araki, R.Y., Dodo, G.H., Reimer, S.H., Knight, M.M. (2001). Protocol for the determination of selected neutral and acidic semi-volatile organic contaminants in fish tissue. *J. Chromatogr. A*, 923(1-2), 177-185.

Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 106-114.

Baker, R.R. (1987). A review of pyrolysis studies to unravel reaction steps in burning tobacco. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 11, 555-573.

Bakker, M.I., Casado, B., Koerselman, J.W., Tolls, J., Kollöffel, C. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery. *The Science of the Total Environment*, 263, 91-100.

Balejko, J.A. (1991). Production of curing smoke: Rate of thermal decomposition of sawdust under anaerobic conditions. *J. Sci. Food Agric.*, 57(3), 391-398.

Ballesteros, E., García Sánchez, A., Ramos Martos, N. (2006). Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/ tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1111(1), 89-96.

Barranco, A., Alonso-Salces, R.M., Bakkali, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., Sarobe, M. (2003). Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *J. Chromatogr. A*, 988, 33-40.

Barranco, A., Alonso-Salces, R.M., Corta, E., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., Sarobe, M. (2004). Comparison of donor-acceptor and alumina columns for the clean-up of polycyclic aromatic hydrocarbons from edible oils. *Food Chem.*, 86(3), 465-474.

Barrefors, G. & Petersson, G. (1995a). Volatile hydrocarbons from domestic wood burning. *Chemosphere*, 30(8), 1551-1556.

- Barrefors, G. & Petersson, G. (1995b). Assessment by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of volatile hydrocarbons from biomass burning. *J. Chromatogr. A*, 710, 71-77.
- Barrefors, G., Björkqvist, S., Ramnäs, O., Petersson, G. (1996). Gas chromatographic separation of volatile furans from birchwood smoke. *J. Chromatogr. A*, 735, 151-155.
- Bart, J.C.J. (2001). Direct solid sampling methods for gas chromatographic analysis of polymer/additive formulations. *Polym. Test.*, 20(7), 729-740.
- Bencze Røra, A.M., Birkeland, S., Hultmann, L., Rustad, T., Skåra, T., Bjerkgeng, B. (2005). Quality characteristics of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets high in soybean or fish oil as affected by cold-smoking temperature. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 38, 201-211.
- Berset, J.D., Ejem, M., Holzer, R., Lischer, P. (1999). Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Anal. Chim. Acta*, 383, 263-275.
- Bhattacharyya, A.C., Bhattacharjee, A., Guba, O.K., Basu, A.N. (1968). Gas chromatography of monohydric phenols via O-methylation. *Anal. Chem*, 40, 1873-1876.
- Birkeland, S., Bencze Røra, A.M., Skåra, T., Bjerkgeng, B. (2004). Effects of cold smoking procedures and raw material characteristics on product yield and quality parameters of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fillets. *Food Res. Int.*, 37(3), 273-286.
- Body, D.R. & Vlieg, P. (1989). Distribution of the lipid classes and eicosapentaenoic (20:5) and docosahexaenoic (22:6) acids in different sites in blue mackerel (*Scomber australasicus*) fillets. *J. Food Sci.*, 54, 569-572.
- Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., Pizzariello, A. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem.*, 100, 1481-1489.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56, 317-333.
- Brul, S. & Coote, P. (1999) Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 1-17.
- Burova, T.V., Grinberg, N.V., Grinberg, V.Y., Tolstoguzov, V.B. (2003). Binding of odorants to individual proteins and their mixtures. Effects of protein denaturation and association. A plasticized globule state. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2-3), 235-244.
- Burtscher, H. (2004). Physical characterization of particulate emissions from diesel engines : a review. *J. Aerosol Sci.*, 36(7), 896-932.
- Buttery, R.G., Turnbaugh, J.G., Ling, L.C. (1988). Contribution of volatiles to rice aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 36(5), 1006-1009.

Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L.C., Turnbaugh, J.G. (1990). Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 336-340.

Cai, S.-S., Syage, J.A., Hanold, K.A., Balogh, M.P. (2009). Ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for high-sensitivity and high-throughput analysis of U.S. Environmental Protection Agency 16 priority pollutants polynuclear aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.*, 81(6), 2123-2128.

Canas, S., Belchior, A.P., Spranger, M.I., Bruno-De-Sousa, R. (2003). High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J. Sep. Sci.*, 26, 496-502.

Cardinal, M., Berdagué, J.L., Dinel, V., Knockaert, C., Vallet, J.L. (1997). Effet de différentes techniques de fumage sur la nature des composés volatils et les caractéristiques sensorielles de la chair de saumon. *Sci. Alim.*, 17, 679-696.

Cardinal, M., Knockaert, C., Torrissen, O., Sigurgisladottir, S., Morkore, T., Thomassen, M., Luc Vallet, J. (2001). Relation of smoking parameters to the yield, colour and sensory quality of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Research International*, 34(6), 537-550.

Cardinal, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjoernevik, M., Ouisse, A., Vallet, J.L., Leroi, F. (2004). Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Res. Int.*, 37(2), 181-193.

Causeret, J. (1962). Fish as a source of mineral nutrition. In: *Fish as food Vol.11*, Ed. Borgstrom, 205-228.

Cavagnino, D., Magni, P., Zilioli, G., Trestianu, S. (2003). Comprehensive two-dimensional gas chromatography using large sample volume injection for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in complex matrices. *J. Chromatogr. A*, 1019(1-2), 211-220.

Chan, W.S. & Toledo, R.T. (1975). Effect of smokehouse temperature, humidity and air flow on smoke penetration into fish muscle. *J. food Sci.*, 40, 240-243.

Chandrasekhar, T.C. & Kaveriappa, K.M. (1985). A process for reduction of benzo(a)pyrene content in smoked oil sardine. In : *Spoilage of tropical fish and product development*. FAO Fisheries Rep. No. 317, Ed. A. Reilley, Rome, 262-266.

Charles, M., Martin, B., Ginies, C., Etiévant, P.X., Coste, G., Guichard, E. (2000). Potent Aroma Compounds of Two Red Wine Vinegars. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 70-77.

Chen, L.-B. & Issenberg, P. (1972). Interactions of smoke wood components with amino groups in proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 20(6), 1113-1115.

Chen, B.H., Wang, C.Y., Chiu, C.P. (1996). Evaluation of Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Meat Products by Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 44(8), 2244-2251.

- Chen, B.H. & Lin, Y.S. (1997). Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Processing of Duck Meat. *J. Agric. Food Chem.*, 45(4), 1394-1403.
- Chen, G.H., Tang, S.J., Chen, C.S., Jiang, S.T. (2001). High-level production of recombinant chicken cystatin by *Pichia pastoris* and its application in mackerel surimi. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 641-646.
- Chen., S. & Chen, S. (2005). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by low density polyethylene from liquid model and roasted meat. *Food Chem.*, 90, 461-469.
- Chen, Y.C. & Chen, B.H. (2003). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fumes from fried chicken legs. *J. Agric. Food Chem.*, 51(14), 4162-4167.
- Chéret, R. (2005). Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson. Thèse de doctorat, Université de Nantes, École Polytechnique de l'Université de Nantes.
- Chiu, C.P., Lin, Y.S., Chen, B.H. (1997). Comparison of GC-MS and HPLC for overcoming matrix interferences in the analysis of PAHs in smoked food. *Chromatographia*, 44(9-10), 497-504.
- Chopin, C., Kone, M., Serot, T. (2007). Study of the interaction of fish myosin with the products of lipid oxidation: The case of aldehydes. *Food Chem.* 105(1), 126-13.
- Chortyk, O.T. & Schlotzhauer, W.S. (1973). Studies on the pyrogenesis of tobacco smoke constituents (a review). *Beitr. Tabakforsch.*, 7(3), 165-178.
- Clifford, M.N., Tang, S.L., Eyo, A.A. (1980). Smoking of foods. *Process Biochemistry*, June/July, 8-11.
- Cole, J.A., Bittner, J.D., Longwell, J.P., Howard, L.B. (1984). Formation mechanisms of aromatic compounds in aliphatic flames. *Combust. Flame*, 56, 51-70.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4), 564-582.
- d'Acampora Zellner, B., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L. (2008). Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A*, 1186(1-2), 123-143.
- Da Porto, C., Moret, S., Soldera, S. (2005). A study on the composition of distillates obtained from smoked marc. *Anal. Chim. Acta*, 563(1), 396-400.
- David, F. & Sandra, P. (2007). Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *J. Chromatogr. A*, 1152(1-2), 54-69.
- Dean, B.J. (1978). Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat. Res.*, 47, 75-97.
- Demirbaş, A. & Arin, G. (2002). An overview of biomass pyrolysis. *Energy Sources Part A*, 24(5), 471-482.

- Dias, V. & Vandooren, J. (2004). Chimie de la combustion - Flamme à base d'hydrocarbures. Techniques de l'ingénieur. AF6210.
- Djinovic, J., Popovic, A., Jira, W. (2008a). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditional and industrial smoked beef and pork ham from Serbia. Eur. Food Res. Technol., 227(4), 1191-1198.
- Djinovic, J., Popovic, A., Jira, W. (2008b). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. Meat Sci., 80(2), 449-456.
- Dos Santos Barbosa, J.M., Ré-Poppi, N., Santiago-Silva, M. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons from wood pyrolysis in charcoal production furnaces. Environ. Res., 101, 304-311.
- Dunn, M.S., Shellie, R.A., Morrison, P.D., Marriott, P.J. (2004). Rapid sequential heart-cut multidimensional gas chromatographic analysis. J. Chromatogr. A, 1056, 163-169.
- Easton, M.D.L., Lusznjak, D., Von der Geest, E. (2002). Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed. Chemosphere, 46, 1053-1074.
- EFSA. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. The EFSA journal, 724, (www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/s724.pdf).
- Engel, W., Bahr, W., Schieberle, P. (1999). Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. Eur. Food Res. Technol., 209(3-4), 237-241.
- Faith, N.G., Yousef, A.E., Luchansky, J.B. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. J. Food Safety, 12, 303-314.
- Fauconneau, B., Chmaitilly, J., Andre, S., Cardinal, M., Cornet, J., Vallet, J.L., Dumont, J.P., Laroche, M. (1993). Caractéristiques de la chair de la truite arc-en-ciel : 2. Composantes physiques et sensorielles. Sci. Alim., 13, 188-198.
- Fauconneau, B., Alami-Durante, H., Laroche, M., Marcel, J., Vallot, D. (1995). Growth and meat quality relations in carp. Aquaculture, 129, 265-297.
- Fauconneau, B. & Laroche, M. (1996). Characteristics of the flesh and quality of products of catfishes. Aquat. Living Resour., 9, 165-179.
- Fazzalari, F.A. (1978). Compilation of odor and taste threshold values data. ASTM Data Series DS 48A. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, U.S.A.
- Fernandez, X. & Cabrol-Bass, D. (2007). Analyse des arômes. Techniques de l'ingénieur, ref : P3233.

- Ferrari, S., Mandel, F., Berset, J.D. (2002). Quantitative determination of 1-hydroxypyrene in bovine urine samples using high-performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection. *Chemosphere*, 47, 173-182.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., Cacho, J. (2002). Chemical characterization of the aroma of grenache rosé wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4048-4054.
- Fiddler, W., Wasserman, A.E., Doerr, R.C. (1970). A "Smoke" flavor fraction of a liquid smoke solution. *J. Agric. Food Chem.*, 18(5), 934-936.
- Forehand, J.B., Dooly, G.L., Moldoveanu, S.C. (2000). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenols and aromatic amines in particulate phase cigarette smoke using simultaneous distillation and extraction as a sole sample clean-up step. *J. Chromatogr. A*, 898, 111-124.
- Foster, W.W. & Simpson, T.H. (1961). Studies of the smoking process for foods. The importance of vapors. *J. Sci. Food Agric.*, 12(5), 363-374.
- Foster, W.W., Simpson, T.H., Campbell, D. (1961). Studies of the smoking process for foods. The role of smoke particles. *J. Sci. Food Agric.*, 12(9), 635-644.
- FranceAgriMer. (2010). Données statistiques 2009 - Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture. Etablissement National des produits de l'agriculture et de la mer, France.
- Frank, D.C., Owen, C.M., Patterson, J. (2004). Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 37, 139-154.
- Frankel, E.N. (1993). Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. *J. Am. oil Chem. Soc.* 70, 767-772.
- Frenklach, M., Clary, D.W., Gardiner, W.C., Stein, S.E. (1984). Detailed kinetic modeling of soot formation in shock-tube pyrolysis of acetylene. *Proc. Combust. Instit.*, 20, 887-901.
- Frenklach, M., Clary, D.W., Gardiner, W.C., Stein, S.E. (1986). Effect of fuel structure on pathways to soot. *Proc. Combust. Instit.*, 21, 1067-1076.
- Frenklach, M. & Wang, H. (1990). Detailed modeling of soot particle nucleation and growth. *Proc. Combust. Instit.*, 21, 1559-1566.
- Fujimaki, M., Kim, K., Kurata, T. (1974). Analysis of flavor constituents in aqueous smoke condensates from various woods. *Agr. Biol. Chem.*, 38(1), 45-52.
- Fujita, T., Nishimura, K., Takayama, C., Yoshida, M., Uchida, M. (2001). Hydrophobicity as a Key Physicochemical Parameter of Environmental Toxicology of Pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, CA, USA. 649-670.

- Gallart-Jornet, L., Barat, J.M., Rustad, T., Erikson, U., Escriche, I., Fito, P. (2007). A comparative study of brine salting of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Eng.*, 79(1), 261-270.
- Geri, G., Poli, B.M., Gualtieri, M., Lupi, P., Parisi, G. (1995). Body traits and chemical composition of muscle in common carp (*Cyprinus carpio L.*) as influenced by age and rearing environment. *Aquaculture*, 129, 329-333.
- Geus, H. & Boer, J. (1996). Multidimensionality in gas chromatography. *Anal. Chem.*, 15, 168-178.
- Giessing, A.M.B., Mayer, L.M., Forbes, T.L. (2003). Synchronous fluorescence spectrometry of 1-hydroxypyrene : a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes. *Marine Environ. Research*, 56, 599-615.
- Girard, J.P., Talon, R., Sirami, J. (1982). Le fumage électrostatique : son efficacité relativement à deux paramètres technologiques. *Sci. Alim.*, 2, 1-15.
- Girard, J.P. (1988). La fumaison, *Technologie de la viande et des produits carnés*. Ed. Lavoisier. 171-214.
- Goll, D.E., Otsuka, Y., Nagainis, P.A., Shannon, J.D., Sathe, S.K., Murguma, M. (1983). Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. *J. Food Biochem.*, 7, 137-177.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Taylor, R.G., Zalewska, T. (1992). Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin ? *Bioessays*, 14(8), 549-556.
- Gomes-Zuin, V., Montero, L., Bauer, C., Popp, P. (2005). Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *J. Chromatogr. A*, 1091(1-2), 2-10.
- Gomes-Zuin, V., Schellin, M., Montero, L., Yariwake, J.H., Augusto, F., Popp, P. (2006). Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. *J. Chromatogr. A*, 1114(2), 180-187.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P., Sopelana, P., Guillén, M.D. (2011). Oxidative stability, volatile components and polycyclic aromatic hydrocarbons of cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*) and dolphin.sh (*Coryphaena hippurus*). *LWT Food Sci. Technol.*, 44, 1517-1524.
- Gómez-Ruiz, J.A. & Wenzl T. (2009). Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15 + 1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Anal. Bioanal. Chem.*, 393(6-7), 1697-1707.
- González, J.F, Román, S., Encinar, J.M., Martínez, G. (2009). Pyrolysis of various biomass residues and char utilization for the production of activated carbons. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 85(1-2), 134-141.

- González-Mancebo, S., García-Santos, M.P., Hernández-Bonito, J., Calle, E., Casado, J. (1999). Nitrosation of phenolic compounds: inhibition and enhancements. *J. Agric. Food Chem.*, 47(6), 2235-2240.
- Górna-Binkul, A. & Buszewski, B. (1997). Volatile organic air contaminants in plants - Comparative investigations of toluene sorption in fruit and chemically modified adsorbents. *Environ. Sci. & Pollut. Res.*, 4(3), 125-129.
- Goulas, A.E. & Kontominas, M.G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*) : biochemical and sensory attributes. *Food Chem.*, 93, 511-520.
- Guille Des Buttes, J., Knockaert, C., Vallet, J.L. (1999). Bloc de materiau composite pour la génération de fumée par friction dans les installations de fumage de produits alimentaires carnés et son procédé de fabrication. Brevet d'invention, FR2768306.
- Guillén, M.D., Manzanos, M.J., Zabala, L. (1995). Study of a commercial liquid smoke flavoring by means of gas chromatography / mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 463-468.
- Guillén, M.D. & Manzanos, M.J. (1996a). Study of the components of a solid smoke flavouring preparation. *Food Chem.*, 55(3), 251-257.
- Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L. (1996b). Relationships between the maximum temperature reached in the smoke generation processes from *Vitis vinifera* L. shoot sawdust and composition of the aqueous smoke flavoring preparations obtained. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1302-1307.
- Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L. (1996c). Volatile components of aqueous liquid smokes from *Vitis vinifera* L shoots and *Fagus sylvatica* L wood. *J. Sci. Food Agric.*, 72, 104-110.
- Guillén, M.D. & Manzanos, M.J. (1997). Characterization of the components of a salty smoke flavouring preparation. *Food Chem.*, 58(1-2), 97-102.
- Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L. (1998). New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1276-1285.
- Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L. (1999a). Influence of the moisture content on the composition of the liquid smoke produced in the pyrolysis process of *Fagus sylvatica* L. wood. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4126-4136.
- Guillén, M.D. & Manzanos, M.J. (1999b). Extractable components of the aerial parts of *salvia lavandulifolia* and composition of the liquid smoke flavoring obtained from them. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3016-3027.
- Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L. (1999c). GC/MS analysis of lignin monomers, dimers and trimers in liquid smoke flavourings. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 1889-1903.

Guillén, M.D. & Manzanos, M.J. (1999d). Smoke and liquid smoke. Study of an aqueous smoke flavouring from the aromatic plant *Thymus vulgaris* L. J. Sci. Food Agric., 79, 1267-1274.

Guillén, M.D., Sopelana, P., Partearroyo, M.A. (2000a). Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. J. Agric. Food Chem., 48, 5083-5087.

Guillén, M.D., Sopelana, P., Partearroyo, M.A. (2000b). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial liquid smoke flavorings of different compositions by gas chromatography – mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 48, 126-131.

Guillén, M.D., Sopelana, P., Partearroyo, M.A. (2000c). Study of several aspects of a general method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavourings by gas chromatography-mass spectrometry. Food Addit. Contamin., 17(1), 27-44.

Guillén, M.D., Manzanos, M.J., Ibargoitia, M.L. (2001). Carbohydrate and nitrogenated compounds in liquid smoke flavorings. J. Agric. Food Chem., 49, 2395-2403.

Guillén, M.D. & Manzanos, M.J. (2002a). Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. Food Chem., 79, 283-292.

Guillén, M.D. & Errecalde, M.C. (2002b). Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. J. Sci. Food Agric., 82, 945-952.

Guillén, M.D., Sopelana, P., Palencia, G. (2004). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Olive Pomace Oil. J. Agric. Food Chem., 52(7), 2123-2132.

Guillén, M.D. & Manzanos, M.J. (2005). Characteristics of smoke flavourings obtained from mixtures of oak (*Quercus* sp.) wood and aromatic plants (*Thymus vulgaris* L. and *Salvia lavandulifolia* Vahl.). Flavour Fragr. J., 20, 673-685.

Guillén, M.D., Errecalde, M.C., Salmerón, J., Casas, C. (2006). Headspace volatile components of smoked swordfish (*Xiphias gladius*) and cod (*Gadus morhua*) detected by means of solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Food Chem., 94(1), 151-156.

Gundel, L.A., Lee, V.C., Mahanama, K.R.R., Stevens, R.K., Daisey, J.M. (1995). Direct determination of the phase distributions of semi-volatile polycyclic aromatic hydrocarbons using annular denuders. Atmos. Environ., 29(14), 1719-1733.

Hallier, A. (2004). Qualités organoleptiques de la chair du silure glane (*Silurus glanis*) : effets du milieu d'élevage et de l'alimentation. Thèse de doctorat, Université de Nantes, Faculté des sciences et des techniques.

Hamm, R. (1977). Analysis of smoke and wood smoke. Pure & Appl. Chem, 49, 1655-1666.

Hao, Y.Y., Brackett, R.E., Doyle, M.P. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated beef. J. Food Protect., 61, 307-312.

- Haslam, E. & Lilley, T.H. (1988). Natural astringency in foodstuffs - A molecular interpretation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27, 1-40.
- Hattula, T., Elfving, K., Mroueh, U.M., Luoma, T. (2001). Use of liquid smoke flavouring as an alternative to traditional flue gas smoking of rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*). *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 34, 521-525.
- Henderson, R.J. & Tocher, D.R. (1987). The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.*, 26, 79-85.
- Heredia, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Hernanz, D., Gordillo, B., Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., González-Miret, M.L. (2010). Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chem.*, 118(2), 377-383.
- Hollenbeck, C.M. (1977). Novel concepts in technology and design of machinery for production and application of smoke in the food industry. *Pure & Appl. Chem.*, 49, 1687-1702.
- Hosaya, T., Kawamoto, H., Saka, S. (2007). Cellulose-hemicellulose and cellulose-lignin interactions in wood pyrolysis at gasification temperature. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 80(1), 118-125.
- Houessou, J.K., Delteil, C., Camel, V. (2006). Investigation of sample treatment steps for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in ground coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 54(20), 7413-7421.
- Hsieh, R.J. & Kinsella, J.E. (1989). Lipoyxygenase generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 37(2), 279-286.
- Janoszka, B., Warzecha, L., Błaszczuk, U., Bodzek, D. (2004). Organic compounds formed in thermally treated high protein food Part I: Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Acta Chromatographica*, 14, 115-128.
- Jánská, M., Tomaniová, M., Hajšlová, J., Kocourek, V. (2004). Appraisal of "classic" and "novel" extraction procedure efficiencies for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives from biotic matrices. *Anal. Chim. Acta*, 520(1-2), 93-103.
- JECFA. (2005). Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 8-17 February 2005, (http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf).
- Jie, F. & Kai-Xiong, W. (2007). Multiresidual Analysis of Organochlorine Pesticides, Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Shellfishes by Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. *Chin. J. Anal. Chem.*, 35(11), 1607-1613.
- Jinks, A., & Laing, D.G. (2001). The analysis of odor mixtures by humans: evidence for a configurational process. *Physiol. Behav.*, 72, 51-63.

- Jira, W. (2004a). Chemical reactions of smoking. *Fleischwirtschaft International*, 4 , 21-25.
- Jira, W. (2004b). A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes. *Eur. Food Res. Technol.*, 218(2), 208-212.
- Jørgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P. (2001). Significance of volatile compounds produced by spoilage bacteria in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analyzed by GC/MS and multivariate regression. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2376-2381.
- Julien, S., Chornet, E., Tiwari, P.K., Overend, R.P. (1991). Vacuum pyrolysis of cellulose: Fourier transform infrared characterization of solid residues, product distribution and correlations. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 19, 81-104.
- Kamal-Eldin, A. & Yanishlieva, N.V. (2002). N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 825-836.
- Kannapan, S., Indra Jasmine, G., Jeyachandran, P., Tamil Selvi, A. (2000). Polyaromatic hydrocarbons in processed fishery products. *J. Food Sci. Technol.*, 37(6), 596-601.
- Karbowiak, T., Mansfield, A.K., Barrera-García, V.D., Chassagne, D. (2010). Sorption and diffusion properties of volatile phenols into cork. *Food Chem.*, 122, 1089-1094.
- Kennaway, E.L. (1924). On cancer producing tars and tar-fractions. *Journal of Industrial Hygiene*, 5(12), 462-488.
- Kennaway, E.L. (1930). Further experiments on cancer-producing substances. *Biochemical Journal*, 24, 497-504.
- Kim, K., Kurata, T., Fujimaki, M. (1974). Identification of flavor constituents in carbonyl, non carbonyl neutral and basic fractions of aqueous smoke condensates. *Agric. Biol. Chem.*, 38(1), 53-63.
- Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Akiyama, S., Nakashima, K. (2003). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 789, 257-264.
- Kjällstrand, J., Ramnäs, O., Petersson, G. (1998). Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of 36 lignin-related methoxyphenols from uncontrolled combustion of wood. *J. Chromatogr. A*, 824, 205-210.
- Kjällstrand, J. & Petersson, G. (2001a). Phenolic antioxidants in alder smoke during industrial meat curing. *Food Chem.*, 74, 85-89.
- Kjällstrand, J. & Petersson, G. (2001b). Phenolic antioxidants in wood smoke. *Sci. Total Environ.*, 277, 69-75.
- Knockaert, C. (1990). Le fumage du poisson. Service de la documentation et des publications, Ifremer, Brest.

Knockaert, C., Bardin, J.C., Desportes, G., Vallet, J.L. (1998). Perfectionnement aux dispositifs de fumage électrostatique pour produits alimentaires carnés. Brevet d'invention, FR2765077.

Koffi Houessou, J., Benac, C., Delteil, C., Camel, V. (2005). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew using solid-phase extraction. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 871-879.

Kołodziejska, I., Niecikowska, C., Sikorski, Z.E., Kołakowska, A. (2004). Lipid oxidation and lysine availability in Atlantic mackerel hot smoked in mild conditions. *Bull. Sea Fish. Institute*, 161(1), 15-27.

Kornreich, M.R. & Issenberg, P. (1972). Determination of phenolic wood smoke components as trimethylsilyl esters. *J. Sci. Food Agric.*, 20(6), 1109-1113.

Kostyra, E. & Baryłko-Pikielna, N. (2006). Volatiles composition and flavour profile identity of smoke flavourings. *Food Qual. Preference*, 17(1-2), 85-95.

Krewski, D., Thorslund, T., Withey, J. (1989). Carcinogenic risk assessment of complex mixtures. *Toxicology and industrial health*, 5, 851-867.

Kroll, J. & Rawel, H.M. (2001). Reactions of plant phenols with myoglobin: influence of chemical structure of the phenolic compounds. *J. Food Sci.*, 66(1), 48-58.

Krupadam, R.J., Khan, S.M., Wate, S.R. (2010). Removal of probable human carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated water using molecularly imprinted polymer. *Water Res.*, 44, 681-688.

Lacoste, F., Raoux, R., Dubois, D., Soulet, B. (2003). Problématiques des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les corps gras. *Oléagineux, corps gras, lipides*, 10(4), 287-295.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacol. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 453-462.

Lantz, A.W. & Vaisey, M. (1970). Flavor effects of different woods on whitefish smoked in a kiln with controlled temperature, humidity, and air velocity. *J. Fish. Res. Board Can.*, 27(7), 1201-1207.

Larsen, J.C. & Larsen, P.B. (1998). Chemical carcinogens. *Air Pollution and Health*. Hester, R.E., Harrison, R.M. Eds. Cambridge, UK, 33-56.

Le Guen, S., Prost, C., Demaimay, M. (2000). Critical Comparison of Three Olfactometric Methods for the Identification of the Most Potent Odorants in Cooked Mussels (*Mytilus edulis*). *J. Agric. Food Chem.*, 48(4), 1307-1314.

Lee, G.H., Suriyaphan, O., Cadwallader, K.R. (2001). Aroma components of cooked tail meat of American lobster (*Homarus americanus*). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4324-4332.

Lee, J.H., Schlautman, M.A., Carraway, E.R., Yim, S., Herbert, B.E. (2004). Quantifying ground-state complexation between Ag⁺ and polycyclic aromatic hydrocarbons in dilute aqueous solution via fluorescence quenching. *J. Photochemistry Photobiology A : Chemistry*, 163, 165-170.

Lee, S.-J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K.-G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. *Food Chem.*, 91(1), 131-137.

Leis, J.R., Ríos, A., Rodríguez-Sánchez, L. (1998). Reactivity of phenolic nucleophiles towards nitroso compounds. Part 2. Reaction with alkyl nitrites (O-nitroso compounds). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2729-2733.

Li, S., Olegario, R.M., Banyasz, J.L., Shafer, K.H. (2003). Gas chromatography – mass spectrometry analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in a single puff of cigarette smoke. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 66, 155-163.

Lien, G.-W., Chen, C.-Y., Wu, C.-F. (2007). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization or electrospray ionization with tropylium post-column derivatization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21(22), 3694-3700.

Likens, S.T. & Nickerson, G.B. (1964). Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *A.S.B.C. Proceedings*, 5-13.

Livermore, A. & Laing, D.G. (1998). The influence of odor type on the discrimination and identification of odorants in multicomponent odor mixture. *Physiol. Behav.*, 65, 311-320.

López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J., Ferreira, V. (2004). Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Trempanillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. *Food Chem.*, 88, 95-103.

Lustre, A.O. & Issenberg, P. (1969). Volatile components of hardwood sawdust smoke: components of phenolic fraction. *J. Agr. Food Chem.*, 17(6), 1387-1393.

Lustre, A.O. & Issenberg, P. (1970). Phenolic components of smoked meat products. *J. Agr. Food Chem.*, 18(6), 1056-1060.

Luten, J.B., Ritskes, J.M., Weseman, J.M. (1979). Determination of phenol, guaiacol and 4-methylguaiacol in wood smoke and smoked fish-products by gas-liquid chromatography. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 168(4), 289-292.

Mackay, D., Shiu W.Y., Ma K.C. (1992). *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate of organic chemicals*, 2. Lewis Publishers. Chelsea, MI, USA.

Maga, J.A. (1987). The flavor chemistry of wood smoke. *Food Reviews Int.*, 3(1&2), 139-183.

- Maikhunthod, B., Morrison, P.D., Small, D.M., Marriott, P.J. (2010). Development of a switchable multidimensional/comprehensive two-dimensional gas chromatographic analytical system. *J. Chromatogr. A*, 1217(9), 1522-1529.
- Malcolm, H.M. & Dobson, S. (1994). The calculation of an environmental assessment level (EAL) for atmospheric PAHs using relative potencies. Department of the Environment, London, UK.
- Marcé, R.M. & Borrull, F. (2000). Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *J. Chromatogr. A*, 885, 273-290.
- Marriott, P. & Shellie, R. (2002). Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trends Anal. Chem.*, 21, 573-583.
- Martin, D. & Ruiz, J. (2007). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid matrixes by solid-phase microextraction coupled to a direct extraction device. *Talanta*, 71(2), 751-757.
- Martin, J.F., Poli, J.M., Petillot, F. (1995). Etude des composantes de la qualité de la chair de Silure Glane (*Silurus glanis L.*). Examens physicochimiques et rhéologiques. *La pisciculture française*, 121, 33-45.
- Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., Barceló, D. (2004). Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *J. Chromatogr. A*, 1047(2), 181-188.
- Marvin, C.H., Smith, R.W., Bryant, D.W., McCarry, B.E. (1999). Analysis of high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 863, 13-24.
- Matsumoto, T., Okitani, A., Nishimuro, T., Kato, H. (1983). Mode of degradation of myofibrillar proteins by rabbit muscle cathepsin D. *Biochim. Biophys. Acta*, 755(1), 76-80.
- McGrath, T., Sharma, R., Hajaligol, M. (2001). An experimental investigation into the formation of polycyclic-aromatic hydrocarbons (PAH) from pyrolysis of biomass materials. *Fuel*, 80, 1787-1797.
- McGrath, T.E., Chan, W.G., Hajaligol, H.R. (2003). Low temperature mechanism for the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of cellulose. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 66, 51-70.
- McGrath, T.E., Brown, A., Bezjak, Y., Haut, S., Chan, W.J. (2005). Low temperature benzo(a)pyrene yields from tobacco components. *Prepr. Pap. Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.*, 50, 158-160.
- McGrath, T.E., Wooten, J.B., Chan, W.G., Hajaligol, M.R. (2007). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco: The link between low temperature residual solid (char) and PAH formation. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1039-1050.

- Mehinagic, E., Prost, C., Demaimay, M. (2003). Representativeness of apple aroma extract obtained by vacuum hydrodistillation : comparison of two concentration techniques. *J. Food Sci.*, 68(8), 2411-2415.
- Meynier, A., Rampon, V., Dalgalarondo, M., Genot, C. (2004). Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution. *Int. Dairy J.*, 14(8), 681-690.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, 26(7), 1278-1284.
- Miller, J.A. & Melius, C.F. (1992). – Kinetic and thermodynamic issues in the formation of aromatic compounds in flames of aliphatic fuels. *Combust. Flame*, 91, 21-39.
- Moldoveanu, S.C. & Kiser, M. (2007). Gas chromatography/mass spectrometry versus liquid chromatography/fluorescence detection in the analysis of phenols in mainstream cigarette smoke. *J. Chromatogr. A*, 1141, 90-97.
- Moreda, W., Pérez-Camino, M.C., Cert, A. (2001). Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. *J. Chromatogr. A*, 936(1-2), 159-171.
- Moreira, A.B., Visentainer, J.V., de Souza, N.E., Matsushita, M. (2001). Fatty acids profile and cholesterol of three brazilian Brycon freshwater fishes. *J. Food Comp. Anal.*, 14, 565-574.
- Moret, S., Conte, L., Dean, D. (1999). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon content of smoked fish by means of a fast HPLC/HPLC method. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1367-1371.
- Moret, S., Conte, L.S. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *J. Chromatogr. A*, 882, 245-253.
- Mottier, P., Parisod, V., Turesky, R.J. (2000). Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 48(4), 1160-1166.
- Müller, W.D. (1991). Curing and smoking. *Fleischwirtsch*, 71(1), 61-65.
- Mustafa, F.A. & Medeiros, D.M. (1987). Proximate composition, mineral content, and fatty acids of catfish (*Ictalurus punctatus*, *rafisque*) for different seasons and cooking methods. *J. Food Sci.*, 50, 585-593.
- Navarro, P., Cortazar, E., Bartolomé, L., Deusto, M., Raposo, J.C., Zuloaga, O., Arana, G., Etxebarria, N. (2006). Comparison of solid phase extraction, saponification and gel permeation chromatography for the clean-up of microwave-assisted biological extracts in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. A*, 1128(1-2), 10-16.
- Niedziela, J.C., Macrae, M., Ogodon, I.D., Nesvadba, P. (1998). Control of *Listeria monocytogenes* in salmon; antimicrobial effect from salting, smoking and specific smoke compounds. *Lebensm. Wiss. u-Technol*, 31, 155-161.

- Nisbet, I.C.T., & LaGoy, P.K., (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 16, 290-300.
- Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Soulié, P., Fouquet, E. (2005). Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of *Quercus sp.* wood. Application to structural elucidation of macromolecules and aromatic profiles of different species. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 75(2), 181-193.
- Nordgarden, U., Hemre, G.I., Hansen, T. (2002). Growth and body composition of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr and smolt fed diets varying in protein and lipid contents. *Aquaculture*, 207, 65-78.
- Norinder, U., Lidén, P., Boström, H. (2006). Discrimination between modes of toxic action of phenols using rule based methods. *Mol. Diversity*, 10, 207-212.
- Nowakowski, D.J., Woodbridge, C.R., Jones, J.M. (2008). Phosphorus catalysis in the pyrolysis behaviour of biomass. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 80(2), 197-204.
- Obreque-Slier, E., Mateluna, C., Peña-Neira, A., López-Solís, R. (2010). Quantitative determination of interactions between tannic acid and a model protein using diffusion and precipitation assays on cellulose membranes. *J. Agric. Food Chem.*, 58(14), 8375-8379.
- O'Connell, J.E. & Fox, P.F. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *Int. Dairy J.*, 11(3), 103-120.
- Ohshima, H., Friesen, M., Malaveille, C., Brouet, I., Hautefeuille, A., Bartsch, H. (1989). Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyldiazonium ions as reactive products. *Fd. Chem. Toxic.*, 27(3), 193-203.
- Oka, Y., Omura, M., Kataoka, H., Touhara, K. (2004). Olfactory receptor antagonism between odorants. *EMBO J.*, 23, 120-126.
- Olsen, C.Z. (1977). Smoke flavourings and its bacteriological and antioxidative effects. *Acta Aliment. Pol.*, 3, 313-324.
- Orban, E., Di Lena, G., Ricelli, A., Paoletti, F., Casini, I., Gambelli, L., Caproni, R. (2000). Quality characteristics of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems. *Food Chem.*, 70, 27-32.
- Pagliuca, G., Gazzoti, T., Zironi, E., Serrazanetti, G.P., Mollica, D., Rosmini, R. (2003). Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5111-5115.
- Pandey, M.K., Mishra, K.K., Khanna, S.K., Das, M. (2004). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in commonly consumed edible oils and their likely intake in the Indian population. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81(12), 1131-1136.

Pena, T., Pensado, L., Casais, C., Mejuto, C., Phan-Tan-Luu, R., Cela, R. (2006). Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples. *J. Chromatogr. A*, 1121(2), 163-169.

Pérez-Juan, M., Flores, M., Toldrá, F. (2006). Model Studies on the Efficacy of Protein Homogenates from Raw Pork Muscle and Dry-Cured Ham in Binding Selected Flavor Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 54(13), 4802-4808.

Pérez-Juan, M., Flores, M., Toldrá, F. (2007). Effect of pork meat proteins on the binding of volatile compounds. *Food Chem.*, 108(4), 1226-1233.

Philips, D.H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.*, 443, 139-147.

Pía Gianelli, M., Flores, M., Toldrá, F. (2005). Interaction of Soluble Peptides and Proteins from Skeletal Muscle with Volatile Compounds in Model Systems As Affected by Curing Agents. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1670-1677.

Plaza-Bolaños, P., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *J. Chromatogr. A*, 1217(41), 6303-6326.

Polligné, I., Collignan, A., Trystram, G. (2001). Characterization of traditional processing of pork meat into boucané. *Meat Sci.*, 59, 377-389.

Potthast, K. (1978). Smoking methods and their effect on the content of 3,4-benzo(a)pyrene and others constituents of smoke in smoked meat products. *Die Fleischwirtschaft*, 58(3), 371-375.

Potthast, K. (1982). Dark smoking at a high smokehouse temperature. *Die Fleischwirtschaft*, 64(3), 328-331.

Pupin, A.M., Toledo, M.C.F. (1996). Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market. *Food Chem.*, 55(2), 185-188.

Purcaro, G., Morrison, P., Moret, S., Conte, L.S., Marriott, P.J. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils using solid-phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1161(1-2), 284-291.

Purcaro, G., Moret, S., Conte, L.S. (2009). Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Sci.*, 81(1), 275-280.

Rannou, C., Vanzeveren, E., Le-Bail, A., Prost, C. (2006). Représentativité odorante des extraits de pain. *Industries des céréales*, 146, 16-18.

Rawel, H.M., Rohn, S., Kruse, H.-P., Kroll, J. (2002). Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. *Food Chem.* 78(4), 443-455.

- Rawel, H.M., Frey, S.K., Meidtnr, K., Kroll, J., Schweigert, F.J. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50(8), 705-713.
- Rega, B. (2003). Texture-Flavour interactions : How physico-chemical data explain sensory perception in orange juice. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.
- Rey-Salgueiro, L., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J. (2008a). Effects of a chemical company fire on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant foods. *Food Chem.*, 108(1), 347-353.
- Rey-Salgueiro, L., García-Falcón, M.S., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J. (2008b). Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chem.*, 108(2), 607-615.
- Robb, D.B., Covey, T.R., Bruins, A.P. (2000). Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 72(15), 3653-3659.
- Rodgman, A., Smith, C.J., Perfetti, T.A. (2000). The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Human Exp. Toxicol.*, 19, 573-595.
- Rodgman, A. (2001). Studies of polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette mainstream smoke. Identification, tobacco precursors, control of levels: a review. *Beitr. Tabakforsch.*, 19(7), 361-379.
- Rojo Camargo, M.C., Toledo, M.C.F. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, 14, 49-53.
- Rose, D.P. & Connolly, J.M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol. Ther.*, 83, 217-244.
- Rusz, J. & Miler, K.B.M. (1977). Physical and chemical processes involved in the production and application of smoke. *Pure & Appl. Chem.*, 49, 1639-1654.
- Sadhra, S. & Wheatley, A.D. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from clinical waste incineration. *Chemosphere*, 66(11), 2177-2184.
- Sainclivier, M. (1985a). L'industrie alimentaire halieutique. Le poisson matière première. Bulletin scientifique et technique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique Centre de Recherches de Rennes, 8-57.
- Sainclivier, M. (1985b). L'industrie alimentaire halieutique. Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines : salage, séchage, fumage, marinage, hydrolysats. Bulletin scientifique et technique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique Centre de Recherches de Rennes, 219-285.
- Samanta, S.K., Singh, O.M., Jain, R.K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons : environmental pollution an bioremediation, *Trends Biotechnol.*, 20(6), 243-248.

Sanders, E.B., Goldsmith, A.I., Seeman, J.I. (2003). A model that distinguishes the pyrolysis of D-glucose, D-fructose, and sucrose from that of cellulose. Application to the understanding of cigarette smoke formation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 66, 29-50.

Sangster, J. (1989). Octanol-Water partition coefficients of simple organic compounds. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 18(3), 1111-1227.

Sarrazin, C., Le Quéré, J.L., Gretsch, C., Liardon, R. (2000). Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods. *Food Chem.*, 70, 99-106.

Sasamoto, K. & Ochiai, N. (2010). Selectable one-dimensional or two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry with simultaneous olfactometry or element-specific detection. *J. Chromatogr. A.*, 1217(17), 2903-2910.

Scheirs, J., Camino, G., Tumiatti, W. (2001). Overview of water evolution during the thermal degradation of cellulose. *Eur. Polym. J.*, 37(5), 933-942.

Schoenmakers, P., Marriott, P., Beens, J. (2003). Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography, LC-GC Europe, 16, 1-4.

Scientific Committee on Food. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final, (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf).

Sérot, T., Regost, C., Prost, C., Robin, J., Arzel, J. (2001a). Effect of dietary lipid sources on odour-active compounds in muscle of turbot (*Psetta maxima*). *J. Sci. Food Agric.*, 81, 1339-1346.

Sérot, T., Prost, C., Visan, L., Burcea, M. (2001b). Identification of the main odor-active compounds in musts from French and Romanian hybrids by three olfactometric methods. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1909-1914.

Sérot, T., Regost, C., Arzel, J. (2002). Identification of odour-active compounds in muscle of brown trout (*Salmo trutta*) as affected by dietary lipid sources. *J. sci. Food Agric.*, 82, 636-643.

Sérot, T. & Lafficher C. (2003). Optimisation of solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for determination of phenolic compounds in smoked herring. *Food Chem.*, 82(4), 513-519.

Sérot, T., Baron, R., Knockaert, C., Vallet, J.L. (2004). Effect of smoking processes on the contents of 10 major phenolic compounds in smoked fillets of herring (*Cuplea harengus*). *Food Chem.*, 85, 111-120.

Seuvre, A.-M., Philippe, E., Rochard, S., Voilley, A. (2006). Retention of aroma compounds in food matrices of similar rheological behaviour and different compositions. *Food Chem.*, 96(1), 104-114.

- Sheehan, E.M., O'Connor, T.P., Sheehy, P.J.A., Buckley, D.J., Fitzgerald, R. (1996). Effect of dietary fat intake on the quality of raw and smoked salmon. *Irish Journal of Agricultural and Food Res.*, 35, 37–41.
- Shen, D.K. & Gu, S. (2009). The mechanism for thermal decomposition of cellulose and its main products. *Bioresour. Technol.*, 100(24), 6496-6504.
- Sheridan, M.A. (1988). Lipid dynamic in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilisation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B, 679-690.
- Shimmo, M., Adler, H., Hyötyläinen, T., Hartonen, K., Kulmala, M., Riekkola, M.L. (2002). Analysis of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line coupled supercritical fluid extraction–liquid chromatography–gas chromatography–mass spectrometry. *Atmospheric Environment*, 36(18), 2985-2995.
- Sigurgisladottir, S., Sigurdardottir, M.S., Torrissen, O.J., Vallet, J.L., Hasteinsson, H. (2000). Effects of different salting and smoking processes on the microstructure and the texture of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Food Res. Int.*, 33, 847-855.
- Sikorski, Z.E. (1989). Smoking of fish and carcinogens. In : Fish smoking and drying (Burt, J.R., Eds). Elsevier Applied Science, London, UK, 73-83.
- Šimko, P., Šimon, P., Khunová, Bruncková, B., Drdák, M. (1994). Kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbon sorption from liquid smoke flavour into low density polyethylene packaging. *Food Chem.*, 50, 65-68.
- Šimko, P. (2002). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavourings additives. *J. Chromatogr. B.*, 770, 3-18.
- Simon, P., Lafontaine, M., Delsaut, P., Morele, Y., Nicot, T. (2000). Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 748, 337-348.
- Simon, R., De La Calle, B., Palme, S., Meier, D., Anklam, E. (2005). Composition and analysis of liquid smoke flavouring primary products. *J. Sep. Sci.*, 28, 871-882.
- Simon, R., Gomez Ruiz, J.A., Von Holst, C., Wenzl, T., Ankla, E. (2008). Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391(4), 1397-1408.
- Simoneit, B.R.T., Rogge, W.F., Lang, Q., Jaffé, R. (2000). Molecular characterization of smoke from campfire burning of pine wood (*Pinus elliottii*). *Chemosphere : Global Change Science*, 2, 107-122.
- Sirami, J. (1981). Mise en application de processus de fumage. *Viandes et produits carnés*, 2(6), 8-13.

Siskos, I., Zotos, A., Taylor, A.K.D. (2005). The effect of drying, pressure and processing time on the quality of liquid-smoked trout (*Salmo gairdnerii*) fillets. *J. Sci. Food Agric.*, 85(12), 2054-2060.

Smith, C.J., Perfetti, T.A., Rumble, M.A., Rodgman, A., Doolittle, D.J. (2000). IARC Group 2A Carcinogens reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem. Toxicol.*, 38(4), 371-383.

Soldera, S., Sebastianutto, N., Bortolomeazzi, R. (2008). Composition of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Commercial Aqueous Smoke Flavorings. *J. Agric. Food Chem.*, 56(8), 2727-2734.

Song, S.M., Marriott, J.P., Wynne, P. (2004). Comprehensive two-dimensional gas chromatography - Quadrupole mass spectrometric analysis of drugs. *J. Chromatogr. A*, 1058(1-2), 223-232.

Stephan, A., Bücking, M., Steinhart, H. (2000). Novel analytical tools for food flavours- a review. *Food Res. Int.*, 33, 199-209.

Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., Srijaranai, S. (2010). High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT Food Sci. Technol.*, 43(9), 1325-1330.

Stansby, M.E. (1962). Proximate composition of fish. In: *Fish in nutrition*, Fishing news books (Heen et Kreuzer, Eds.). London, UK, 55-60.

Sternitzke, A., Legrum, W., Netter, K.J. (1992). Effects of phenolic smoke condensates and their components on hepatic drug metabolizing systems. *Food Chem. Toxicol.*, 30(9), 771-781.

Stumpe-Vīksna, I., Bartkevičs, V., Kukāre, A., Morozovs, A. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chem.*, 110, 794-797.

Suñen, E. (1998) Minimum inhibitory concentration of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 45-48.

Swan, J.S., Burtles, S.M. (1978). The development of flavour in potable spirits. *Chem. Soc. Rev.*, 7(2), 201-211.

Tamakawa, K. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In : *Pesticide, veterinary and other residues in food* (Watson, D., Eds). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*, 104, 1372-1378.

Temine-Roussel, B., Monod, A., Massiani, C., Wortham, H. (2004). Evaluation of an annular denuder tubes for atmospheric PAH partitioning studies-1 : evaluation of the trapping efficiency of gaseous PAHs. *Atmos. Environ.*, 38, 1913-1924.

- Tinkougdou Kabré, A., Diarra, D., Traoré, A. (2003). Le fumage du poisson au Burkina Faso : comparaison des caractéristiques et de la rentabilité de trois types de fumoirs améliorés. Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures, 12(6), 409-417.
- Tóth, L. & Potthast, K. (1984). Chemical Aspects of the Smoking of Meat and Meat Products. Advances in Food Research, 29, 87-158.
- Union Européenne. (2003). Commission Regulation (EC) No 2065/2003, Off. J. Eur. Union, L309/1.
- Union Européenne. (2005a). Recommandation de la commission du 4 février 2005 sur l'exécution de mesures supplémentaires des teneurs en hydrocarbures aromatiques polycycliques dans certaines denrées alimentaires. (2005/108/CE), Off. J. Eur. Union, L34/43.
- Union Européenne. (2005b). Commission Regulation (EC) No 208/2005, Off. J. Eur. Union, L34/3.
- Union Européenne. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006, Off. J. Eur. Union, L364/5.
- Van de Velden, M., Baeyens, J., Brems, A., Janssens, B., Dewil, R. (2010). Fundamentals, kinetics and endothermicity of the biomass pyrolysis reaction. Renewable Energy, 35(1), 232-242.
- Van de Wiele, T.R., Peru, K.M., Verstraete, W., Siciliano, S.D., Headley, J.V. (2004). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons, formed in a simulator of the human gastrointestinal tract. J. Chromatogr. B, 806(2), 245-253.
- Van Stijn, F., Kerkhoff, M.A.T., Vandeginste, B.G.M. (1996). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and fats by on-line donor-acceptor complex chromatography and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. A, 750, 263-273.
- Varlet, V., Prost, C., Sérot, T. (2004). New procedure for the study of odour representativeness of aromatic extracts from smoked salmon. Food Chem., 100, 820-829.
- Varlet, V., Sérot, T., Knockaert, C., Cornet, J., Cardinal, M., Monteau, F., Le Bizec, B., Prost, C. (2007a). Organoleptic characterization and PAH content of salmon (*Salmo salar*) fillets smoked according to four industrial smoking techniques. J. Sci. Food Agric., 87(5), 847-854.
- Varlet, V. (2007b). Caractérisation des composés volatils responsables des qualités odorantes du saumon fumé (*Salmo salar*) et évaluation des contaminants du fumage (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques). Thèse de doctorat, Université de Nantes, Faculté des sciences et des techniques.
- Varlet, V., Sérot, T., Prost, C. (2010). Smoke flavouring technology in seafood. In: Handbook of seafood and seafood products analysis (Nollet, L.M.L. & Toldrá, F., Eds). CRC Press, New York, USA. 223-251.

Veyrand, B., Brosseaud, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., Le Bizec, B. (2007). Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *J. Chromatogr. A*, 1149(2), 333-344.

Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2005). Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1090(1-2), 146-154.

Villière, A. (2005). Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des protéines. Thèse de doctorat, Université de Nantes, Faculté des sciences et des techniques.

Vitt, S.M., Himelbloom, B.H., Crapo, C.A. (2001). Inhibition of *Listeria inocula* and *Listeria monocytogenes* in a laboratory medium and cold-smoked salmon containing liquid smoke. *J. Food Safety*, 2, 111-125.

Wang, G., Lee, A.S., Lewis, M., Kamath, B., Archer, R.K. (1999). Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. *J. Agric. Food Chem.*, 47(3), 1062-1066.

Wendroff, W.L. & Wee, C. (1997). Effect of smoke and spice oils on growth of moulds on oil-coated cheeses. *J. Food Protect.*, 60, 153-156.

Wenzl, T., Simon, R., Kleiner, J., Anklam, E. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(7), 716-725.

Wu, J., Wong, M.K., Lee, H.K., Shi, C.Y., Ong, C.N. (1997). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Rougan, a traditional chinese barbecued food, by capillary gas chromatography. *Environmental Monitoring and Assessment*, 44, 577-585.

Xerfi. (2010). Produits de la mer (industrie et négoce). Base Xerfi 700, ref. 0IAA08.

Yamagiwa, K., Ichikawa, K. (1915). Über die künstliche erzeugung von papillom. *Verh. Jap. Pathol. Ges.*, 5, 606-616.

Yeung, S.Y., Lan, W.H., Huang, C.S., Lin, C.P., Chan, C.P., Chang, M.C., Jeng, J.H. (2002). Scavenging property of three cresol isomers against H₂O₂, hypochlorite, superoxide and hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.*, 40(10), 1403-1413.

Yuksel, Z., Avci, E., Erdem, Y.K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chem.*, 121(2), 450-456.

Zabik, M.E., Booren, A., Zabik, M.J., Welch, R., Humphrey, H. (1996). Pesticide residues, PCBs and PAHs in baked charbroiled, salt boiled and smoked Great Lakes lake trout. *Food Chem.*, 55(3), 231-239.

Zeng, Z.D., Chin, S.-T., Hugel, H.M., Marriott, P.J. (2011). Simultaneous deconvolution and re-construction of primary and secondary overlapping peak clusters in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1812(13), 2301-2310.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des structures du muscle de poisson	10
Figure 2 : Schéma de principe d'un générateur à exposition directe (armoire monobloc)	22
Figure 3 : Schéma de principe d'un générateur à autocombustion	23
Figure 4 : Schéma de principe d'un générateur à plaque thermostatée.....	24
Figure 5 : Générateur de fumée à friction	25
Figure 6 : Diagramme de fabrication d'arômes de fumée.....	26
Figure 7 : Schéma de principe d'une installation de vaporisation de fumée liquide	28
Figure 8 : Schéma de principe d'un tunnel de fumage électrostatique	30
Figure 9 : Structure chimique des principaux constituants du bois.....	31
Figure 10 : Mécanismes de pyrolyse de la cellulose selon différents paramètres de température, vitesse de chauffe et présence d'ions	34
Figure 11 : Mécanismes de déshydratation intramoléculaire de la cellulose.....	35
Figure 12 : Mécanismes hypothétiques principaux de la décomposition du lévoglucosane....	35
Figure 13 : Mécanismes de décomposition thermique de la lignine	37
Figure 14 : Génération de guaïacol et syringol par décomposition de lignine.....	37
Figure 15 : Groupes et structures chimiques des principaux composés identifiés dans la fumée de bois	39
Figure 16 : Principaux hétérocycles azotés présents dans la fumée de bois	40
Figure 17 : Teneur en composés phénoliques de fumées générées à différentes températures	42
Figure 18 : Évolutions possibles de la fumée au cours du processus de fumage	45
Figure 19 : Classification des composés phénoliques et composés dérivés en fonction de leur nombre de cycles et de leur structure	47
Figure 20 : Mécanisme général des réactions d'oxydation des lipides	50
Figure 21 : Mécanisme d'action des phénols (AH) dans l'oxydation lipidique.....	51
Figure 22 : Mécanisme de formation des phénoplastes par réaction entre aldéhydes et phénols	53
Figure 23 : Fractionnement des composés volatiles de condensats de fumée	59
Figure 24 : Appareil de Likens-Nickerson et schéma de principe associé.....	61
Figure 25 : Déroulement simplifié d'une extraction d'espace de tête dynamique.....	63
Figure 26 : Schéma de principe des appareillages de GC/GC et GCxGC	66
Figure 27 : Fonctionnement séquentiel d'un modulateur de GCxGC.....	67
Figure 28 : Fonctionnement d'un modulateur thermique à double jets	67
Figure 29 : Principe des séparation chromatographiques bidimensionnelles et bidimensionnelle totale	68
Figure 30 : Limitations des spectromètres de masse à basse fréquence en couplage avec de la GCxGC.....	70
Figure 31 : Origines de la contamination de l'alimentation humaine par les HAP	72

Figure 32 : Mécanisme de formation diolépoxydes toxiques et de métabolites excrétés par l'organisme à partir du benzo[a]pyrène	73
Figure 33 : Structures des 11 HAP cités par la saisine AFSSA n°2000-SA-0005.....	75
Figure 34 : Bioamplification des HAP dans la pyramide trophique marine	77
Figure 35 : Principaux schémas réactionnels de production de HAPs à partir du noyau benzène.....	79
Figure 36 : Principales techniques utilisées pour l'analyse des HAP	85
Figure 37 : Schéma de principe de l'appareil de Soxhlet.....	86
Figure 38 : Schéma de principe d'une MASE.....	88
Figure 39 : Schéma de principe d'une purification par SPE à rinçage spécifique	89
Figure 40 : Séparation chromatographique de co-élutions critiques de HAP avec des colonnes capillaires de différentes polarités.....	92
Figure 41 : Organisation des différents travaux réalisés	99
Figure 42 : Schéma de principe du pilote expérimental.....	106
Figure 43 : Schéma de principe du générateur de fumée à friction.....	107
Figure 44 : Cycle de fonctionnement du générateur de fumée	108
Figure 45 : Schéma de principe du piège électrostatique.....	109
Figure 46 : Schéma de principe du piège frigorifique.....	109
Figure 47 : Cellule de fumage pilote utilisée pour les expériences.....	110
Figure 48 : Diagramme de l'air humide	112
Figure 49 : Matrices prêtes à être utilisées pour les expérimentations.....	117
Figure 50 : Schéma de principe du déroulement des deux phases de l'expérience	123
Figure 51 : Dépôt de la solution d'enrichissement dans le vial expérimental.....	125
Figure 52 : Etablissement d'un ménisque lors de augmentation du volume de liquide.....	127
Figure 53 : Schéma de principe de l'appareil de Likens-Nickerson utilisé	131
Figure 54 : Schéma de principe de l'appareil de Kuderna-Danish utilisé.....	131
Figure 55 : Réaction de dérivatisation du BSTFA	132
Figure 56 : Calcul du nombre de Reynolds.....	150
Figure 57 : Profil de vitesse et débit volumique d'air selon son régime d'écoulement	150
Figure 58 : Débit de tirage dans le pilote expérimental en fonction de la puissance de la turbine et la présence du piège frigorifique.....	151
Figure 59 : Température mesurée au cœur de la bûche lors de la production de fumée à partir de bois de chêne, avec une durée d'appui de 5s.....	152
Figure 60 : Température mesurée au cœur de la bûche lors de la production de fumée à partir de bois de chêne, avec une durée d'appui de 20s.....	154
Figure 61 : Comparaison des chromatogrammes d'extraits aromatiques de fumées liquides obtenues par rinçage des pièges à fumée avec différentes solutions.....	156

Figure 62 : Comparaison des chromatogrammes d'extraits aromatiques de fumées piégées à l'aide de l'un ou l'autre des deux pièges du pilote.....	157
Figure 63 : Comparaison des quantités de HAP dosées dans des fumées liquides issues des deux pièges du pilote expérimental.....	157
Figure 64 : Relevés de températures aux différents points du pilote expérimental pendant la génération et le piégeage de la fumée expérimentale P12 (temps d'appui : 45 secondes).....	159
Figure 65 : Projection des barycentres de classes d'expériences dans le plan F1-F2 (données variables opérationnelles).....	164
Figure 66 : Comparaison des chromatogrammes GC-FID d'un même point de la gamme de calibration des composés phénoliques « natif » et « dérivatisés »	166
Figure 67 : Co élutions rencontrées dans les gammes étalons de composés phénoliques avant et après dérivatisation.....	167
Figure 68 : Droites de calibration de l'éthylguaiacol.....	168
Figure 69 : « Contour plot » d'un point de la gamme de calibration des composés phénoliques « natif » en GCxGC-TOFMS	170
Figure 70 : Spectres de masse des analytes sujets à des co-élutions (énergie d'ionisation 70 eV).....	171
Figure 71 : Droites de calibration du Benzo[a]pyrène	173
Figure 72 : Comparaison d'effets de paramètres déterminés par GC et GCxGC, représentation sous forme de graphiques des moyennes	180
Figure 73 : Comparaison d'effets de paramètres déterminés pour plusieurs analytes par GC et GCxGC, représentation sous forme de graphiques des moyennes.....	181
Figure 74 : Graphiques des moyennes représentant les deux principales interactions de facteurs significativement influentes sur les teneurs en composés phénoliques.....	188
Figure 75 : Projection des barycentres de classes de fumées dans le plan F1-F2 (données de teneurs en composés phénoliques)	191
Figure 76 : Projection des 24 fumées sur la composante F1 (données de teneurs en composés phénoliques)	192
Figure 77 : Graphiques des moyennes représentant l'interaction de facteurs « humidité du bois x essence de bois » pour le chrysène.....	197
Figure 78 : Graphiques des moyennes représentant les deux principales interactions de facteurs significativement influentes sur les teneurs en HAP	198
Figure 79 : Projection des barycentres de classes dans le plan factoriel F1-F2 (données de teneurs en HAP)	201
Figure 80 : Projection des barycentres de classes et des variables expérimentales dans le plan factoriel F1-F2 (données de teneurs en composés phénoliques et HAP).....	204
Figure 81 : Projection des 24 fumées expérimentales dans le plan factoriel F1-F2 (données de teneurs en composés phénoliques et HAP)	205
Figure 82 : Estimation directe et indirecte des phénomènes de sorption.....	227
Figure 83 : Comparaison des chromatogrammes obtenus par échantillonnage direct d'espaces de tête enrichis avant et après exposition d'un échantillon.....	228

Figure 84 : Enrichissement de l'espace de tête du volume expérimental par prélèvement d'espaces de têtes saturés	229
Figure 85 : Enrichissement de l'espace de tête du volume expérimental par évaporation d'une solution de mélange.....	230
Figure 86 : Dispositifs disponibles pour exposer les échantillons à l'espace de tête enrichi.	231
Figure 87 : Comparaison des chromatogrammes obtenus par SPME d'espaces de tête enrichis avec et sans exposition d'échantillon de 24 cm ²	232
Figure 88 : Comparaison des gammes d'enrichissement avec des solutions de concentration et volume variables	234
Figure 89 : Réponse chromatographique obtenue par HS-SPME/GC-FID en fonction du matériau de dépôt de la solution de composés phénoliques.....	235
Figure 90 : Effet du temps d'extraction sur la réponse chromatographique d'espaces de tête enrichis avec différentes masses de quatre composés phénoliques.....	236
Figure 91 : Identification du domaine de réponse linéaire.....	237
Figure 92 : Relations entre les propriétés physico-chimiques des composés phénoliques et leur piégeage par les matrices de composition variable	241
Figure 93 : Cercles des corrélations des ACP réalisées sur les données de piégeage et de relargage des composés phénoliques par les matrices modèles	249
Figure 94 : Piégeage de trois composés phénoliques par des mélanges Huile d'arachide/C16 (mesures expérimentales et écarts-types sur les points répétés)	251
Figure 95 : Chromatogramme obtenu par HS-SPME / GC-FID sur un espace de tête enrichi contenant 100 µL de C16	251
Figure 96 : Piégeage de trois composés phénoliques gazeux par des quantités croissantes d'huile de saumon (valeurs expérimentales)	252
Figure 97 : Piégeage de trois composés phénoliques gazeux par des quantités croissantes d'eau (valeurs expérimentales).....	254
Figure 98 : Influence des valeurs des paramètres du modèle de régression	256
Figure 99 : Relation linéaire entre la pente et la constante des modèles de régression	258
Figure 100 : Comparaison de deux composés phénoliques ayant des comportements différents vis-à-vis d'échantillons d'eau (données expérimentales et calculées).....	259
Figure 101 : Affinité des composés phénoliques pour des substrats liquides exprimée par la constante du modèle de régression logarithmique	260
Figure 102 : Relations entre les propriétés physico-chimiques des composés phénoliques et leur piégeage par la phase aqueuse et lipidique	261
Figure 103 : Surface de réponse estimée - piégeage du 4-méthylguaiacol gazeux par des mélanges eau/protéines sarcoplasmiques	262
Figure 104 : Graphique de l'interaction protéines*eau pour le 4-méthylguaiacol	265
Figure 105 : Relation entre la pression de vapeur saturante des analytes et leur piégeage moyen par adsorption	266
Figure 106 : Piégeage du 4-méthylguaiacol par des quantités croissantes de protéines sarcoplasmiques en présence de 50 µL d'eau	267

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition biochimique de la chair de quelques espèces de poissons, moyenne générale est variations observables, exprimée en g pour 100 g de chair	12
Tableau 2 : Pourcentages moyens des principaux acides gras présents dans la chair de poissons	18
Tableau 3 : Composition moyenne des différents types de bois	30
Tableau 4 : Principaux paramètres opérationnels des différents types de pyrolyse.....	33
Tableau 5 : Pourcentage des principaux composés phénolique de fumées issues de divers bois	41
Tableau 6 : Influence de l'humidité de sciure de bois sur la composition et la qualité organoleptique des condensats de fumée obtenus par pyrolyse.....	44
Tableau 7 : Caractéristiques odorantes de composés phénoliques.....	54
Tableau 8 : Rôle aromatique de différentes fractions de fumée.....	55
Tableau 9 : Liste des TEF associés aux 11 HAP cités par la saisine AFSSA n°2000-SA-0005	76
Tableau 10 : Groupes de HAP évalués par l'EFSA comme indicateurs de contamination	83
Tableau 11 : Réglementation européenne en vigueur concernant la contamination en HAP des produits alimentaires, seul le benzo[a]pyrène est concerné	83
Tableau 12 : Extrait de la réglementation européenne à venir concernant la contamination en HAP des produits alimentaires	84
Tableau 13 : Teneur en eau des 4 bûches utilisées pour la génération de fumée.....	103
Tableau 14 : Composition des huiles utilisées	104
Tableau 15 : Plan d'expérience de génération des fumées expérimentales	114
Tableau 16 : Plan d'expérience D-optimal de formulation et d'exposition des matrices à la fumée.....	118
Tableau 17 : Plan de fabrication des matrices utilisées pour l'étude des phénomènes de sorption.....	119
Tableau 18 : Nombre de mesures expérimentales réalisées pour les volumes testés.....	126
Tableau 19 : Nombre de mesures expérimentales réalisées pour les ratios Huile/C16 testés	127
Tableau 20 : Plan d'expériences utilisé pour les mélanges eau-protéines sarcoplasmiques..	128
Tableau 21 : Gamme de calibration utilisées en espace de tête	129
Tableau 22 : Paramètres de l'extraction-distillation simultanée des échantillons	130
Tableau 23 : Paramètres de séparation chromatographique des extraits aromatiques	134
Tableau 24 : Gamme de calibration utilisée pour la quantification des composés phénoliques dans les extraits liquides.....	136
Tableau 25 : Liste des étalons internes marqués et des analytes associés.....	138
Tableau 26 : Paramètres de séparation chromatographique des extraits de HAP.....	142

Tableau 27: Transitions diagnostique et énergies de collision associées aux différents analytes HAP.....	143
Tableau 28 : Critère de tolérance pour le contrôle des ratios d'ions.....	143
Tableau 29 : Gamme de calibration utilisée pour la quantification des HAP.....	144
Tableau 30 : TEF utilisés pour le calcul des TEQ.....	145
Tableau 31 : Résultats d'analyse de la variance et test de comparaison multiple LSD réalisés sur les paramètres de contrôle du pilote mesurées au cours de la génération des fumées expérimentales.....	161
Tableau 32 : Caractéristiques des trois premières composantes principales de l'analyse réalisée sur les variables expérimentales.....	163
Tableau 33 : Largeurs de pics à mi-hauteur des standards natifs et dérivatisés.....	166
Tableau 34 : Paramètres des gammes de calibration de composés phénoliques natifs et dérivatisés.....	169
Tableau 35 : Paramètres de la gamme calibration de composés phénoliques en GCxGC-TOFMS.....	171
Tableau 36 : Paramètres des gammes de calibration des HAP.....	172
Tableau 37 : Teneur des 24 fumées expérimentales en composés phénoliques dosés par GC-FID.....	174
Tableau 38 : Teneur des 24 fumées expérimentales en composés phénoliques dosés par GCxGC-TOFMS.....	175
Tableau 39 : Teneur des 24 fumées expérimentales en HAP dosés par GC-MS/MS.....	176
Tableau 40 : Ecart relatif moyens entre les résultats de quantifications obtenues en GC et GCxGC.....	177
Tableau 41 : Résumé de l'étude de l'effet du temps d'appui dans le générateur de fumée sur les teneurs en composés phénoliques des fumées.....	184
Tableau 42 : Résumé de l'étude de l'effet de l'essence de bois utilisée sur les teneurs en composés phénoliques des fumées.....	184
Tableau 43 : Résumé de l'étude de l'effet de l'humidité du bois sur les teneurs en composés phénoliques des fumées.....	184
Tableau 44 : Résumé de l'étude de l'effet de l'apport d'air comprimé au niveau de la zone de pyrolyse sur les teneurs en composés phénoliques des fumées.....	185
Tableau 45 : Evolution des ratios G/P et G/S selon les variations de paramètres de génération.....	187
Tableau 46 : Caractéristiques des deux premières composantes principales de l'analyse réalisée sur les variables expérimentales.....	190
Tableau 47 : Résumé de l'étude de l'effet du temps d'appui sur les teneurs en HAP des fumées.....	193
Tableau 48 : Résumé de l'étude de l'effet de l'essence de bois sur les teneurs en HAP des fumées.....	194
Tableau 49 : Résumé de l'étude de l'effet de l'humidité du bois sur les teneurs en HAP des fumées.....	194

Tableau 50 : Résumé de l'étude de l'effet de l'apport d'air comprimé au niveau de la zone de pyrolyse sur les teneurs en HAP des fumées.....	194
Tableau 51 : Caractéristiques des trois premières composantes principales de l'analyse réalisée sur les variables expérimentales.....	200
Tableau 52 : Caractéristiques des trois premières composantes principales de l'analyse réalisée sur les teneurs en composés phénoliques et HAP dans les fumées.....	202
Tableau 53 : Composition de la fumée utilisée en composés phénoliques	211
Tableau 54 : Teneurs en composés phénoliques des différentes matrices modèles fumées ..	212
Tableau 55 : Résultats d'analyse de la variance et test de comparaison multiple LSD réalisés sur les teneurs en composés phénoliques dans les matrices fumées	213
Tableau 56 : Taux d'enrichissement linéaire en analytes selon le temps de fumage et données physico-chimiques des composés phénoliques	214
Tableau 57 : Contamination initiale en HAP des constituants des matrices modèle	218
Tableau 58 : Quantités de HAP déposés dans les matrices au cours du fumage	219
Tableau 59 : Composition en HAP de la fumée utilisée	220
Tableau 60 : Résultats d'analyse de la variance et test de comparaison multiple LSD réalisés sur les teneurs en composés phénoliques dans les matrices fumées	221
Tableau 61 : Résultats d'analyse de la variance et de test de comparaison multiple LSD réalisés sur les quantités de composés phénoliques adsorbés par les matrices	240
Tableau 62 : Résultats d'analyse de la variance et test de comparaison multiple LSD réalisés sur les quantités de composés phénoliques relargués par les matrices	246
Tableau 63 : Modèles mathématiques de régression testés.....	255
Tableau 64 : Paramètres de régression logarithmique ($Y = a + b \cdot \ln X$) des données de piégeage de composés phénoliques par des échantillons liquides	257
Tableau 65 : Résultats d'analyse statistique des données du plan d'expérience de mélange eau/protéines sarcoplasmiques	263

Annexes

Annexe 1

DOSAGE DE LA MATIERE MINERALE

Sécurité :

Porter une blouse et des gants

Objectif :

Déterminer la teneur en matière minérale de poisson ou produit à base de poisson après incinération à 550°C.

Matériel :

- Broyeur type TURMIX
- Dessiccateur garni d'un déshydratant efficace
- Balance analytique de précision
- Etuve universelle réglée à 103°C±2°C
- Creusets à incinération en porcelaine
- Aluminium
- Spatules
- Four à moufle à 550°C

Mode opératoire :

Effectuer cette analyse sur trois prélèvements par échantillon

- Sécher les creusets 30 minutes dans l'étuve réglée à 105°C±2°C
- Après refroidissement à température ambiante dans le dessiccateur, peser soigneusement le creuset à vide avec la feuille d'aluminium qui servira de couvercle durant l'incinération. (soit M_0 cette masse)
- Homogénéisation de l'échantillon
- Mettre l'équivalent de 10 g de matière fraîche, pesés avec précision, dans le creuset Recouvrir le creuset d'une feuille d'aluminium. Peser. (soit M_1 cette masse). Mettre le tout dans le four à 550°C durant 5 heures minimum. Les cendres doivent être blanches ou gris claires, apparemment dépourvues de particules charbonneuses. **ATTENTION, le marqueur est carbonisé dans de telles conditions, veiller à identifier d'une autre manière les échantillons et de bien repérer leur place dans le four.**
- Attendre le refroidissement complet du four avant d'ouvrir la porte et sortir les échantillons
- Placer le creuset dans un dessiccateur en attendant leur retour à température ambiante. Peser avec précision (soit M_2 cette masse)

Expression des résultats

La teneur en matière minérale pour cent en masse de l'échantillon est égale à :

$$\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} * 100$$

M_0 : Masse en gramme du creuset + feuille d'aluminium

M_1 : Masse en gramme du creuset + feuille d'aluminium + échantillon

M_2 : Masse en gramme du creuset + feuille aluminium + échantillon après incinération

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des trois déterminations si mes conditions de répétabilité sont remplies.

Exprimer le résultat à 0.1% près

Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations, effectuées simultanément l'une après l'autre par le même analyste ne doit pas être supérieure à 0.1 g pour 100g d'échantillon.

Annexe 2

EXTRACTION DES LIPIDES PAR LA METHODE DE FOLCH.

Sécurité :

INRS :	FT 5	FT 82
--------	------	-------

Porter une blouse et des gants.
Manipuler sous la hotte.

Objectif :

Extraction des lipides par un mélange de solvants.

Matériel :

- Verrerie.
- Ampoules à décantier/ centrifugeuse.
- Filtres en verre fritté.
- Pompe à vide.
- Broyeur.
- Rotavapor.

Solutions et réactifs :

- Chloroforme (qualité technique).
- Méthanol (qualité technique).
- Eau distillée.
- Chlorure de sodium.

Pour diminuer le risque d'oxydation des lipides, du BHT (butylated hydroxy toluène, SIGMA ref B 1378) peut être ajouté au chloroforme et au méthanol en concentration 25 mg/L.

Mode opératoire :

- Homogénéiser les tissus avec 6.66 volumes de méthanol pendant 30 minutes.
- Ajouter 13.33 volumes de chloroforme
- Broyer les tissus jusqu'à obtenir un mélange homogène.
- Agiter pendant 30 minutes.
- Filtrer sous vide sur verre fritté.
- Introduire le filtrat dans une ampoule à décantier.
- Ajouter 0.2 volumes d'eau salée (NaCl 0.9%) par rapport au volume total de chloroforme/méthanol utilisé.
- Agiter l'ampoule jusqu'à émulsion complète du mélange.
- Laisser décantier au moins trois heures à l'abri de la lumière. (pour les décantation durant une nuit, placer les ampoules en chambre froide).
- Récupérer la phase organique (inférieure) et la phase aqueuse (supérieure).
- Evaporer ces deux phases au rotavapor (au moins jusqu'à évaporation du solvant).
- Conservation de la phase inférieure : cf. **St 2**.
- Utilisation de la phase supérieure : cf. **Ex 3**.

Durée de la manipulation : 24h00 dont une nuit pour la décantation

Références bibliographiques :

Folch *et al.* (1957):J. Biol. Chem. 226, 497-509.

Annexe 3

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL PAR LA METHODE DE KJELDHAL

Sécurité :

INRS :	FT 13	FT 20	FT 30	FT 138	FT 150
--------	-------	-------	-------	--------	--------

Porter une blouse et des gants
Travailler sous hotte

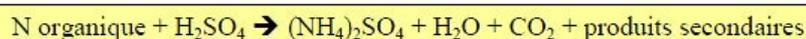
Théorie.

La méthode de Kjeldahl a été développée en 1882 par Johan Kjeldahl, un chimiste danois. Elle a pour but de déterminer la quantité d'azote présente dans les substances organiques et inorganiques. Dans l'agroalimentaire, on utilise cette méthode entre autre pour déterminer la quantité de protéines contenue dans un échantillon, en dosant l'azote.

On y distingue 3 différentes phases.

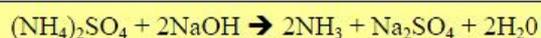
1. Phase de digestion.

La digestion consiste à faire bouillir un échantillon homogène dans de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré, ce qui produit une solution de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄.



2. Phase de distillation.

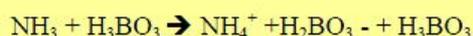
Le principe est d'ajouter de la base en excès pour convertir l'ion NH₄⁺ (ammonium) en NH₃ (gaz ammoniac). Etant volatile, le NH₃ est récupéré après distillation dans un milieu acide (H₃BO₃ ou H₂SO₄) pour reprendre la forme d'ion NH₄⁺.



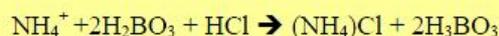
3. Phase de Titration.

Par titration on peut quantifier l'ammoniac dans la solution réceptrice. Ainsi, on peut calculer la quantité d'azote initialement contenue dans l'échantillon. On utilise de l'acide borique (2%) dans la solution réceptrice. L'ammoniac est capturé par l'acide borique, formant un complexe d'ammonium borate. Ensuite, l'azote est titré directement avec de l'acide chlorhydrique. Il y a changement de couleur.

Ammoniac + acide borique → Complexe d'ammonium borate + acide borique en excès
(changement de couleur).



Complexe d'ammonium borate + acide Chlorhydrique → Chlorate d'ammonium + acide borique.



Objectif :

L'azote total est dosé par minéralisation à l'acide sulfurique selon la méthode de Kjeldhal, l'ammoniac obtenu est déplacé par une solution concentrée d'hydroxyde de sodium, recueillie dans une solution d'acide borique et titrée à l'acide chlorhydrique.

Matériel :

- Broyeur de type Turmix
- Balance analytique
- Tube à minéralisation (**NE PAS UTILISER LES TUBES EBRECHES**)
- Erlenmeyer de 250 mL
- Bloc de minéralisation
- Unité de distillation
- Burette de 10 ml graduée au 1/20^{ème} de ml
- Gants de protection anti-chaleur

Solutions et réactifs :

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique

- Acide sulfurique concentré
- Hydroxyde de sodium concentré (10 N, lessive de soude, qualité analytique)
- Solution d'acide borique avec indicateur coloré)

Préparation de l'acide borique : : (Pour 1 litre)

Dissoudre 10 g d'acide borique dans 200 ml d'alcool éthylique à 96% et 700 ml d'eau.

- Ajouter 10 ml d'indicateur coloré préparé comme suit :
 - ❖ Dissoudre 33 mg de vert de bromocrésol et 66 mg de rouge de méthyl dans 100 ml d'alcool éthylique à 96%
 - ❖ Ajuster à pH 5.0 à l'aide d'HCl 1N.
 - ❖ Compléter à 1 litre.

- Acide chlorhydrique (normalité en fonction du produit étudié)
- Catalyseur de minéralisation : Pastilles Wieninger
 - Composition :
 - 4.75 g de sulfate de potassium
 - 0.075 g de sulfate de cuivre
 - 0.1g de sélénium
- Eau milliQ

Mode opératoire :

Faire deux déterminations par échantillon

Minéralisation

- Homogénéiser l'échantillon.
- Peser précisément la matière à minéraliser (environ 1g de produit sec ou 4 g de matière fraîche) et l'introduire dans des tubes de minéralisation (Soit M cette masse)
- **Sous hotte**, ajouter dans le tube à minéraliser une pastille de catalyseur et 20 mL d'acide sulfurique concentré **avec précaution**.
- Placer les tubes dans le bloc de minéralisation.
- Placer les capteurs de fumée sur les tubes, allumer l'eau et faire chauffer **progressivement** jusqu'à 450°C (th 8).
- Laisser jusqu'à l'obtention d'une solution verte ou bleu pâle (Si la pesée est effectuée sur une feuille d'aluminium, le liquide reste blanchâtre).Le temps nécessaire varie de 2 à 4 heures. Laisser refroidir. Rincer le capteur de fumée avec de l'eau milliQ que l'on recueille dans le tube.
- Ajouter **avec précaution** 20 mL d'eau milliQ

Distillation

- Allumer l'unité de distillation et l'eau du système de refroidissement.
- Avant le début de toute analyse, vérifier les niveaux d'eau dans le générateur vapeur et de soude..
- Mettre dans un erlenmeyer de 250 mL 20 mL de solution d'acide borique.
- Placer cet erlen dans l'unité de distillation en prenant bien soin à ce que la tige plonge dans la solution.
- Mettre le tube de minéralisation de l'autre côté de l'unité.
- Neutraliser avec la soude (80 ml) .
- Mettre en route la vapeur.
- Arrêter lorsque le distillat atteint 150-200 mL (environ 6 min par échantillon)

Titration

- Titrer le distillat avec de l'acide chlorhydrique de normalité voulue (soit n cette normalité) jusqu'à virage au rose.. (Soit V ce volume)

Expression des résultats :

La teneur en azote total est donné par la formule : $(1.4 * n * V) / M = \%N$

n : normalité de l'acide chlorhydrique

V : volume en ml d'acide chlorhydrique utilisé

M : masse en gramme de la prise d'essai.

Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ne doit pas être supérieur à 0.05g d'azote total pour 100g d'échantillon

NB. La teneur en protéines en g pour 100g est abusivement donné par la formule :

$$\text{Teneur en protéines} = N * 6.25$$

DANGER : cette formule est approximative et fautive dans l'absolu :

Le coefficient 6.25 est approximatif : toutes les protéines de poisson ne contiennent pas exactement 16% d'azote

N déterminée est la teneur en azote totale et inclus donc l'azote non protéique.

Durée : 6 échantillons par jour

Références Bibliographiques

*The most exciting phrase to hear in Science,
the one that heralds new discoveries, is not
« Eureka ! » but « That's funny... »
-Isaac Asimov*

Etude des mécanismes de production et de dépôt des composés de la fumée lors du fumage de la chair de poisson. Contribution à l'obtention de produits sains possédant de bonnes propriétés organoleptiques.

Le fumage de poisson comprend plusieurs étapes technologiques déterminantes pour la qualité finale du produit fumé. Ce travail a pour objectif d'apporter des éléments de maîtrise du produit fini à travers une meilleure compréhension des mécanismes de production et de dépôt de la fumée. Deux familles chimiques ont été mises au centre de ces études : les composés phénoliques (contributeurs à l'arôme, la couleur et la conservation des produits fumés) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (principaux contaminants toxiques de la fumée).

Un ensemble de techniques d'analyse directe des fumées et indirecte des interactions entre composés gazeux et matrices solides ont été développées et validées pour les besoins de ces travaux. L'apport de la chromatographie bidimensionnelle totale couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol pour le dosage des composés de la fumée a également été évalué.

La génération de fumée a été étudiée par caractérisation chimométrique d'un ensemble de fumées produites par un générateur industriel à friction et piégées par précipitation électrostatique. Le rôle prépondérant du bois utilisé (essence et humidité) a été confirmé, tout en soulignant la complexité de fonctionnement de ce type de générateur.

Les phénomènes de dépôt et d'interaction des composés de la fumée à la surface du produit ont été évalués à l'aide de matrices artificielles. La comparaison de résultats obtenus à la fois en conditions de fumage réel et en conditions modèles (espaces de tête statiques contrôlés) met en relief l'importance de la phase grasse du produit, principalement pour son enrichissement en composés phénoliques.

Mots-clés :

Fumage, Poisson, Composés phénoliques volatils, Hydrocarbures aromatiques polycycliques, Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle totale, Spectrométrie de masse en tandem, Interactions fumée - produit, Interactions composés volatils - matrices

Studying the mechanisms of smoke compounds production and deposit during fish smoking. Aiming to safer products with better organoleptic characteristics.

Quality of smoked fish is altered by several steps during the technological processing. This work aims at bringing out new control points of the final product through a better understanding of smoke production and deposit mechanisms. The studies focused on both volatile phenolic compounds (involved in aroma, colour and shelf life of smoked food) and polycyclic aromatic hydrocarbons (main toxic contaminants of smoke).

To directly elucidate smoke composition and indirectly evaluate interactions between gaseous compounds and solid matrices, several analysis techniques were developed and validated. Potential improvement of smoke compounds quantification by means of comprehensive gas chromatography was also investigated.

Smoke generation was studied by chemometric characterization of various smokes produced with an industrial friction generator and trapped by means of an electrostatic precipitator. The main importance of wood specie and moisture were confirmed, as well as the complexity of the operating conditions of that type of generator.

Deposits and interactions of smoke compounds at the surface of the products were measured with artificial food matrices. Results obtained under both actual industrial smoking and model conditions (static headspaces with controlled composition) highlighted the major role of the oil fraction, particularly concerning phenolic compounds enrichment.

Key-words :

Smoking, Fish, Simple phenolic compounds, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Comprehensive gas chromatography, Tandem mass spectrometry, Smoke - food interactions, Volatile compounds - matrices interactions